



Abanico Veterinario. Janeiro-Dezembro 2022; 12:1-18. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2022.6>
Artigo Original. Recebido:01/09/2021. Aceito:02/03/2022. Publicado: 25/04/2022. Chave: e2021-75.
<https://www.youtube.com/watch?v=q1xX0Qi025E>

Bactérias ruminais e protozoários presentes em ovinos suplementados com probióticos identificados por contagem e PCR de ponto final

Ruminal bacteria and protozoa present in sheep supplemented with probiotics identified by counting and PCR endpoint

Lucía Delgadillo-Ruiz^{1*} , Rómulo Bañuelos-Valenzuela^{2**} , Perla Gallegos-Flores¹ , Carlos Meza-López² , Francisco Echavarría-Cháirez³ , Benjamín Valladares-Carranza⁴ 

¹Unidad Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Zacatecas. Avenida preparatoria s/n colonia Hidráulica, CP. 98068, Zacatecas, Zacatecas, México. ²Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Zacatecas. Carretera Panamericana Fresnillo-Zacatecas s/n, Centro, CP. 98500 Víctor Rosales, Zacatecas, México. ³Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo experimental Zacatecas, México. ⁴Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal. Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, México. *Autor responsável: Lucía Delgadillo-Ruiz. **Autor para correspondência: Rómulo Bañuelos-Valenzuela. E-mail: luciadeldgadillo@uaz.edu.mx, apozolero@hotmail.com, perla_gf17@hotmail.com, carmezlop@yahoo.com.mx, fechava1@yahoo.com, benvac2004@yahoo.com.mx

RESUMO

Algumas culturas microbianas, principalmente o uso de probióticos, têm sido utilizadas na nutrição de ruminantes, gerando um efeito positivo ao resolver desequilíbrios devidos a mudanças na dieta do rúmen. O objetivo era identificar e avaliar pela contagem da câmara de Neubauer e ponto final bactérias PCR e protozoários ruminais presentes em ovinos suplementados com microorganismos biopreparados (PNC) versus REVET® probiótico comercial (PCRE) em diferentes concentrações. Vinte e um ovinos de 3 meses de idade Katahdin e Dorper cruzados com 18-25 kg foram suplementados com PNC e PCRE em diferentes concentrações: PNC 100%, 66%, 33%, controle, PCRE 100%, 66%, 33%. O fluido ruminal foi obtido através de uma sonda, microorganismos ruminais foram contados em uma câmara Neubauer a cada seis horas. A extração do ADN genômico utilizando o kit de ADN Microbiano Ultra Limpo, a quantificação do ADN foi realizada em um espectrofotômetro e as reações PCR foram realizadas com oligonucleotídeos sintetizados pela Invitrogen®. A análise estatística foi realizada utilizando o procedimento GENMODE para a contagem de bactérias e protozoários. O maior número de protozoários era de 24 horas em PNC a 100%, seguido por PNC 33% a 18 horas, para PCRE probiótico comercial a 66% a 12 horas. As bactérias apresentaram valores estatisticamente iguais. A quantificação do ADN genômico foi superior a 25 ng/μL. O efeito inibitório do probiótico sobre o *Fibrobacter succinogenes* foi demonstrado em uma concentração de 100%. As bactérias totais não foram afetadas pela suplementação probiótica. Portanto, conclui-se que o probiótico não-comercial pode ser uma alternativa para complementar a dieta dos ovinos em crescimento e foi observado um aumento de bactérias e protozoários. Além disso, os probióticos são um aditivo que pode ser usado com sucesso, pois não modificou a população total de bactérias no rúmen.

Palavras-chave: ovinos, fermentação ruminal, bactérias, protozoários, PCR.



ABSTRACT

Some microbial cultures, mainly the use of probiotics, have been used in ruminant nutrition, generating a positive effect by solving imbalances due to dietary changes in the rumen. The objective was to identify and evaluate bacteria and ruminal protozoa present in sheep supplemented with biopreparation of microorganisms (PNC) vs commercial probiotic REVET® (PCRE) at different concentrations by Neubauer chamber count and PCR endpoint. Twenty-one Katahdin and Dorper cross sheep of 3 months of 18-25 kg were used, they were supplemented with PNC and PCRE, at different concentrations: PNC 100%, 66%, 33%, control, PCRE 100%, 66%, 33%. The ruminal liquid was obtained through a probe, the ruminal microorganisms were counted in a Neubauer chamber every six hours. Genomic DNA extraction using the Ultra Clean Microbial DNA kit, DNA quantification was performed in a spectrophotometer, and PCR reactions were performed with oligonucleotides synthesized by Invitrogen®. Statistical analysis was through the GENMODE procedure for counting bacteria and protozoa. The highest amount of protozoa was at 24 hours in PNC at 100%, followed by PNC 33% at 18 hours, for commercial probiotic PCRE at 66% at 12 hours. Regarding bacteria, they showed statistically equal values. Genomic DNA quantification was greater than 25 ng/μL. The inhibitory effect of the probiotic on *Fibrobacter succinogenes* at a concentration of 100% was demonstrated. Total bacteria were not affected by probiotic supplementation. Therefore, it is concluded that the non-commercial probiotic can be an alternative to supplement the diet of growing sheep, observing an increase in bacteria and protozoa. Likewise, probiotics are an additive that can be used successfully since they did not modify the population of total bacteria in the rumen.

Keywords: sheep, ruminal fermentation, bacteria, protozoan, PCR.

INTRODUÇÃO

Sistemas de produção animal desenvolvem formulações dietéticas usando aditivos alimentares que têm o potencial de modificar o ambiente ruminal, aumentando ou inibindo populações microbianas específicas, os probióticos têm sido usados para melhorar a microbiota ruminal, que é responsável pela degradação da celulose e hemicelulose, que permite que os ruminantes se alimentem de pastagens e consumo de forragem, além disso, os probióticos podem ser usados para modular a fermentação ruminal e a microbiota nativa, pois são uma fonte de microorganismos potencialmente úteis (Fraga *et al.*, 2014).

Os probióticos microbianos (*Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus plantarum* e *Bacillus subtilis*) utilizados em ruminantes melhoram a ingestão de matéria seca e a produtividade, a levedura *S. cerevisiae* é importante e sua inclusão em dietas é conhecida por melhorar a utilização de forragens de má qualidade (Shriver-Munsch *et al.*, 2011; Khattab *et al.*, 2020), aumenta a digestibilidade das fibras e estabiliza o pH ruminal (Moallem *et al.*, 2009; Degirmencioglu *et al.*, 2013; Meller *et al.*, 2014; Khattab *et al.*, 2020).

