









Abanico Veterinario. Enero-Diciembre 2022; 12:1-18. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2022.6>
Artículo Original. Recibido: 01/09/2021. Aceptado:02/03/2022. Publicado: 25/04/2022. Clave: e2021-75.
<https://www.youtube.com/watch?v=q1xX0Qj025E>

Bacterias y protozoarios ruminales presentes en ovinos suplementados con probióticos identificados por conteo y PCR punto final

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

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 responsable: Lucía Delgadillo-Ruiz. **Autor de correspondencia: 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

RESUMEN

Algunos cultivos microbianos principalmente el uso de probióticos se han utilizado en la nutrición de rumiantes, generando un efecto positivo al solucionar los desbalances debido a cambios dietéticos en el rumen. El objetivo fue identificar y evaluar por conteo en cámara de Neubauer y PCR punto final bacterias y protozoarios ruminales presentes en ovinos suplementados con biopreparado de microorganismos (PNC) vs probiótico comercial REVET® (PCRE) a diferentes concentraciones. Se utilizaron 21 ovinos cruce Katahdin y Dorper de 3 meses de 18-25 Kg, se suplementaron con PNC y PCRE, a diferentes concentraciones: PNC 100%, 66%, 33%, testigo, PCRE 100%, 66%, 33%. El líquido ruminal se obtuvo a través de sonda, los microorganismos ruminales se contaron en cámara de Neubauer cada seis horas. La extracción de ADN genómico utilizando el kit Ultra Clean Microbial DNA, la cuantificación de ADN se realizó en un espectrofotómetro y las reacciones de PCR se realizaron con oligonucleótidos sintetizados por Invitrogen®. El análisis estadístico fue mediante el procedimiento GENMODE para el conteo de bacterias y protozoarios. La mayor cantidad de protozoarios fue a las 24 horas en PNC al 100%, seguido del PNC 33% a las 18 horas, para probiótico comercial PCRE al 66% a 12 horas. En cuanto a bacterias mostraron valores estadísticamente iguales. La cuantificación de ADN genómico fue mayor a 25 ng/μL. Se demostró el efecto inhibitorio del probiótico sobre *Fibrobacter succinogenes* en una concentración de 100%. Las bacterias totales no se vieron afectadas con la suplementación del probiótico. Por lo que se concluye que el probiótico no comercial puede ser una alternativa para complementar la dieta de los ovinos en crecimiento observándose un incremento de bacterias y protozoarios. Así mismo, los probióticos son un aditivo que puede ser utilizado con éxito ya que no modificó la población de bacterias totales en el rumen. **Palabras clave:** ovinos, fermentación ruminal, bacterias, protozoario, 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.

INTRODUCCIÓN

Los sistemas de producción pecuarios, desarrollan formulaciones dietéticas empleando aditivos alimenticios que tienen potencial de modificar el entorno ruminal mejorando o inhibiendo poblaciones microbianas específicas, se han utilizado probióticos para mejorar la microbiota del rumen, la cual es responsable de la degradación de celulosa y hemicelulosa, que permite a los rumiantes se alimenten del consumo de pastos y forrajes, además los probióticos se pueden usar para modular la fermentación del rumen y la microbiota nativa, ya que son una fuente de microorganismos potencialmente útiles (Fraga *et al.*, 2014).

Los probióticos microbianos (*Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus plantarum* y *Bacillus subtilis*) utilizados en rumiantes mejoran la ingesta de materia seca y la productividad, la levadura *S. cerevisiae* es importante y se sabe que su inclusión en las dietas mejora la utilización de forrajes de mala calidad (Shriver-Munsch *et al.*, 2011; Khattab *et al.*, 2020), aumenta la digestibilidad de la fibra y estabiliza el pH del rumen (Moallem *et al.*, 2009; Degirmencioglu *et al.*, 2013; Meller *et al.*, 2014; Khattab *et al.*, 2020).

