

La restricción en el tiempo de acceso al forraje en ovinos alimentados con pastura de buena calidad afecta algunos grupos microbianos ruminales

The restriction in the time of access to forage in ovine fed a high quality pasture affect groups of ruminal microorganisms

Pérez-Ruchel A.¹, Repetto J.L.², Fraga M.³,
Perelmuter K.³, Zunino P.³, Cajarville C.^{1*}

Recibido: 27/9/2013
Aprobado: 20/1/2014

RESUMEN

Se estudiaron los efectos de restringir el tiempo de acceso al forraje y del tiempo desde el inicio de la ingesta, sobre diferentes grupos bacterianos ruminales. Seis borregos fistulados, alojados en jaulas individuales, consumiendo únicamente forraje fresco (88% leguminosas) fueron distribuidos en 2 grupos: 24h y 6h (forraje disponible todo el día y 6 h/día, respectivamente). Luego de 30 días de adaptación, se extrajeron muestras de contenido ruminal (líquido + sólido) para estudiar la microbiota de cada grupo (24h vs. 6h). En los animales con acceso restringido al forraje (grupo 6h) se comparó también la microbiota entre las horas 0, 4 y 8 desde el inicio de la ingesta. Las muestras se analizaron por FISH (Fluorescence in situ hybridization), utilizando sondas para el

SUMMARY

The effects of restricting the time of access to forage and of the time from the beginning of the intake on different groups of ruminal microbes were studied. Six fistulized wethers, allocated in individual cages, consuming only fresh forage (88% legumes) were separated in 2 groups: 24h and 6h (forage available during all the day and 6 h/d, respectively). After 30 days of adaptation, ruminal content samples (fluid + solid) were extracted to evaluate the microbiota of each group (24h vs. 6h). In animals with restricted access to forage (6h group) the microbiota was also compared among 0, 4 and 8 hours from the beginning of the meal. The samples were analyzed by FISH (Fluorescence in situ hybridization), using

¹Departamento de Nutrición, ²Departamento de Bovinos, Facultad de Veterinaria, UdelaR. ³Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. *Lasplaces 1550, Montevideo, Uruguay
Autor para correspondencia C. Cajarville: ccajarville

Dominio Bacteria (Eubacterias), bacterias fibrolíticas (*Ruminococcus albus* y *flavefaciens*), productoras de lactato (*Streptococcus spp.*) y consumidoras de lactato (*Megasphaera elsdenii*, *Propionibacterium spp.*, *Selenomonas ruminantium*). El pH ruminal no fue afectado por la restricción, pero *R. albus*, *R. flavefaciens* y *S. ruminantium* fueron más abundantes para el grupo 24h. Dentro de los animales sometidos a restricción las Eubacterias tendieron a ser menos abundantes a las horas 4 y 8, cuando el pH ruminal también fue menor respecto a la hora 0, posiblemente debido al ingreso de alimento fresco. No se observaron diferencias entre grupos bacterianos debidas al horario de muestreo.

probes targeting the Domain Bacteria (Eubacteria), fibrolytic (*Ruminococcus albus* and *flavefaciens*), lactate-producing (*Streptococcus spp.*) and lactate-consuming (*Megasphaera elsdenii*, *Propionibacterium spp.*, *Selenomona ruminantium*) bacterias. The ruminal pH was not affected by the restriction, but *R. albus*, *R. flavefaciens* and *S. ruminantium* were more abundant for the 24h group. Within the animals under restriction the number of Eubacterias tended to be lower at hours 4 and 8, when ruminal pH was lower too, regarding to the hour 0, possibly due to the entry of fresh food. There were not differences between bacteria groups due to the sampling time were not observed.