Lactobacillus plantarum melhora a ingestão de nutrientes, o desempenho de crescimento e a fermentação ruminal em cordeiros (Izuddin *et al.*, 2019; Khattab *et al.*, 2020). Qiao *et al.* (2010) mencionaram que *B. subtilis* em cordeiros reduziu a incidência de diarreia, aumentou a ingestão de matéria seca e o ganho de peso diário antes do desmame. Os probióticos influenciam o trato intestinal com simbiose de bactérias benéficas, na saúde



do hospedeiro, o que também pode envolver estímulo ao crescimento e contribuir para maior produtividade (Markowiak & Ślizewska, 2018).

A concentração de populações microbianas que vivem no rúmen em anaerobiose, especificamente para bactérias, protozoários e fungos é de 10^{10} células/mL, 10^6 células/mL e 10^4 células/mL respectivamente (Jouany, 1994; Cardona-Iglesias *et al.*, 2017). Para permitir a reprodução de organismos de crescimento lento, como fungos e protozoários ruminais, é necessária a residência prolongada da ração dentro do rúmen por períodos de 48 a 72 horas para sustentar a concentração de populações microbianas (McAllister *et al.*, 1994, Gharechahi *et al.*, 2021).

Castillo-Lopez & Domínguez-Ordóñez (2019), Castillo-Lopez *et al.* (2014) y Petri *et al.* (2012) relatam que, usando seqüenciamento de ADN de alto rendimento, revelaram a presença de 13 grandes filas bacterianas no rúmen, incluindo 40 ordens bacterianas, cerca de 80 classes bacterianas, e pelo menos 180 famílias bacterianas, cerca de 320 gêneros bacterianos e mais de 2.000 unidades taxonômicas bacterianas operacionais. A densidade bacteriana no rúmen está na faixa de 10^7 a 10^{10} células/mL de fluido ruminal (Castillo-Lopez *et al.*, 2014; Danielsson *et al.*, 2017). O gênero bacteriano ruminal mais abundante é o *Prevotella*, que representa 20% da comunidade bacteriana (Castillo-Lopez & Domínguez-Ordóñez, 2019).

Embora o número de gêneros de protozoários seja menor do que o de bactérias, os protozoários são fisicamente maiores do que as bactérias e podem constituir aproximadamente metade da biomassa microbiana ruminal total. Dos protozoários, foram identificadas mais de 20 espécies cuja concentração no rúmen é de aproximadamente 10^6 células/mL de fluido ruminal (Martin, 1994; Bodas *et al.*, 2012; Castillo-Lopez & Domínguez-Ordóñez, 2019).

Fibrobacter succinogenes é uma espécie dominante no sistema gastrointestinal de animais herbívoros, caracterizada como uma bactéria Gram-negativa, anaeróbica com capacidade de degradar fibras e em maiores quantidades (Kobayashi, 2006; Jun *et al.*, 2007). Esta bactéria, que é também uma das duas únicas espécies cultivadas, é um degradador de celulose eficiente. Especificamente, ela tem uma atividade particularmente alta contra a celulose cristalina que requer um contato físico próximo com este substrato (Suen *et al.*, 2011). Portanto, o objetivo era identificar e avaliar por contagem e ponto final PCR bactérias ruminais e protozoários presentes em ovinos suplementados com biopreparação de microorganismos (PNC) versus REVET® probiótico comercial (PCRE) em diferentes concentrações.



MATERIAL E MÉTODOS

Projeto experimental para animais

A experiência foi realizada na comunidade de El Remolino, Juchipila município, Zacatecas, México, localizada entre 103°07'26.15" N e 21°21'48.10" W, a 1220 m acima do nível do mar. O estudo foi realizado na estação seca (estação seca com temperaturas médias altas de 38-40°C) começando no final de março e terminando com as primeiras chuvas em junho. Incluía 21 saudáveis, em crescimento, Katahdin X Dorper de raça cruzada, saudáveis, 59 ± 5 dias de idade, com pesos médios de 14,3 ± 1. 7 kg, alojados sob condições homogêneas em canetas de rede de arame individuais, alimentadores de canoa, balde de 20 litros como bebedouro de água para cada caneta, suplemento com doses diferentes de biopreparação probiótica não comercial e REVET® probiótico comercial foi adicionado à água, que era *ad libitum* [El-Sayed & Mousa, 2020](#)). Os ovinos em crescimento foram alocadas em dois grupos e distribuídas como indicado na Tabela 1. Uma dieta baseada em 70% de restolho de milho moído, 15% de alfafa moída, 5% de grãos de milho, 8% de melaço, 1,5% de bicarbonato, 0,1% de pré-mistura de vitaminas e minerais, 0,4% de sal comum foi alimentada. As unidades experimentais foram submetidas a um período de adaptação de 17 dias antes da estação seca, de março a junho.

Tabela 1. Tratamentos utilizados na água potável

Tratamentos	% Dose	Quantidade de animais
T1 PNC	100% da dose recomendada em 6 L de água + dieta	3
T2 PNC	66% da dose recomendada em 6 L de água + dieta	3
T3 PNC	33% da dose recomendada em 6 L de água + dieta	3
T4 testigo	0% da dose recomendada em 6 L de água + dieta	3
T5 PCRE	100 % da dose recomendada em 6 L de água + dieta	3
T6 PCRE	66 % da dose recomendada em 6 L de água + dieta	3
T7 PCRE	33% da dose recomendada em 6 L de água + dieta	3

PNC: biopreparação de microorganismos. PCRE: REVET® probiótico comercial

Preparação da biopreparação de microrganismos sólidos (PNC)

Para a preparação do PNC sólido, 40 kg de farelo de trigo, 20 kg de probiótico florestal (matéria orgânica em decomposição) contendo os eficientes microrganismos sólidos (biopreparação), 0,5 kg de solução de melaço em cinco litros de água foram misturados em um barril de plástico de 100 litros. O container era aberto a cada dois ou três dias para liberar os gases gerados nos 30 dias necessários para que o PNC estivesse pronto e conforme delineado por [Kyan et al. \(1999\)](#).

Preparação de PNC líquido

Para fazer o PNC líquido, 8 kg de PNC sólido foram tomados, envoltos em uma manta e colocados em 100 L de água com 5 kg de melaço, e deixados de pé por duas horas ([Kyan et al., 1999](#)), após o que ficaram prontos para uso. Posteriormente, o conteúdo dos



microorganismos foi caracterizado através do uso de placas seletivas. A administração PNC continha: mesófilos $1,94 \times 10^7$ CFU/100mL, *Lactobacillus* sp. $1,6 \times 10^6$ CFU/100mL, *Staphylococcus aureus* $4,2 \times 10^4$ CFU/100mL, *Candida* sp. $5,5 \times 10^3$ CFU/100mL, *E. coli* $1,18 \times 10^6$ CFU/100mL, fungos $4,0 \times 10^5$ CFU/100mL e leveduras $4,27 \times 10^7$. A tabela 1 mostra o fornecimento do PNC nos diferentes tratamentos.