Lactobacillus plantarum mejora la ingesta de nutrientes, el rendimiento del crecimiento y la fermentación ruminal en corderos (Izuddin *et al.*, 2019; Khattab *et al.*, 2020). Qiao *et al.* (2010) mencionaron que *B. subtilis* en corderos redujo la incidencia de diarrea, aumentó la ingesta de materia seca y ganancia diaria de peso antes del destete. Los probióticos influyen en el tracto intestinal con la simbiosis de bacterias beneficiosas, sobre la salud del huésped que también puede implicar la estimulación del crecimiento y contribuyen a una mayor productividad (Markowiak & Ślizewska, 2018).

La concentración de las poblaciones microbianas que viven en el rumen en anaerobiosis, específicamente para bacterias, protozoarios y hongos son de 10^{10} células/mL, 10^6



células/mL y 10^4 células/mL respectivamente (Jouany, 1994; Cardona-Iglesias *et al.*, 2017). Para permitir que los organismos de crecimiento lento; tales como los hongos y protozoarios ruminales puedan reproducirse, se necesita permanencia prolongada del alimento dentro del rumen por periodos de 48 a 72 horas y sostener así la concentración de las poblaciones microbianas (McAllister *et al.*, 1994, Gharechahi *et al.*, 2021).

Castillo-Lopez & Domínguez-Ordóñez (2019), Castillo-Lopez *et al.* (2014) y Petri *et al.* (2012) reportan que mediante la utilización de la secuenciación de ADN de alto rendimiento han revelado la presencia de 13 principales filos bacterianos en el rumen, que incluyen 40 órdenes bacterianos, alrededor de 80 clases de bacterias, y por lo menos 180 familias bacterianas, unos 320 géneros de bacterias y más de 2,000 unidades taxonómicas bacterianas operativas. La densidad bacteriana en el rumen se encuentra en el rango de 10^7 a 10^{10} células/mL de líquido ruminal (Castillo-Lopez *et al.*, 2014; Danielsson *et al.*, 2017). El género de bacterias ruminales más abundantes es de *Prevotella*, que representa el 20% de la comunidad bacteriana (Castillo-Lopez & Domínguez-Ordóñez, 2019).

Si bien el número de géneros de protozoarios es menor que el de las bacterias, los protozoarios son físicamente más grandes que estas y pueden constituir aproximadamente la mitad de la biomasa microbiana ruminal total. De los protozoarios se han identificado más de 20 especies cuya concentración en el rumen es de aproximadamente 10^6 células/mL de líquido ruminal (Martin, 1994; Bodas *et al.*, 2012; Castillo-Lopez & Domínguez-Ordóñez, 2019).

Fibrobacter succinogenes es una especie dominante en el sistema gastrointestinal de los animales herbívoros, se caracteriza por ser una bacteria Gram negativa, anaeróbica y con capacidad de degradar la fibra y en mayor cantidad (Kobayashi, 2006; Jun *et al.*, 2007). Esta bacteria, que también es una de las dos únicas especies cultivadas, es degradadora eficiente de la celulosa. Específicamente, tiene una actividad particularmente alta contra la celulosa cristalina que requiere un contacto físico cercano con este sustrato (Suen *et al.*, 2011). Por lo tanto, el objetivo fue identificar y evaluar por conteo y PCR punto final bacterias y protozoarios ruminales presentes en ovinos suplementados con biopreparado de microorganismos (PNC) vs probiótico comercial REVET® (PCRE) a diferentes concentraciones.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño experimental para los animales