Palabras claves:

pastura templada, microbiota ruminal, bacterias fibrolíticas, *Selenomonas ruminantium*

Key words:

temperate pasture, ruminalmicrobiota, fibrolytic bacteria, *Selenomonas ruminantium*

INTRODUCCIÓN

En los sistemas semi-intensivos pastoriles de producción de rumiantes es habitual que se limite el tiempo de acceso diario a la pastura, tanto por el cuidado de los animales como de la propia pastura. Es sabido que la restricción en el tiempo de acceso al alimento genera cambios en la

fermentación ruminal, en general vinculadas a fluctuaciones en el pH (Freer y col., 2007) debidas a las elevadas tasas de ingestión en los momentos del día en que el alimento está disponible (Forbes y Mayes, 2002). Este tipo de variación ha sido comunicada no solo cuando se utilizan dietas con elevada proporción de concentrados,

sino también al utilizar forrajes muy fermentables como único alimento de la dieta, y tanto en bovinos (Félix y col., 2011a,b) como en ovinos (Cajarville y col., 2006). Los trabajos anteriores sugieren que la restricción del tiempo de acceso al forraje podría afectar la microbiota ruminal o su actividad, aun cuando no se incluyan concentrados en la dieta. Si consideramos que, entre los distintos grupos bacterianos, las bacterias fibrolíticas son las más sensibles a variaciones en el pH ruminal y que presentan las tasas de crecimiento más bajas dentro de la población ruminal (Arcuri y col., 2011), la restricción en el tiempo de acceso al forraje podría afectar este grupo en particular, lo que en sistemas de alimentación a base de forrajes, podría ser una limitante importante para el aprovechamiento digestivo de la dieta.

La mayor parte de los microorganismos ruminales son anaerobios estrictos o facultativos, no cultivables, lo que dificulta su estudio mediante métodos convencionales de cultivo, particularmente cuando se intentan estudiar grupos específicos de microorganismos. El uso de técnicas moleculares (Kamra, 2005) ha permitido un avance en este sentido. Particularmente, la técnica *Fluorescens in situ hybridization* (FISH) permite detectar microorganismos mediante la hibridación del ARN ribosomal utilizando sondas específicas conjuga-

das a fluoróforos (Lascano y col., 2009).

Este trabajo integra una serie de estudios con un objetivo común: evaluar el efecto del tiempo de acceso al forraje sobre el consumo y el aprovechamiento digestivo del mismo. La hipótesis de este estudio en particular, es que la restricción en el tiempo de acceso al forraje de una pastura templada genera fluctuaciones en ecosistema ruminal que afectan en forma diferencial a las distintas poblaciones de microorganismos ruminales. El objetivo de este estudio fue cuantificar y comparar distintos grupos de la microbiota bacteriana ruminal en animales alimentados con una pastura como único alimento, a la que tenían acceso durante todo el día o durante un período de tiempo restringido. Asimismo, en los animales sometidos a alimentación restringida, se estudió la evolución diaria de estos grupos bacterianos en relación al inicio de la ingesta.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se llevó a cabo en el Campo Experimental de Libertad - Facultad de Veterinaria, UdelaR (34°S y 55°O), Departamento de San José. Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo a los principios bioéticos y protoco-

los de supervisión propuestos por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) de la UdelaR. Como ya se mencionó, este trabajo forma parte de una serie de estudios sobre los efectos de restringir el tiempo de acceso al forraje sobre el aprovechamiento digestivo en rumiantes. Así, en un artículo recientemente publicado (Pérez-Ruchel y col., 2013) se presentan resultados de otras variables (digestión y ambiente ruminal) medidas en este mismo experimento.

Animales, dietas y diseño experimental

Se utilizaron 6 borregos (1 a 2 años de edad), Corriedale x Milchschaf ($47,8 \pm 6,4$ kg de peso vivo (PV)), fistulizados en rumen y con sonda permanente. Los animales fueron alojados en jaulas metabólicas individuales, bloqueados por PV (3 bloques) y distribuidos al azar en 2 grupos con alimentación diferente: 24h: acceso al forraje durante todo el día y 6h: acceso al forraje durante un período de tiempo restringido de 6 h por día (7:00 – 13:00 h). Todos los animales fueron alimentados únicamente con forraje proveniente de una pastura compuesta principalmente por 88% (base seca) de leguminosas: *Lotus corniculatus* (80%) y *Lolium multiflorum*, *Trifolium pratense* y *T. repens*, con una disponibilidad inicial de