Preparação do líquido probiótico comercial REVET® (PCRE)

O probiótico para administração contribui para o equilíbrio dos microorganismos intestinais nos ovinos, previne disfunções ruminais, aumenta a síntese microbiana, mantém o equilíbrio e condições ótimas da flora ruminal, as doses recomendadas pelo fabricante são de 3 g por dia em ovinos, que foram diluídos em 6 litros de água (100%), 1,32 g diluídos em 6 litros de água (66%) e 0,99 g diluídos em 6 litros de água (33%). De acordo com as especificações do fornecedor, contém *Lactobacillus acidophilus* $7,3 \times 10^{18}$ CFU/100mL, *Streptococcus faecium* $1,1 \times 10^6$ CFU/100mL e *Saccharomyces cerevisiae* $3,6 \times 10^{11}$ CFU/100mL. O probiótico era oferecido nos 6 litros de água todos os dias às 08:00 horas.

Obtenção do fluido ruminal

O fluido ruminal foi obtido por meio duma sonda ruminal de 0,5", com 1m de comprimento, presa a uma seringa. O experimento durou 110 dias; os tempos de amostragem foram m1 (tempo 0), m2 (30 dias), m3 (60 dias) e m4 (110 dias); a amostragem de m3 foi realizada a cada 6 horas em oito intervalos de tempo (0, 6, 12, 12, 18, 24, 30, 36 e 48 horas). Aproximadamente 30 mL de fluido ruminal foram coletados.

Coleta e quantificação de bactérias e protozoários

O fluido ruminal obtido foi misturado e filtrado para obter uma amostra homogênea e filtrado. Com uma pipeta, foi extraído 1 mL de líquido ruminal, ao qual foram adicionados 9 mL de solução salina com 10% de formalina, depois as amostras foram refrigeradas para análise posterior, foram obtidos 2 mL desta última solução e adicionados 8 mL de água destilada, que foi centrifugada a 2000 xg durante 20 minutos, do sobrenadante foi retirada uma amostra para contar na câmara Neubauer com o apoio de um microscópio Carl Zeiss a 40X.

Ponto final PCR

Bactérias totais, *Fibrobacter succinogenes* e fungos anaeróbicos ruminais foram identificados por PCR endpoint; o método consistia em obter fluido ruminal através de uma sonda de 0,5" e 1m de comprimento presa a uma seringa, esta alíquota foi armazenada a -20°C para processamento posterior no laboratório. A extração de ADN foi realizada com o kit Ultra Clean Microbial ADN Isolation da MO BIO Laboratories Inc e sua quantificação foi realizada em um espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000 LabTech), sua



pureza foi determinada considerando proporções de absorção de 260/280 e 260/230 nm (Green *et al.*, 2012; Daza *et al.*, 2014).

Foram realizadas diluições do ADN extraído de cada amostra para colocar concentrações equimolares de 50 ng/μL. A seqüência dos oligonucleotídeos utilizados é mostrada na tabela 2, além do peso molecular de cada fragmento.

Tabela 2. Sequência de oligonucleotídeos

Espécies-alvo	Sequência de oligonucleotídeos	pb
Bactérias totais	f- CGGCAACGAGCGGAACCC r- CCATTGTAGCACGTGTGTAGCC	130
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	f- GTTCGGAATTACTGGGCGTAAA r- CGCCTGCCCTGAACTATC	121
<i>Anaerobic fungi</i>	f- GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTC r- CAAATTCACAAAGGGTAGGATGATT	120

(Denman & McSweeney, 2006)

A mistura de PCR tinha um volume final de 25 μL, que continha: 1X tampão de reação (Tris-HCl 20 mM pH 8,4, KCL 50 mM (Invitrogen®)), MgCl₂ 1. 2 mM (Invitrogen®), MgCl₂ 1,25mM (Invitrogen®), dNTPs 0,25 μM (Invitrogen®), cada primer 0,5 μM de, Taq DNA Polimerase 1U (Invitrogen®) de platina, e água de ampola. Para evitar contaminação, a mistura de reação foi realizada em um capô de fluxo laminar (FH1200). Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese numa câmara horizontal (Thermo® EC 330) em géis de agarose 0,8% em 1X TAE com brometo de etídeo, utilizando como marcador de referência o marcador de ADN Wide Range de 250 a 10.000 bp (Sigma-Aldrich®).

Análise estatística

Uma análise dos contrastes ortogonais e o teste do qui-quadrado foi realizado no software SAS (SAS, 2011), e o procedimento GENMOD do SAS foi usado para a contagem de protozoários e bactérias (Castañeda *et al.*, 2021).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As bactérias, protozoários e fungos que compõem o ecossistema ruminal diferem em suas necessidades nutricionais e metabolismo (Bach *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2007; Matthews *et al.*, 2018). Bactérias ruminais anaeróbicas, protozoários e fungos degradam o material fibroso, o que permite aos ruminantes utilizar fibras vegetais para nutrição (Rodríguez *et al.*, 2007). As bactérias são os microorganismos mais numerosos e, como os acima mencionados, desempenham um papel importante na degradação biológica da fibra alimentar. Rodríguez *et al.* (2012) afirmam que existem muitas bactérias e leveduras que podem ser utilizadas de forma benéfica para manter uma flora digestiva saudável e equilibrada.



A tabela 3 mostra os resultados da contagem de protozoários realizada a cada seis horas, onde se pode observar que o tratamento 100% PCRE mostra os valores mais baixos no tempo zero ($7,5 \times 10^3$ células/mL), quando em geral a média é de 10^5 células/mL.

Tabela 3. Quantificação de protozoários (células/mL) Probiótico não comercial (PNC) e Probiótico comercial REVET® (PCRE) em diferentes momentos (horas)

HORAS	0	6	12	18	24	30	36	48
CONTROLE	1.5×10^5	8.7×10^4	2.5×10^4	1.2×10^5	1.5×10^5	7.2×10^4	5.5×10^4	2.5×10^4
PNC 100%	1.0×10^5	1.1×10^5	5.2×10^4	1.0×10^5	1.5×10^5	7.5×10^4	7.2×10^4	8.2×10^4
PNC 66%	1.0×10^4	6.5×10^4	1.3×10^5	1.2×10^5	8.7×10^4	3.0×10^4	5.7×10^4	4.0×10^4
PNC 33%	3.5×10^4	9.5×10^4	3.7×10^4	1.5×10^5	4.7×10^4	2.5×10^4	1.7×10^4	1.1×10^5
CONTROLE	1.5×10^5	8.7×10^4	2.5×10^4	1.2×10^5	1.5×10^5	7.2×10^4	5.5×10^4	2.5×10^4
PCRE 100%	7.5×10^3	1.7×10^4	4.7×10^4	2.2×10^4	3.5×10^4	1.1×10^5	2.7×10^4	1.0×10^4
PCRE 66%	1.2×10^5	2.4×10^5	2.4×10^5	9.7×10^4	1.1×10^5	6.0×10^4	6.5×10^4	6.0×10^4
PCRE 33%	1.7×10^5	4.2×10^4	1.9×10^5	3.2×10^4	3.5×10^4	7.5×10^3	9.7×10^4	2.1×10^5

PNC: biopreparação de microorganismos. PCRE: REVET® probiótico comercial

As tabelas 4 e 5 apresentam os resultados da análise estatística mostrando que a comparação entre tratamentos é significativa ($P < 0,05$), mas não entre os tempos de contagem ($P > 0,05$).