El experimento se realizó en la comunidad el Remolino, municipio de Juchipila, Zacatecas, México, localizada entre $103^{\circ}07'26.15''$ N y $21^{\circ}21'48.10''$ O, a 1220 msnm. El estudio se realizó en la temporada de estiaje (temporada seca con altas temperaturas promedio de $38-40^{\circ}\text{C}$) inicia a finales del mes de marzo y termina con las primeras lluvias de junio. Incluyó 21 corderos de pelo en crecimiento, cruce de Katahdin X Dorper, sanos, con edad de 59 ± 5 días, con pesos promedio de 14.3 ± 1.7 kg, alojados en condiciones



homogéneas en corraletas individuales de malla de alambre, comederos de canoa, cubeta de 20 litros como bebedero para cada corraleta, la suplementación con las diferentes dosis del biopreparado probiótico no comercial y probiótico comercial REVET® fue adicionada en el agua, la cual estaba *ad libitum* (El-Sayed & Mousa, 2020). Los ovinos en crecimiento fueron asignados en dos grupos y distribuidos como se indica en el cuadro 1. Se suministró una dieta a base de rastrojo de maíz molido 70%, alfalfa molida 15%, grano de maíz 5%, melaza 8%, bicarbonato 1.5%, premezcla de vitaminas y minerales 0.1%, sal común 0.4%. Las unidades experimentales fueron sometidos a un periodo de adaptación durante 17 días, previo a la temporada de estiaje, de marzo a junio.

Cuadro 1. Tratamientos utilizados en agua de bebida

Tratamientos	% Dosis	Cantidad de animales
T1 PNC	100% de la dosis recomendada en 6 L de agua + dieta	3
T2 PNC	66% de la dosis recomendada en 6 L de agua + dieta	3
T3 PNC	33% de la dosis recomendada en 6 L de agua + dieta	3
T4 testigo	0% de la dosis recomendada en 6 L de agua + dieta	3
T5 PCRE	100 % dosis recomendada en 6 L de agua + dieta	3
T6 PCRE	66 % dosis recomendada en 6 L de agua + dieta	3
T7 PCRE	33% dosis recomendada en 6 L de agua + dieta	3

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

Preparación del biopreparado de microorganismos (PNC) sólido

Para la elaboración del PNC sólido se mezclaron en un barril de plástico con capacidad de 100 litros, 40 kg de salvado de trigo, 20 kg de probiótico forestal (materia orgánica en descomposición) el cual contenía los microorganismos eficientes sólidos (biopreparado); solución de 0.5 kg de melaza en cinco litros de agua. El contenedor se abrió cada dos o tres días para liberar gases generados en los 30 días que tardó el PNC en estar listo y como lo señala [Kyan et al. \(1999\)](#).

Elaboración de PNC líquido

Para elaborar el PNC líquido se tomaron 8 kg de PNC sólido, se colocaron envueltos en una manta y se introdujeron en 100 L de agua con 5 kg de melaza, se dejó reposar por dos horas ([Kyan et al., 1999](#)) transcurrido el tiempo estuvo listo para ser utilizado. Posteriormente se caracterizó el contenido de microorganismos mediante el uso de medios selectivos sembrados en placa. El PNC de administración contenía: mesófilos 1.94×10^7 UFC/100mL, *Lactobacillus* sp. 1.6×10^6 UFC/100mL, *Staphylococcus aureus* 4.2×10^4 UFC/100mL, *Candida* sp. 5.5×10^3 UFC/100mL, *E. coli* 1.18×10^6 UFC/100mL, hongos 4.0×10^5 UFC/100mL y levaduras 4.27×10^7 . En el cuadro 1 se observa el suministro del PNC en los distintos tratamientos.



Preparación del probiótico comercial REVET® (PCRE) líquido

El probiótico de administración coadyuba al equilibrio de microorganismos intestinales en ovinos, previene la disfunción ruminal, aumenta la síntesis microbiana, mantiene el equilibrio y las condiciones óptimas de la flora del rumen, las dosis recomendadas por el fabricante es 3 g por día en ovinos, los cuales se diluyeron en 6 litros de agua (100%), 1.32 g diluyéndose en 6 litros de agua (66%) y 0.99 g diluyéndose en 6 litros de agua (33%). De acuerdo con las especificaciones del proveedor contiene *Lactobacillus acidophilus* 7.3×10^{18} UFC/100mL, *Streptococcus faecium* 1.1×10^6 UFC/100mL y *Saccharomyces cerevisiae* 3.6×10^{11} UFC/100mL. El probiótico se ofreció en los 6 litros de agua todos los días a las 08:00 horas.