2065 kg MS/ha. La pastura contenía 29,5% de MS y 44,4% de FND; 28,5% de FAD y 12,8% de PB; en base seca. Los animales tuvieron libre acceso al agua en bebederos y se les ofreció el forraje fresco sin restricción de cantidad durante el tiempo establecido para cada tratamiento (todo el día o 6 h por día). El forraje fue cortado diariamente a 5 cm del suelo con una segadora de disco y ofrecido inmediatamente luego del corte que fue a las 07:00 h. Para el grupo 24h, cada día se refrigeró el forraje cortado para ofrecerlo luego de la hora 6 en relación al inicio de la ingesta.

Luego de un período de adaptación de 30 días, se extrajeron muestras del contenido ruminal (líquido + sólido), a partir del fondo del saco ventral del rumen mediante la sonda ruminal, para realizar 2 estudios diferentes:

Estudio I: evaluación de la microbiota ruminal de los animales sometidos a los distintos esquemas de alimentación. Para esto se extrajeron muestras de contenido ruminal a las 4 horas luego del inicio de la ingesta en ambos grupos (24h y 6h). Dicho horario de muestreo se seleccionó en base a los resultados de pH ruminal obtenidos en el mismo experimento (Pérez-Ruchel y col., 2013); la hora 4 fue la hora con menor pH, indicando una mayor actividad microbiana.

Estudio 2: evolución de la microbiota ruminal en animales con acceso restringido al forraje. Para esto las muestras fueron extraídas solamente de los animales sometidos al tratamiento 6h, a los tiempos 0, 4 y 8 horas luego del inicio de la ingesta.

Mediciones, análisis y cálculos

Inmediatamente luego de extraídas las muestras, se midió el pH del contenido ruminal con un pHmetro (eChem Instruments Pte. Ltd., Oakton, Singapur). El contenido ruminal presentó un porcentaje de materia orgánica (MO) de 82,6 % (determinado a 520 °C durante 3 h), 10 mL de contenido ruminal fueron mezclados con 10 mL de buffer salino fosfatado (PBS) suplementado con 0,025 g/L de Na₂-Cisteína (PBS-Cys). Inmediatamente, la suspensión resultante se procesó en un homogeneizador Stomacher 80 LabBlender (Seward, UK) durante 60 segundos a máxima velocidad. Estos procedimientos fueron realizados para disgregar la fase sólida y con el fin de mantener las condiciones reductoras y anaerobias de la muestra. Las muestras fueron fijadas en etanol absoluto (1:1) a 4 °C por 24 h y luego almacenadas a -20 °C hasta su utilización. Posteriormente las muestras fijadas fueron diluidas

y se filtraron utilizando filtros ISOPORE de 0,2 µm (MILLIPORE, Irlanda) que se almacenaron a -20 °C hasta su utilización. Posteriormente se permeabilizaron las células bacterianas fijadas para facilitar el ingreso de las sondas. Para ello los filtros se incubaron con lisozima (10 mg/mL), a 37 °C durante 1 hora, y luego con proteinasa k (0.09 u/mL) en buffer TE (10 x), a 37°C durante 15 minutos.

Las hibridaciones fueron realizadas sobre los segmentos de filtro según Pernthaler y col. (2003). Las sondas dirigidas al ARNr16S bacteriano así como el porcentaje de formamida utilizado se presentan el Cuadro 1 y han sido previamente utilizadas (Fraga y col., 2013).