Tabela 4. Comparação da contagem de protozoários entre os tratamentos PNC e PCRE

Tratamento	Estimativa	Média		Estimativa β	Erro padrão	Qui Cuadrado	P> Qui Cuadrado
	iva média	Limite de confiança					
PNC100%-PCRE100%	0.9618	0.7958	0.9939	3.2258	0.9518	11.49	0.0007
PNC100%-PCRE66%	0.3547	0.1004	0.7303	-0.5985	0.8136	0.54	0.462
PNC100%-PCRE33%	0.6563	0.2025	0.9349	0.6468	1.0294	0.39	0.5298
PNC66%-PCRE100%	0.9012	0.6083	0.9817	2.2106	0.9033	5.99	0.0144
PNC66%-PCRE66%	0.1661	0.0368	0.5096	-1.6137	0.843	3.66	0.0556
PNC66%-PCRE33%	0.4089	0.0853	0.8369	-0.3684	1.0223	0.13	0.7185
PNC33%-PCRE100%	0.8515	0.4865	0.972	1.7468	0.9188	3.61	0.0573
PNC33%-PCRE66%	0.1113	0.0207	0.4259	-2.0775	0.9075	5.24	0.0221
PNC33%-PCRE33%	0.3032	0.0513	0.7779	-0.8322	1.0641	0.61	0.4342
PNC100%-CONTROLE	0.5822	0.2133	0.8775	0.3319	0.8352	0.16	0.6911
PNC66%- CONTROLE	0.3355	0.0871	0.7277	-0.6834	0.8501	0.65	0.4215
PNC33%- CONTROLE	0.241	0.0501	0.6567	-1.1472	0.9163	1.57	0.2106
PCRE100%- CONTROLE	0.0525	0.008	0.2758	-2.894	0.984	8.65	0.0033
PCRE66%- CONTROLE	0.7171	0.313	0.9338	0.9303	0.8757	1.13	0.2881
PCRE33%- CONTROLE	0.4219	0.0832	0.8544	-0.3149	1.0637	0.09	0.7672

PNC: biopreparação de microorganismos. PCRE: REVET® probiótico comercial



Os contrastes entre os testes de tratamento mostram que o tratamento PNC a 100% é diferente ($P < 0,05$) de sua contraparte PCRE a 100%, PNC a 66% é diferente ($P < 0,05$) de PCRE a 100% e 66% ($P = 0,055$) e PNC a 33% é diferente ($P > 0,057$) de PCRE a 100% e 66% ($P < 0,05$), assim como PCRE 100% foi diferente ($P > 0,05$) do controle.

Tabela 5. Análise de variância

Fonte	Graus de liberdade	Qui Cuadrado	P> Qui Cuadrado
Tratamento	6	18.43	0.0052
Tempo	7	7.17	0.4118

O teste de qui-quadrado para o número de protozoários nos tratamentos PNC vs PCRE a 66% da dose recomendada. Não apresentou um número maior de protozoários no PNC, embora tenha sido observado um crescimento mais favorável com relação ao PCRE em 66% com um $P < 0,0556$. Nos tratamentos PNC vs PCRE com concentração de 33%, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as contagens de protozoários dos tratamentos PNC e PCRE de 33% ($P < 0,05$).

As contagens bacterianas foram realizadas a cada 6 horas em oito intervalos de tempo, obtendo-se concentrações médias de 106 células/mL na maioria das vezes e tratamentos, com o tratamento de 66% PNC mostrando a maior concentração de bactérias ($1,49 \times 10^7$ células/mL), enquanto no tempo de 30 horas a menor concentração foi identificada nos diferentes tratamentos (Tabela 6).

Tabela 6. Quantificação das bactérias nos tratamentos PNC e PCRE (células/mL) em horários diferentes (horas)

HORAS	0	6	12	18	24	30	36	48
CONTROLE	3.1×10^6	1.6×10^6	1.0×10^6	2.75×10^6	9.5×10^5	2.8×10^6	1.6×10^6	1.65×10^6
PNC 100%	2.7×10^6	2.5×10^6	1.4×10^6	2.5×10^6	2.6×10^6	8.0×10^5	1.7×10^6	8.5×10^5
PNC 66%	2.55×10^6	1.25×10^6	1.49×10^7	2.8×10^6	8.75×10^6	5.0×10^5	1.25×10^6	2.5×10^6
PNC 33%	3.5×10^6	8.45×10^6	1.25×10^6	6.05×10^6	1.6×10^6	1.5×10^5	2.9×10^6	4.45×10^6
CONTROLE	3.1×10^6	1.6×10^6	1.0×10^6	2.75×10^6	9.5×10^5	2.8×10^6	1.6×10^6	1.65×10^6
PCRE 100%	7.5×10^5	1.35×10^6	1.35×10^6	3.65×10^6	2.5×10^6	3.7×10^6	3.35×10^6	1.05×10^6
PCRE 66%	3.2×10^6	5.3×10^6	1.45×10^6	2.8×10^6	1.4×10^6	5.6×10^6	3.9×10^6	5.15×10^6
PCRE 33%	4.05×10^6	2.15×10^6	2.8×10^6	5.9×10^6	7.0×10^6	4.5×10^5	1.7×10^6	1.85×10^6

PNC: biopreparação de microorganismos. PCRE: REVET[®] probiótico comercial

No trabalho de [Uchida et al. \(1987\)](#) eles relataram que um único protozoário pode levar até 10^4 bactérias por hora. Estas estimativas indicam que a predação de protozoários pode renovar toda a biomassa bacteriana no rúmen com alta densidade de protozoários (10^5 a 10^6). Ovinos suplementados com PNC e PCRE benefício tanto em populações de protozoários quanto em bactérias.