Obtención del líquido ruminal

El líquido ruminal se obtuvo por medio de una sonda ruminal de 0.5" y 1m de largo unida a una jeringa. El experimento duró 110 días; de los cuales los tiempos de muestreo fueron m1 (tiempo 0), m2 (30 días), m3 (60 días) y m4 (110 días); el muestreo m3 se realizó cada 6 horas en ocho intervalos de tiempo (0, 6, 12, 18, 24, 30, 36 y 48 horas). Se recolectaron aproximadamente 30 mL de líquido ruminal.

Obtención y cuantificación de bacterias y protozoarios

El líquido ruminal obtenido se mezcló y filtró para obtener una muestra homogénea y se filtró. Con una pipeta se extrajo 1mL de líquido ruminal, al cual se le adicionaron 9 mL de solución salina con formalina al 10%, posteriormente, las muestras se refrigeraron para su posterior análisis, de esta última solución se obtuvieron 2 mL y se le adicionaron 8 mL de agua destilada lo cual se centrifugó a 2000 xg durante 20 minutos, del sobrenadante se tomó una muestra para hacer el conteo en la cámara de Neubauer apoyándose de un microscopio marca Carl Zeiss a 40X.

PCR punto final

Bacterias totales, *Fibrobacter succinogenes* y hongos anaerobios ruminales se identificaron por PCR punto final; el método consistió en obtener líquido ruminal a través de una sonda 0.5" y 1m de largo unido a una jeringa, esta alícuota fue conservada a -20°C para su posterior procesamiento en el laboratorio. La extracción de ADN se realizó con el kit Ultra Clean Microbial ADN Isolation de MO BIO Laboratories Inc y su cuantificación se llevó a cabo en un espectrofotómetro (NanoDrop ND-1000 LabTech), su pureza fue determinada considerando relaciones de absorbancia de 260/280 y 260/230 nm (Green *et al.*, 2012; Daza *et al.*, 2014).

Se realizaron diluciones del ADN extraído de cada muestra, a fin de colocar concentraciones equimolares de 50 ng/ μ L. La secuencia de los oligonucleótidos empleados se muestra en el cuadro 2 además del peso molecular de cada fragmento.



Cuadro 2. Secuencia de los oligonucleótidos

Especies de destino	Secuencia de oligonucleótidos	pb
Bacterias totales	f- CGGCAACGAGCGCGAACCC	130
	r- CCATTGTAGCACGTGTGTAGCC	
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	f- GTTCGGAATTACTGGGCGTAAA	121
	r- CGCCTGCCCTGAACTATC	
<i>Anaerobic fungi</i>	f- GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTC	120
	r- CAAATTCACAAAGGGTAGGATGATT	

(Denman & McSweeney, 2006).

La mezcla de PCR tuvo un volumen final de 25 μ L, la cual contenía: amortiguador de reacción 1X (Tris-HCl 20 mM pH 8.4, KCL 50 mM (Invitrogen®)), $MgCl_2$ 1.2 mM (Invitrogen®), $MgCl_2$ 1.25mM (Invitrogen®), dNTPs 0.25 μ M (Invitrogen®), cada primer 0.5 μ M de, Platinum Taq DNA Polymerase 1U (Invitrogen®), y agua de ampola. Para evitar contaminación la mezcla de la reacción se llevó a cabo en campana de flujo laminar (FH1200). Los productos amplificados se sometieron a electroforesis en una cámara horizontal (Thermo® EC 330) en geles de agarosa al 0.8% en TAE 1X con bromuro de etidio, utilizando como marcador de referencia Wide Range DNA Marker de 250 a 10,000 pb (Sigma-Aldrich®).