Se utilizó una mezcla equimolar de 3 sondas para la detección de miembros del Dominio *Bacteria* (Amann y col., 1990; Daims y col., 1999). Las sondas estuvieron dirigidas a detectar grupos y especies bacterianas tradicionalmente asociadas a miembros de la microbiota ruminal con diferentes funciones. Se utilizaron sondas de oligonucleótidos específicas dirigidas a bacterias fibrolíticas: *Ruminococcus albus* y *Ruminococcus flavefaciens*, consumidoras de lactato: *Selenomonas ruminatum*, *Propionibacterium* spp., *Megaesphaera eldesnii*, y una sonda para

Cuadro 1. Sondas de oligonucleótidos para FISH

Sonda	Secuencia de la sonda (5'-3')*	% formamida
<i>Selenomonas ruminantium</i>	CCCATCTTTGCGGCAGGTTG	40
<i>Megasphaera elsdenii</i>	ACCCGTTTGCCACTCGAATC	30
<i>Ruminococcus albus</i>	TGCGGTTAGAACACAGGC	30
<i>Propionibacterium</i> spp.	AATTCCATTCTCCCCTACCTTC	50
<i>Streptococcus</i> spp.	GTAGGCAGGTTACCTACGCG	50
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	CCCTCTCTCTAAGGTAGG	10
Eubacteria	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	
	GCAGCCACCCGTAGGTGT	35
	GCTGCCACCCGTAGGTGT	

*Sondas marcadas con FITC en el extremo 5' (Fraga y col., 2013)

detectar *Streptococcus* spp., dada su relevancia en la acidosis de rumiantes. Para cada filtro, se contaron aproximadamente 1000 células totales (marcadas con DAPI: fluorocromo que tiñe todo el ADN de forma inespecífica). En esa cantidad de células totales se hizo el recuento de bacterias representantes de los diferentes grupos evaluados y de bacterias totales (detectados con la mezcla de sondas para Bacteria), luego conociendo la cantidad de campos en los que se hizo el recuento (superficie), la cantidad de muestra y dilución utilizada, se calculó el número total de cada grupo por mL de contenido ruminal.

Análisis estadístico

Se analizó la normalidad en las variables evaluadas mediante Proc. Univariate del SAS® (SAS Institute, Cary, USA, 2000). Los recuentos de microorganismos no presentaron una distribución normal por lo que los datos fueron normalizados mediante la transformación a \log_{10} para su posterior análisis mediante el Proc. Mixed del SAS.

Los grupos bacterianos y los valores de pH ruminal se compararon entre animales sometidos a cada uno de los 2 tratamientos de alimentación (24h vs. 6h, *Estudio 1*), utilizando el modelo $Y_{ijk} = \mu + T_i + B_j + e_{ijk}$, donde Y_{ijk} es la variable depen-

diente, μ es la media general, T_i es el efecto fijo del tratamiento (24h vs. 6h) en k réplicas animales ($n = 3$ borregos), B_j es el efecto aleatorio del bloque ($j = 3$ bloques) y e_{ijk} es el error residual.

Los recuentos de diferentes grupos bacterianos ruminales, y los valores de pH ruminal entre animales con acceso restringido al forraje (*Estudio 2*) a diferentes horarios luego del comienzo de la ingesta se analizaron como medidas repetidas sobre el animal de acuerdo al modelo $Y_{ijk} = \mu + H_i + B_j + e_{ijk}$, donde Y_{ijk} es la variable dependiente, μ es la media general, H_i el efecto fijo hora (h 0, 4 y 8) en k réplicas animales ($n = 3$ borregos), B_j es el efecto aleatorio del bloque ($j = 3$ bloques), y e_{ijk} es el error residual. Las medias de los datos de los diferentes horarios (h0, h4 y h8) fueron comparados mediante el test de Tukey. Se aceptaron como diferencias significativas valores de $P \leq 0,05$ y como tendencia valores de P mayores a 0,05 y menores a 0,1.