Tabela 7. Comparação da contagem bacteriana entre os tratamentos PNC e PCRE

Tratamento	Estimativa média	Média Limite de confiança	Estimativa β	Erro padrão	Qui Cuadrado	P> Qui Cuadrado
PNC100%-PCRE100%	0.4364	0.1282 0.803	-0.2557	0.8475	0.09	0.7629
PNC100%-PCRE66%	0.1458	0.0299 0.4859	-1.7679	0.8732	4.1	0.0429
PNC100%-PCRE33%	0.2255	0.0538 0.5987	-1.2339	0.8338	2.19	0.1389
PNC66%-PCRE100%	0.5539	0.1625 0.8882	0.2164	0.947	0.05	0.8192
PNC66%-PCRE66%	0.2149	0.0401 0.6421	-1.2958	0.9594	1.82	0.1768
PNC66%-PCRE33%	0.3183	0.0712 0.7398	-0.7618	0.9218	0.68	0.4086
PNC33%-PCRE100%	0.7429	0.3163 0.9475	1.0611	0.9348	1.29	0.2563
PNC33%-PCRE66%	0.3891	0.0952 0.794	-0.4511	0.9186	0.24	0.6234
PNC33%-PCRE33%	0.5207	0.1567 0.864	0.0829	0.901	0.01	0.9267
PNC100%-CONTROLE	0.4713	0.1579 0.8091	-0.1148	0.7955	0.02	0.8852
PNC66%- CONTROLE	0.5884	0.2011 0.8903	0.3573	0.886	0.16	0.6867
PNC33%- CONTROLE	0.7689	0.3639 0.9509	1.202	0.8983	1.79	0.1809
PCRE100%- CONTROLE	0.5352	0.1744 0.8625	0.1409	0.8652	0.03	0.8707
PCRE66%- CONTROLE	0.8393	0.4782 0.9675	1.6531	0.8879	3.47	0.0626
PCRE33%- CONTROLE	0.7538	0.366 0.942	1.1191	0.8513	1.73	0.1886

PNC: biopreparação de microorganismos. PCRE: REVET® probiótico comercial

As tabelas 7 e 8 mostram o teste qui-quadrado no qual se observa que não há diferença estatisticamente significativa entre as contagens bacterianas com as diferentes doses de PNC vs PCRE estudadas ($P < 0,05$). A única comparação mostrou diferenças entre PNC 100% vs PCRE 66%, sendo maior em PCRE 66%.

Tabela 8. Análise de variância

Fonte	Graus de liberdade	Qui Cuadrada	P>Qui Cuadrada
Tratamento	6	7.01	0.399
Tempo	7	7.17	0.2574

Ovinos suplementados com PNC e PCRE benefício em populações de protozoários e bactérias. Segundo [Williams & Coleman \(2012\)](#) os tempos de multiplicação dos protozoários variam de 5-14 horas, coincidindo com os tempos de concentrações no PCRE as populações máximas ocorreram às 12 horas a 66% e às 18 horas a 33%, [Jouany \(1994\)](#) e [Williams & Coleman \(2012\)](#) descobriram que várias espécies de protozoários ruminais possuem alfa amilase e uma das com maior atividade amilolítica deste tipo é *Entodinium caudatum*, da mesma forma, [Mould & Thomas \(1958\)](#) e [Arcos-García et al., \(2007\)](#), encontrou alfa e beta amilase em protozoários holotróficos que promovem a divisão das unidades de reserva e de açúcar estrutural em plantas. No lado nutricional os probióticos e enterobactérias competem por aminoácidos essenciais e açúcares, reduzem a produção de amins tóxicas, isto é remediado com *Lactobacillus acidófilo* importante para o estado de saúde do animal ([Castillo-Lopez et](#)



al., 2013). A densidade bacteriana nas células fluidas ruminais 10^7 e 10^{10} , os filamentos bacteróides mais abundantes incluem 75% da população bacteriana total (Castillo-Lopez & Domínguez-Ordóñez, 2019).

Probióticos não comerciais (PNCs) podem ser uma alternativa para complementar a dieta dos ovinos em crescimento, é necessário indicar que os PNCs nos ovinos poderiam ser usados para otimizar a produção em toda a dieta animal, sem causar impacto negativo na ecologia, o que pode ser alcançado através do fornecimento direto de PNCs e PCREs. Com relação às concentrações de ADN registradas para o tratamento de controle, foi obtida uma concentração média de 58,36 ng/μL, com um valor mínimo de 28 ng/μL e um valor de 100 ng/μL. A tabela 9 mostra cada uma das concentrações obtidas, assim como a relação 260/280, o que indica que a pureza do ADN é adequada para protocolos PCR. Nos ovinos suplementadas com PNC, o ADN genômico foi obtido nas seguintes concentrações médias 77,6 ng/μL, 69,7 ng/μL e 70,18 ng/μL, nos tratamentos de 100%, 66% e 33%, respectivamente (Tabela 9). As concentrações de ADN obtidas de microorganismos fluidos do rúmen de ovinos suplementados com PCRE foram em média 46,81 ng/mL em 100%, 46,09 ng/mL em 66% e 36,36 ng/mL em 33%.

Tabela 9. Concentrações de ADN de amostras em diferentes tratamentos

Amostragem	Controle	PNC	PNC	PNC	PCRE	PCRE	PCRE	
		100%	66%	33%	100%	66%	33%	
Concentração (ng/mL)								
M1 (0 Dias)	48	----	-----	72	103	65	52	
M2 (30 Dias)	65	94	84	64	60	72	-----	
6hr	57	136	41	34	36	37	28	
12hr	28	45	95	127	59	30	30	
18hr	100	26	78	199	37	36	29	
24hr	88	52	109	34	28	61	42	
30hr	58	234	48	23	25	53	-----	
M3 (60 Dias)	36hr	70	46	49	42	48	31	85
42hr	31	38	74	37	55	48	55	
48hr	55	44	50	71	25	29	45	
M4 (110 Dias)	42	61	69	69	39	45	34	

PNC: biopreparação de microorganismos. PCRE: REVET® probiótico comercial

A diversidade de bactérias totais no rúmen é importante durante a degradação e fermentação da ração, pois isso permite uma grande variedade de enzimas, bem como reações bioquímicas precisas que ajudam a hidrolisar o material vegetal em estruturas mais simples e torná-lo mais disponível para os microorganismos e aumentar os produtos de fermentação (López *et al.*, 2020).



Com relação ao total de bactérias, a banda de amplificação PCR corresponde a 130 bp, e esta banda característica foi identificada no gel de controle, o que corresponde à figura 1 (A). De acordo com estes resultados, pode-se mencionar que o probiótico com melhor efeito de adaptação sobre as bactérias totais foi o PNC, pois permitiu que a microbiota das bactérias continuasse a crescer no rúmen e, portanto, não afetou a degradação da ração e a fermentação ruminal.