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de contrastes ortogonales y la prueba de chi cuadrada en el programa SAS (SAS, 2011), para el conteo de protozoarios y bacterias se utilizó el procedimiento GENMOD de SAS (Castañeda *et al.*, 2021).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las bacterias, protozoos y hongos que conforman el ecosistema ruminal difieren en sus requerimientos de nutrientes y en su metabolismo (Bach *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2007; Matthews *et al.*, 2018). Las bacterias del rumen anaeróbico, los protozoos y los hongos degradan el material fibroso, lo que permite a los rumiantes utilizar la fibra vegetal para su nutrición (Rodríguez *et al.*, 2007). Las bacterias son los microorganismos más numerosos y al igual que las anteriores, juegan un papel importante en la degradación biológica de la fibra dietética, Rodríguez *et al.* (2012) plantean que son muchas las bacterias y levaduras que se pueden usar de forma benéfica para mantener una flora digestiva sana y en equilibrio.

En el cuadro 3 se observan los resultados del conteo de protozoarios realizados cada seis horas y donde se observa que el tratamiento PCRE al 100% presenta los valores menores en el tiempo cero (7.5×10^3 células/mL), cuando en general el promedio es 10^5 células/mL.



Cuadro 3. Cuantificación de protozoarios (células/mL) tratamiento Probióticos No Comercial (PNC) y Probiótico Comercial REVET® (PCRE) a diferente tiempo (horas)

HORAS	0	6	12	18	24	30	36	48
TESTIGO	1.5x10 ⁵	8.7x10 ⁴	2.5x10 ⁴	1.2x10 ⁵	1.5x10 ⁵	7.2x10 ⁴	5.5x10 ⁴	2.5x10 ⁴
PNC 100%	1.0x10 ⁵	1.1x10 ⁵	5.2x10 ⁴	1.0x10 ⁵	1.5x10 ⁵	7.5x10 ⁴	7.2x10 ⁴	8.2x10 ⁴
PNC 66%	1.0x10 ⁴	6.5x10 ⁴	1.3x10 ⁵	1.2x10 ⁵	8.7x10 ⁴	3.0x10 ⁴	5.7x10 ⁴	4.0x10 ⁴
PNC 33%	3.5x10 ⁴	9.5x10 ⁴	3.7x10 ⁴	1.5x10 ⁵	4.7x10 ⁴	2.5x10 ⁴	1.7x10 ⁴	1.1x10 ⁵
TESTIGO	1.5x10 ⁵	8.7x10 ⁴	2.5x10 ⁴	1.2x10 ⁵	1.5x10 ⁵	7.2x10 ⁴	5.5x10 ⁴	2.5x10 ⁴
PCRE 100%	7.5x10 ³	1.7x10 ⁴	4.7x10 ⁴	2.2x10 ⁴	3.5x10 ⁴	1.1x10 ⁵	2.7x10 ⁴	1.0x10 ⁴
PCRE 66%	1.2x10 ⁵	2.4x10 ⁵	2.4x10 ⁵	9.7x10 ⁴	1.1x10 ⁵	6.0x10 ⁴	6.5x10 ⁴	6.0x10 ⁴
PCRE 33%	1.7x10 ⁵	4.2x10 ⁴	1.9x10 ⁵	3.2x10 ⁴	3.5x10 ⁴	7.5x10 ³	9.7x10 ⁴	2.1x10 ⁵

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

En el cuadro 4 y 5 se presentan los resultados del análisis estadístico en el que se muestra que la comparación entre tratamientos es significativa ($P < 0.05$), no así entre tiempos de conteo ($P > 0.05$).