RESULTADOS

Estudio 1

El recuento de bacterias para los animales con 24 h de acceso al alimento se situó en $4,5 \times 10^{10}$ cel/mL y el de los animales con acceso restringido en $4,37 \times 10^{10}$ cel/mL. La restricción en el tiempo de acceso no afectó esta variable ($P > 0,05$), pero modificó el perfil bacteriano ya que llevó a variaciones en algunos grupos (Cuadro 2). Los recuentos de *R. albus*, *R. flavefaciens* y *S. ruminantium* fueron mayores en las muestras correspondientes a los animales del grupo 24h que en aquellas de los animales del grupo 6h (Cuadro 2), mientras que las poblaciones de *M. elsdenii*, *Propionibacterium spp.*, y *Streptococcus spp.*, no fueron afectadas por los tratamientos. No se registraron diferencias en el pH ruminal entre los animales de ambos tratamientos.

Estudio 2.

En el Cuadro 3 se presenta la evolución diurna del número de microorganismos y del pH ruminal en los animales alimentados durante 6 h por día. Como se observa, si bien el pH ruminal fue menor a la hora 4 y 8 en relación a la hora 0 desde el inicio de la ingesta, los recuentos de bacterias totales, tendieron a ser menores a las 4 y 8 h ($P = 0,077$) sin diferencias para las distintos grupos bacterianos analizados.

Cuadro II. Recuentos absolutos de microorganismos ruminales (\log_{10} promedio de células/mL) y pH ruminal en animales alimentados con forraje fresco durante 24h o 6h por día

	Tiempo de acceso al forraje		ESM	P
	24h	6h		
Eubacterias	10,4	10,1	0,13	0,145
<i>M. elsdenii</i>	9,63	8,76	0,36	0,166
<i>Propionibacterium spp.</i>	8,98	8,64	0,14	0,215
<i>R. albus</i>	9,13	8,74	0,10	0,052
<i>R. flavefaciens</i>	9,08	8,71	0,09	0,041
<i>S. ruminantum</i>	8,89	8,37	0,08	0,008
<i>Streptococcus spp.</i>	7,86	7,88	0,14	0,924
pH	6,75	6,77	0,10	0,842

SEM: error estándar de las medias; para cada fila letras diferentes entre medias son diferentes significativamente ($P \leq 0,05$).

Cuadro III. Recuentos absolutos de microorganismos ruminales (\log_{10} promedio de células/mL) y pH ruminal en animales alimentados durante 6 h a las horas 0, 4 y 8 desde el inicio de la ingesta

	Tiempo desde el inicio de la ingesta			ESM	P
	0h	4h	8h		
Eubacterias	10,44 ^x	10,09 ^y	10,20 ^y	0,08	0,077
<i>M. elsdenii</i>	8,83	8,76	9,07	0,27	0,723
<i>Propionibacterium spp.</i>	8,85	8,64	9,18	0,24	0,302
<i>R. albus</i>	8,96	8,74	9,10	0,21	0,527
<i>R. flavefaciens</i>	8,90	8,71	9,14	0,35	0,716
<i>S. ruminantum</i>	8,91	8,37	8,91	0,30	0,408
<i>Streptococcus spp.</i>	7,87	7,88	8,11	0,24	0,747
pH	7,27 ^a	6,51 ^b	6,52 ^b	0,18	0,006

SEM: error estándar de las medias; para cada fila letras diferentes entre medias son diferentes significativamente ($P \leq 0,05$).

DISCUSIÓN

El tiempo de acceso al forraje no afectó la cantidad de bacterias totales. Los recuentos de bacterias totales que se ubicaron en torno a 10^{10} células/mL de contenido ruminal, se encuentran dentro de las cantidades descritas en la literatura (Kamra, 2005; Arcuriy col., 2011). Algunos grupos bacterianos fueron afectados en forma importante por la restricción. En particular, las especies fibrolíticas *R. flavefaciens* y *R. albus* se vieron significativamente disminuidas en los animales que consumieron pastura solamente durante 6 h al día. Las bacterias fibrolíticas son sensibles a variaciones en el pH ruminal y dependen del N-NH₃ ruminal ya que lo utilizan como principal fuente de nitrógeno (Bryant y Robinson, 1961; Grant y Mertens, 1992). En este experimento los valores de pH ruminal fueron cercanos a la neutralidad y similares entre tratamientos. Por otra parte no se observaron diferencias entre tratamientos en las concentraciones de N-NH₃. En el otro estudio derivado de este mismo experimento mencionado, en el que se determinó la concentración de N-NH₃ durante 24 h, la concentración media fue de 23,7 y 23,5 mg/dL (para animales alimentados durante todo el día o durante 6 h/d, respectivamente), ubicándose los valores mínimos en niveles superiores