As bactérias ruminais estão envolvidas na degradação da celulose, esta espécie tem mais de 100 sequências de codificação para enzimas degradantes de polissacarídeos (Morrison *et al.*, 2003; Jun *et al.*, 2007; Firkins, 2021), a maioria das quais são responsáveis pela degradação de substratos celulósicos, além destas bactérias degradam xilana, hemicelulose e monossacarídeos de parede vegetal (Mirón, 1991; Hobson & Stewart, 2012).

O PCRE demonstrou ter um efeito inibidor sobre *Fibrobacter succinogenes* numa concentração de 100%, pois a faixa específica para o oligonucleotídeo (121 bp) não é observada em comparação com o controle como visto na figura 1 (H), entretanto, para concentrações de 66 e 33% esta faixa está presente (Figura 1, J, K).

Os fungos anaeróbicos ruminais desempenham um papel estratégico na digestão de alimentos fibrosos, pois têm grande capacidade de colonizar paredes de celulose lignificada e enfraquecer os tecidos fibrosos das plantas, bem como degradar os componentes estruturais de suas paredes celulares (Galindo *et al.*, 2017). Para fungos anaeróbicos (120 bp), estes não foram afetados com suplementação probiótica em nenhuma concentração (Figura 1, P, Q, R, S, T, U).

O efeito dos probióticos parece estar relacionado aos mecanismos e processos metabólicos realizados pelos microorganismos envolvidos na fermentação ruminal e na formação de metano, Rodríguez *et al.* (2013) afirmam que existem muitas bactérias e leveduras que podem ser utilizadas benéficamente para manter uma flora digestiva saudável e equilibrada. Os microorganismos mais utilizados são *Lactobacillus* sp., *Streptococcus faecium*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. stearothermophilus* e *S. cerevisiae*.

Lactobacillus crescem rapidamente no intestino, talvez o mais conhecido, e são bactérias que podem converter lactose em ácido láctico. Este aumento do ácido láctico diminui o pH intestinal, o que afeta a sobrevivência de microorganismos que não são benéficos para a flora ruminal, patógenos, entre outros.

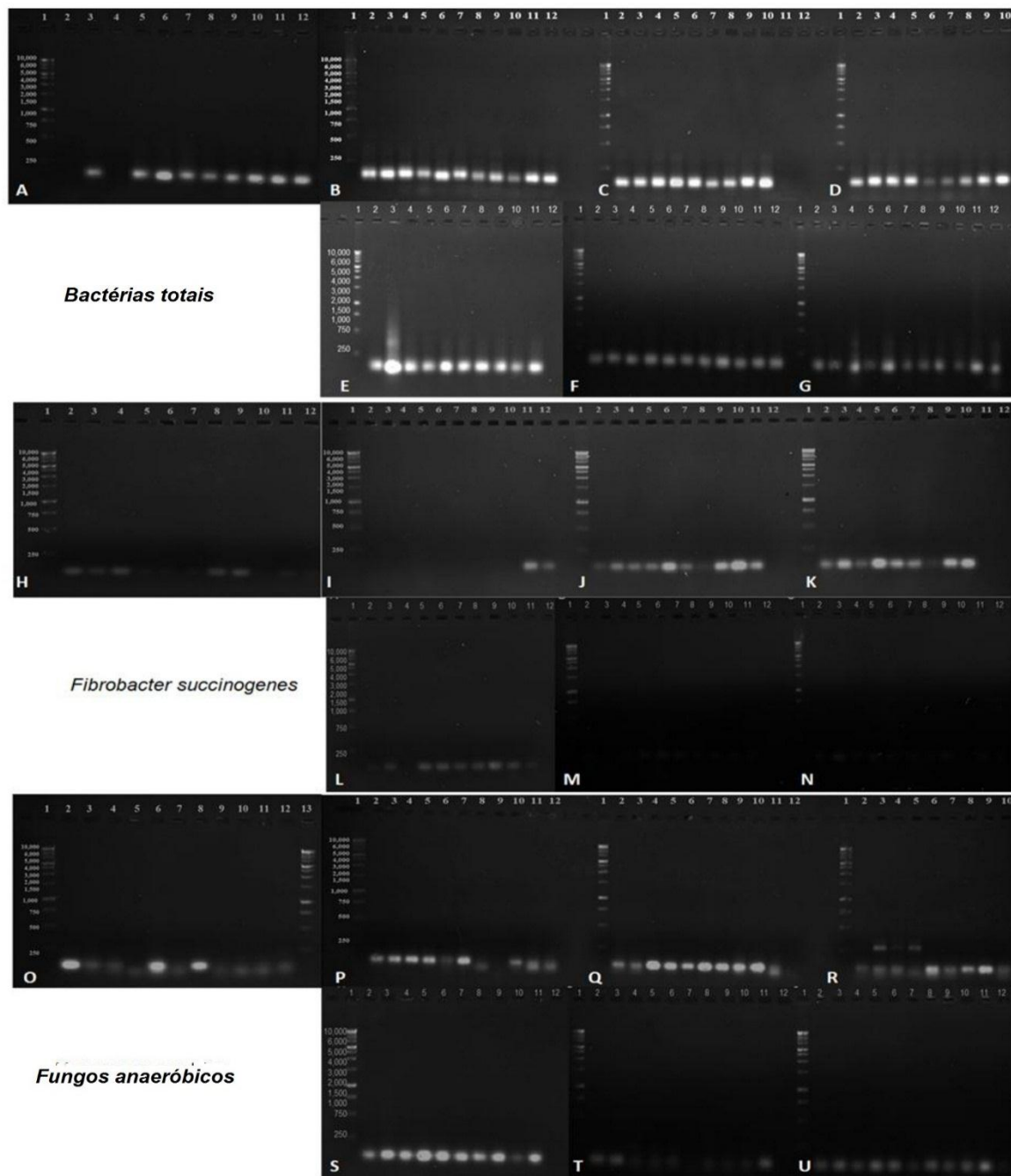


Figura 1. Amplificação de banda PCR. Pista 1, Marcador de peso molecular (250 a 10.000 bp); Pista 2, M1 (0 dias); Pista 3, M2 (30 dias); Pista 4 a 11, M3 (60 dias -6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48 h-); Pista 12, M4 (110 dias). Bactérias totais (A, B, C, D, E, F, G), *Fibrobacter succinogenes* (H, I, J, K, L, M, N) e fungos anaeróbicos (O, P, Q, R, S, T, U) em cada um dos tratamentos (Controle, 100%, 66% e 33%) com probiótico comercial (PCRE) e probiótico não-comercial (PNC)



CONCLUSÕES

O probiótico não-comercial pode ser uma alternativa para complementar a dieta de ovinos em crescimento na região de Juchipila, Zacatecas, México, gerando um aumento de bactérias e protozoários. Os probióticos são um aditivo que pode ser usado com sucesso, pois não modificou a população de bactérias totais e fungos anaeróbicos no rúmen.