Cuadro 4. Comparación del conteo de protozoarios entre los tratamientos PNC y PCRE

Tratamiento	Estimación de media	Media Límite de confianza	Estimación β	Error estándar	Chi Cuadrada	P>Chi Cuadrada
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%-TESTIGO	0.5822	0.2133 0.8775	0.3319	0.8352	0.16	0.6911
PNC66%-TESTIGO	0.3355	0.0871 0.7277	-0.6834	0.8501	0.65	0.4215
PNC33%-TESTIGO	0.241	0.0501 0.6567	-1.1472	0.9163	1.57	0.2106
PCRE100%-TESTIGO	0.0525	0.008 0.2758	-2.894	0.984	8.65	0.0033
PCRE66%-TESTIGO	0.7171	0.313 0.9338	0.9303	0.8757	1.13	0.2881
PCRE33%-TESTIGO	0.4219	0.0832 0.8544	-0.3149	1.0637	0.09	0.7672

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

Los contrastes de pruebas entre tratamientos muestran que el tratamiento PNC al 100%, es diferente ($P < 0.05$) a su contraparte PCRE al 100%, al PNC al 66% es diferente ($P < 0.05$) al PCRE al 100 y 66% ($P = 0.055$) y el PNC al 33% es diferente ($P > 0.057$) al PCRE al 100 y 66% ($P < 0.05$), así como PCRE 100% fue diferente ($P > 0.05$) al testigo.



Cuadro 5. Análisis de varianza

Fuente	Grados de libertad	Chi Cuadrada	P>Chi Cuadrada
Tratamiento	6	18.43	0.0052
Tiempo	7	7.17	0.4118

La prueba chi-cuadrada para la cantidad de protozoarios en los tratamientos PNC vs PCRE en concentración 66% de la dosis recomendada. No evidenció una cantidad mayor de protozoarios en los PNC, aunque se observa un crecimiento más favorable con respecto al PCRE al 66% una $P < 0.0556$. En los tratamientos PNC vs PCRE en concentración 33% no observó diferencia estadísticamente significativa entre los conteos de protozoarios de los tratamientos al 33% de PNC y PCRE ($P < 0.05$).

El conteo de bacterias se realizó cada 6 horas en ocho intervalos de tiempo obteniendo concentraciones promedio de 10^6 células/mL en la mayoría de los tiempos y tratamientos, siendo el tratamiento PNC al 66% quien presentó la mayor concentración de bacterias (1.49×10^7 células/mL), mientras que en el tiempo de 30 horas se identificó la menor concentración en los diferentes tratamientos (Cuadro 6).

Cuadro 6. Cuantificación de bacterias en los tratamientos PNC y PCRE (células/mL) a diferente tiempo (horas)

HORAS	0	6	12	18	24	30	36	48
TESTIGO	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
TESTIGO	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: biopreparado de microorganismos. PCRE: probiótico comercial REVET®.

En el trabajo realizado por [Uchida et al. \(1987\)](#) reportaron que un solo protozooario puede tomar hasta 10^4 bacterias por hora. Estas estimaciones indican que la depredación de los protozoarios puede renovar toda la biomasa bacteriana en el rumen con alta densidad de protozoarios (10^5 a 10^6). Los ovinos suplementados con PNC y PCRE se ven beneficiados en las poblaciones de protozoarios y bacterias.



Cuadro 7. Comparación del conteo de bacterias entre los tratamientos PNC y PCRE

Tratamiento	Estimación	Media		Estimación	Error estándar	Chi Cuadrada	P>Chi Cuadrada
	de media	Límite de confianza		β			
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%-TESTIGO	0.4713	0.1579	0.8091	-0.1148	0.7955	0.02	0.8852
PNC66%-TESTIGO	0.5884	0.2011	0.8903	0.3573	0.886	0.16	0.6867
PNC33%-TESTIGO	0.7689	0.3639	0.9509	1.202	0.8983	1.79	0.1809
PCRE100%-TESTIGO	0.5352	0.1744	0.8625	0.1409	0.8652	0.03	0.8707
PCRE66%-TESTIGO	0.8393	0.4782	0.9675	1.6531	0.8879	3.47	0.0626
PCRE33%-TESTIGO	0.7538	0.366	0.942	1.1191	0.8513	1.73	0.1886