a 16 mg/dL (Pérez-Ruchel y col., 2013), lo que se sitúa por encima de los niveles mínimos necesarios para el óptimo crecimiento microbiano (Satter y Slyter, 1974). Ninguno de estos dos factores (pH y concentración de amonio) parece haber estado relacionado con la menor concentración de bacterias fibrolíticas observadas en este experimento, por lo que estos grupos serían sensibles a otras variaciones del ambiente ruminal. Consistentemente con el resultado anterior, cuando se evaluó la actividad fermentativa del inóculo ruminal de estos mismos animales sobre un sustrato fibroso (paja de trigo) mediante la técnica de producción de gas, se observó que el inóculo de los animales alimentados durante 6 h/d presentó una menor actividad, generando menor volumen de gas (Pérez-Ruchel y col., 2013).

Otra especie afectada por la restricción alimenticia fue *S. ruminantium*, bacteria muy importante en el control de la acidosis subclínica ya que es capaz de consumir lactato y producir propionato (Strobel and Russell, 1986) que se absorbe por la pared ruminal. Este resultado podría estar indicando una situación más desfavorable para las bacterias consumidoras de lactato en aquellos animales sometidos a restricción.

La disminución observada en las especies de bacterias fibrolíticas estudiadas y en *S. ruminantium* (consumidora de lactato), podría explicarse por la menor disponibilidad de sustratos (dada por un menor consumo de MO) y/o por el menor tiempo de retención del alimento en el rumen, ambos resultados observados por Pérez-Ruchel y col. (2013) en este mismo experimento para los animales alimentados durante 6 h en comparación con los alimentados durante todo el día. En este sentido, es de considerar el hecho de que las bacterias fibrolíticas, además de presentar elevados tiempos de generación, deben adherirse a la partículas de la fibra vegetal para poder digerirla (Krause y col., 2003), lo que haría más sensible a este grupo a disminuciones en el tiempo de retención ruminal.

En los animales alimentados durante un período de tiempo restringido, el número de bacterias totales tendió a ser inferior a las 4 y 8 horas desde el inicio de la ingesta, respecto a la hora 0. Este resultado coincide con lo reportado por Lascano y col. (2009), quienes evaluando diferentes niveles de concentrados y de levaduras en vaquillonas lecheras, encontraron que los recuentos de células viables disminuyeron desde el inicio de la alimentación hacia la hora 4 y al mismo tiempo aumentaron las células muertas. Según Arcuri y

col. (2011), a partir del inicio de la ingesta ocurriría una reducción en el número de microorganismos por mL de contenido ruminal debido a un aumento en la dilución del mismo causada por el ingreso de alimento fresco, agua y saliva al retículo-rumen.

CONCLUSIONES

El tiempo de acceso de los animales al forraje afectó la microbiota ruminal. La restricción en el tiempo de acceso al forraje disminuyó las cantidades por mililitro de contenido ruminal de las bacterias fibrolíticas y consumidoras de lactato estudiadas. Estos cambios se produjeron sin modificaciones del pH ruminal, y podrían tener relación con un tránsito digestivo más acelerado. En los animales que fueron alimentados durante 6 h por día, si bien el número de bacterias totales fue menor a las horas 4 y 8 en relación al inicio de la ingesta, no se encontraron diferencias entre horas en los grupos bacterianos estudiados.

AGRADECIMIENTOS

A los tesisistas de grado que participaron en el trabajo de campo de la tesis: Florencia Díaz, Martín Klaassen, Juan Pablo Viera.