LITERATURA CITADA

ARCOS-GARCÍA JL, López-Pozos R, Bernabé-Hernández A, Hoffman JA. 2007. La actividad microbiana en la fermentación ruminal y el efecto de la adición de *Saccharomyces cerevisiae*. *Ciencia y Tecnología*. 11(32):51:62.

https://www.utm.mx/edi_anteriores/pdf/nota3t32.pdf

BACH A, Calsamiglia S, Stern MD. 2005. Nitrogen metabolism in the rumen. *Journal of dairy science*. 88(1):e9-21. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)73133-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73133-7)

BODAS R, Prieto N, García-González R, Andrés S, Giráldez FJ, López S. 2012. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Animal Feed Science and Technology*. 176(1-4):78-93.

<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.07.010>

CARDONA-IGLESIAS JL, Mahecha-Ledesma L, Angulo-Arizala J. 2017. Arbustivas forrajeras y ácidos grasos: estrategias para disminuir la producción de metano entérico en bovinos. *Agronomía Mesoamericana*, 28 (1), 273-288.

https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1659-13212017000100022

CASTAÑEDA ARO, Álvarez MJA, Rojas MC, Lira AJJ, Ríos UÁ, Martínez IF. 2021. Nivel de infestación de *Rhipicephalus microplus* y su asociación con factores climatológicos y la ganancia de peso en bovinos *Bos taurus* x *Bos indicus*. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 12(1), 273-285. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v12i1.5392>

CASTILLO-LOPEZ E, Wiese BI, Hendrick S, McKinnon JJ, McAllister TA, Beauchemin KA, Penner GB. 2014. Incidence, prevalence, severity, and risk factors for ruminal acidosis in feedlot steers during backgrounding, diet transition, and finishing. *Journal of animal science*. 92(7):3053-3063. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05295.x>

CASTILLO-LOPEZ E, Domínguez-Ordóñez MG. 2019. Factores que afectan la composición microbiana ruminal y métodos para determinar el rendimiento de la proteína microbiana. Revisión. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*. 10(1):120-148.

<http://dx.doi.org/10.22319/rmcp.v10i1.4547>



CASTILLO-LOPEZ E, Klopfenstein TJ, Fernando SC, Kononoff PJ. 2013. *In vivo* determination of rumen undegradable protein of dried distillers grains with solubles and evaluation of duodenal microbial crude protein flow. *Journal of animal science*. 91(2):924-934. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5323>

DANIELSSON R, Dicksved J, Sun L, Gonda H, Müller B, Schnürer A, Bertilsson J. 2017. Methane production in dairy cows correlates with rumen methanogenic and bacterial community structure. *Frontiers in microbiology*. 8(1):226. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00226>

DAZA C, Guillen J, Rey J, Ruiz V. 2014. Evaluación de un método de extracción y purificación de DNA a partir de tejido muscular fijado en formaldehído de cadáveres no identificados. *Revista Med*. 22(1): 42-49. <http://www.scielo.org.co/pdf/med/v22n1/v22n1a06.pdf>

DEGIRMENCIOGLU T, Ozcan T, Ozbilgin S, Senturklu S. 2013. Effects of yeast culture addition (*Saccharomyces cerevisiae*) to Anatolian water buffalo diets on milk composition and somatic cell count. *J. Dairy Prod. process. improv*. 63:42–48. <https://doi.org/10.15567/mljekarstvo>

DENMAN SE, McSweeney CS. 2006. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. *FEMS microbiology ecology*. 58(3):572-582. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00190.x>

EL-SAYED AA, Mousa SA. 2020. Effects of administration of probiotic on body growth and hematobiochemical profile in growing Barki lambs. *Comparative Clinical Pathology*. 29(1):297-303. <https://doi.org/10.1007/s00580-019-03057-z>

FIRKINS JL. 2021. Invited Review: Advances in rumen efficiency. *Applied Animal Science*, 37(4), 388-403. <https://doi.org/10.15232/aas.2021-02163>

FRAGA M, Perelmuter K, Valencia MJ, Martínez M, Abin-Carriquiry A, Cajarville C, Zunino P. 2014. Evaluation of native potential probiotic bacteria using *in vitro* ruminal fermentation system. *Annals microbiology*. 64(3):1149-1156. <https://annalsmicrobiology.biomedcentral.com/articles/10.1007/s13213-013-0753-3>

GALINDO J, Elías A, Muñoz E, Marrero Y, González N, Sosa A. 2017. Activadores ruminales, aspectos generales y sus ventajas en la alimentación de animales rumiantes. *Cuban Journal of Agricultural Science*. 51(1):11-23. <http://scielo.sld.cu/pdf/cjas/v51n1/cjas02117.pdf>



GHARECHAH J, Vahidi MF, Bahram M, Han JL, Ding XZ, Salekdeh GH. 2021. Metagenomic analysis reveals a dynamic microbiome with diversified adaptive functions to utilize high lignocellulosic forages in the cattle rumen. *The ISME Journal*, 15(4), 1108-1120. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-00837-2>

GREEN MR, Hughes H, Sambrook J, MacCallum P. 2012. Molecular cloning: a laboratory manual. *In Molecular cloning: a laboratory manual*. Pp. 1890-1890. ISBN 978-1-936113-42-2. <https://www.cshlpress.com/pdf/sample/2013/MC4/MC4FM.pdf>

HOBSON PN, Stewart CS. 2012. The rumen microbial ecosystem. *Springer Science & Business Media*. (Eds.).
https://books.google.com.pr/books?id=B8quw8mhYcC&printsec=frontcover&source=gs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

IZUDDIN WI, Loh TC, Samsudin AA, Foo HL, Humam AM, Shazali N. 2019. Effects of postbiotic supplementation on growth performance, ruminal fermentation and microbial profile, blood metabolite and GHR, IGF-1 and MCT-1 gene expression in post-weaning lambs. *BMC Vet. Res.* 15, 315. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2064-9>

JOUANY JP. 1994. Methods of manipulating the microbial metabolism in the rumen. *In Annales de zootechnie*. 43(1):49-62. <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00888958/document>

JUN HS, Qi M, Ha JK, Forsberg CW. 2007. *Fibrobacter succinogenes*, a dominant fibrolytic ruminal bacterium: transition to the post genomic era. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 20(5):802-810. <https://doi.org/10.5713/ajas.2007.802>

KOBAYASHI Y. 2006. Inclusion of novel bacteria in rumen microbiology: need for basic and applied science. *Animal Science Journal*. 77(4):375-385.
<https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2006.00362.x>