REFERENCIAS

1. Amann RI, Binder BJ, Olson RJ, Chisholm SW, Devereux R, Stahl DA. (1990). Combination of 16SrRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol* 56:1919-1925.
2. Arcuri PB, Feraz FC, Carneiro JC. (2011). Microbiología do rúmen. En: Berchielli TT, Pires AV, Olivera SG (Eds.), *Nutrição de ruminantes*. 2ª edn. Funep, Jaboticabal, SP, pp. 115-160.
3. Bryant MP, Robinson IM. (1961). Studies on the nitrogen requirement of some ruminant cellulolytic bacteria. *Appl Microbiol* 9:96.
4. Cajarville C, Pérez A, Aguerre M, Britos A, Repetto JL. (2006). Effect of the timing of cut on ruminal environment of lambs consuming temperate pastures. *J Anim Sci* 84, suppl. 1:103.
5. Daims H, Bruhl A, Amann R, Schleifer KH, Wagner M. (1999). The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst Appl Microbiol* 22:434-444.
6. Félix A, Hernández N, Figueredo N, Génova M, Ibarra M, Mendoza A, Aguerre M, Pérez-Ruchel A, Repetto JL, Cajarville C. (2011 a). The time of access to temperate pasture influences rumen pH and NH₃-N concentration in heifers. *J Anim Sci* 89 E-Suppl 1:379.
7. Félix A, Hernández N, Torterolo N, Roja S, Aguerre M, Pérez-Ruchel A, Repetto JL, Cajarville C. (2011 b). The time of access to temperate pasture influences intake and feeding behavior in heifers. *J Anim Sci* 89 E-Suppl 1:380.
8. Forbes JM, Mayes RW. (2002). Food choice. En: Freer M, Dove H (eds.), *Sheep nutrition*. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 51-69.
9. Fraga M, Perelmutter K, Valencia MJ, Cajarville C, Zunino P. (2013). Caracterización de la microbiota bacteriana ruminal de un bovino a pastoreo mediante técnicas clásicas e independientes de cultivo. *Veterinaria* 49:40-55.
10. Freer M, Dove H, Nolan JV. (2007). Application. En: *Nutrient requirements of domesticated ruminants*, CSIRO Publishing, Collingwood, Australia, pp. 227-233.

11. Fuhrman JA, Ouverney CC. (1998). Marine microbial diversity studied via 16SrRNA sequences: cloning results from coastal waters and counting of native *Archaea* with fluorescent single cell probes. *Aquat Ecol* 32:3-15.
12. Grant RJ, Mertens DR. (1992). Influence of buffer and raw corn starch addition on in vitro fiber digestion kinetics. *J Dairy Sci* 73:1823-1833.
13. Kamra DN. (2005). Rumen microbial ecosystem. *Current Sci* 89:124-135.
14. Krause DO, Denman SE, Mackie RI, Morrison M, Rae AL, Attwood GT, McSweeney CS. (2003). Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. *FEMS Microbiology Reviews* 27:663-693.
15. Lascano GJ, Zanton GI, Heinrichs AJ. (2009). Concentrate levels and *Saccharomyces cerevisiae* affect rumen fluid-associated bacteria numbers in dairy heifers. *Livestock Sci* 126:189-194.
16. Pérez-Ruchel A, Repetto JL, Cajarville C. (2013). Suitability of live yeast addition to alleviate the adverse effects due to the restriction of the time of access to feed in sheep fed only pasture. *J Anim Physiol Anim Nutr* 97:1043-1050.
17. Pernthaler J, Pernthaler A, Amann R. (2003). Automated enumeration of groups of marine picoplankton after fluorescence in situ hybridization. *Appl Environ Microbiol* 69:2631-2637.
18. Satter LD, Slyter LL. (1974). Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. *Br J Nutr* 32:199-208.
19. Strobel HJ, Russell JB. (1986). Effect of pH and energy spilling on bacterial protein synthesis by carbohydrate-limited cultures of mixed rumen bacteria. *J Dairy Sci* 69:2941-2947.