KHATTAB IM, Abdel-Wahed AM, Khattab AS, Anele UY, El-Keredy A, Zaher M. 2020. Effect of dietary probiotics supplementation on intake and production performance of ewes fed Atriplex hay-based diet. *Livestock Science*. 237(April):104065.
<https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.104065>

KYAN T, Shintani M, Kanda S, Sakurai M, Ohashi H, Fujisawa A, Pongdit S. 1999. Kyusei nature farming and the technology of effective microorganisms. *Atami (Japan), Asian Pacific Natural Agricultural Network*.
<https://www.bokashi.se/dokument/bibliotek/APNAN%2520Manual.pdf>



LÓPEZ FR, Álvarez AA, León RDA, Taylor OVM, Guiral GD, Ríos CS, Lorz SE, Katherine PL, Vergara AS. 2020. La investigación con *Streptomyces* spp. como herramienta para el estudio de los microorganismos del suelo. Centro de investigaciones Facultad de Ciencias de la Salud. Primera edición, Volumen 1. Editorial Zapata–Manizales. ISBN: 978-958-8859-62-0.
<https://repository.unilibre.edu.co/handle/10901/18649>

MARKOWIAK P, Śliżewska K. 2018. The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut pathogens*. 10(1):1-20. <https://doi.org/10.1186/s13099-018-0250-0>

MARTIN SA. 1994. Nutrient transport by ruminal bacteria: a review. *Journal of animal science*. 72(11):3019-3031. <https://doi.org/10.2527/1994.72113019x>

MATTHEWS C, Crispie F, Lewis E, Reid M, O'Toole PW, Cotter PD. 2018. The rumen microbiome: a crucial consideration when optimising milk and meat production and nitrogen utilisation efficiency. *Gut microbes*, 10(2), 115-132.
<https://doi.org/10.1080/19490976.2018.1505176>

MELLER RA, Firkins JL, Gehman AM. 2014. Efficacy of live yeast in lactating dairy cattle. *Prof. Anim. Sci.* 30, 413–417. <https://doi.org/10.15232/pas.2014-01308>

McALLISTER TA, Bae HD, Jones GA, Cheng KJ. 1994. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *Journal of animal science*. 72(11):3004-3018.
<https://doi.org/10.2527/1994.72113004x>

MIRÓN J, 1991. La hidrólisis de los componentes monosacáridos de la pared celular de la alfalfa mediante monocultivos o combinaciones de pares de bacterias ruminales definidas. *Revista de bacteriología aplicada*. 70(3): 245-252.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1991.tb02932.x>

MOALLEM U, Lehrer H, Livshitz L, Zachut M, Yakoby S, 2009. The effects of live yeast supplementation to dairy cows during the hot season on production, feed efficiency, and digestibility. *J. Dairy Sci.* 92:343–351. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0839>

MORRISON M, Neslon KE, Cann I, Forsberg CW, Mackie RI, Russell JB, White BA, Wilson DB, Amaya K, Cheng B, Qi S, Jun HS, Mulligan S, Tran K, Carty H, Khouri H, Nelson W, Daugherty S, Tran K. 2003. The *Fibrobacter succinogenes* strain S85 sequencing project. 3rd ASM-TIGR, *Microbial Genome Meeting*. New Orleans.
<https://www.koreascience.or.kr/article/JAKO200710103409172.j>



MOULD DL, Thomas GJ. 1958. The enzymic degradation of starch by Holotrich protozoa from sheep rumen. *Biochem. J.* 69:327.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1196559/pdf/biochemj00831-0014.pdf>

PETRI RM, Forster RJ, Yang W, McKinnon JJ, McAllister TA. 2012. Characterization of rumen bacterial diversity and fermentation parameters in concentrate fed cattle with and without forage. *Journal of Applied Microbiology.* 112(6):1152-1162.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05295.x>

QIAO GH, Shan AS, Ma N, Ma QQ, Sun ZW. 2010. Effect of supplemental *Bacillus* cultures on rumen fermentation and milk yield in Chinese Holstein cows. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 94:429–436. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2009.00926.x>

RODRÍGUEZ I, Salazar M, Villalobos E. 2012. *Lactobacillus* spp. Del tracto intestinal de *Gallus gallus* con potencial probiótico. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas.* 32(2):62-72. <https://xdoc.mx/documents/lactobacillus-spp-del-tracto-intestinal-de-gallus-gallus-con-potencial-5ebc63e4de0c8>

RODRÍGUEZ R, Sosa A, Rodríguez Y. 2007. La síntesis de proteína microbiana en el rumen y su importancia para los rumiantes. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola.* 41(4):303-311. <https://www.redalyc.org/pdf/1930/193017712001.pdf>

RODRÍGUEZ R, Lores J, Gutiérrez D, Ramírez A, Gómez S, Elías A, Jay O. 2013. Inclusión del aditivo microbiano Vitafert en la fermentación ruminal *in vitro* de una dieta para cabras. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola.* 47(2):171-178.

<https://www.redalyc.org/pdf/1930/193028751011.pdf>

SAS Institute Inc. 2011. SAS 9.3. Cary, NC: SAS Institute Inc.

<https://support.sas.com/documentation/onlinedoc/base/procstat93m1.pdf>

SHRIVER-MUNSCH CM, Ramsing EM, Males JR, Sanchez WK, Yoon I, Bobe G. 2011. Effect of various dosages of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on reproductive function in multiparous dairy cows. In: Page 38 in Proc. 13th Annual Northwest Reproductive Sciences Symposium. Corvallis, OR.

https://ir.library.oregonstate.edu/concern/graduate_thesis_or_dissertations/xg94hs88v

SUEN G, Weimer PJ, Stevenson DM, Aylward FO, Boyum J, Deneke J, Drinkwater C, Ivanova NN, Mikhailova N, Chertkov O, Goodwin LA, Currie CR, Mead D, Brumm PJ. 2011. The complete genome sequence of *Fibrobacter succinogenes* S85 reveals a cellulolytic and metabolic specialist. *Plos One.* 6:e18814.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018814>



UCHIDA I, Takase S, Kayakiri H, Kiyoto S, Hashimoto M, Tada T, Koda S, Morimoto Y. 1987. Structure of FR 900482, a novel antitumor antibiotic from a *Streptomyces*. *Journal of the American Chemical Society*. 109(13):4108-4109.

<https://doi.org/10.1021/ja00247a043>

WILLIAMS AG, Coleman GS. 2012. The rumen protozoa. *Springer Science & Business Media*. Nueva York. <https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-009-1453-73>

[Errata Erratum](#)

<https://abanicoacademico.mx/revistasabanico-version-nueva/index.php/abanico-veterinario/errata>