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

En el cuadro 7 y 8 se presenta la prueba chi cuadrada en el cual se observa que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los conteos de bacterias con las diferentes dosis estudiadas de PNC vs PCRE ($P < 0.05$). La única comparación que mostró diferencias entre PNC 100% vs PCRE 66%, siendo mayores en PCRE 66%.

Cuadro 8. Análisis de varianza

Fuente	Grados de libertad	Chi Cuadrada	P>Chi Cuadrada
Tratamiento	6	7.01	0.399
Tiempo	7	7.17	0.2574

Los ovinos suplementados con PNC y PCRE se ven beneficiados en las poblaciones de protozoarios y bacterias. Según [Williams & Coleman \(2012\)](#) los tiempos de multiplicación para los protozoarios varían de 5-14 horas, coincidiendo con los tiempos de concentraciones en el PCRE las máximas poblaciones se presentaron a las 12 horas al 66% y a las 18 horas con el 33%, por su parte [Jouany \(1994\)](#) y [Williams & Coleman \(2012\)](#) encontraron que varias especies de protozoarios ruminales poseen alfa amilasa y uno de los que presentan mayor actividad amilolítica de este tipo es el *Entodinium caudatum*, así mismo, [Mould & Thomas \(1958\)](#) y [Arcos-García et al., \(2007\)](#), encontraron alfa y beta amilasa en protozoarios holotricos que promueven el desdoblamiento de las unidades de azúcar de reserva y estructurales de las plantas

En la parte nutricional los probióticos y las enterobacterias compiten por los aminoácidos esenciales y azúcares, reducen la producción de aminos tóxicas, esto es remediado con los *Lactobacillus acidófilos* importante al estado de salud del animal ([Castillo-Lopez et al.,](#)



2013). La densidad bacteriana en el rumen 10^7 y 10^{10} células de líquido ruminal, los filos de bacteroides más abundantes incluyen el 75% de la población bacteriana total (Castillo-Lopez & Domínguez-Ordóñez, 2019).

Los probióticos no comerciales (PNC) puede ser una alternativa para complementar la dieta de ovinos en crecimiento, es necesario indicar que los PNC en ovinos pudieran ser usados para optimizar la producción en la dieta integral de los animales, sin causar impacto negativo sobre la ecología lo que pueden lograr a través del suministro directo de PNC y PCRE.

Respecto a las concentraciones de ADN registradas para el tratamiento testigo, se obtuvo una concentración promedio de 58.36 ng/μL teniendo como mínimo un valor de 28 ng/μL y un valor de 100 ng/μL. En el cuadro 9 se observa cada una de las concentraciones obtenidas, así como la relación 260/280, que indica que la pureza del ADN es adecuada para protocolos de PCR.

En los ovinos suplementados con PNC se obtuvo ADN genómico en las siguientes concentraciones promedio 77.6 ng/μL, 69.7 ng/μL y 70.18 ng/μL, en los tratamientos de 100%, 66% y 33% respectivamente (Cuadro 9). Las concentraciones de ADN obtenido de microorganismos del líquido ruminal de ovinos suplementados con PCRE con los siguientes promedios: en 100% 46.81 ng/mL, en 66% de 46.09 ng/mL y en 33% de 36.36 ng/mL.

Cuadro 9. Concentraciones de ADN de muestras en diferentes tratamientos

Muestreo	Testigo	PNC	PNC	PNC	PCRE	PCRE	PCRE	
		100%	66%	33%	100%	66%	33%	
Concentración (ng/mL)								
M1 (0 Días)	48	----	-----	72	103	65	52	
M2 (30 Días)	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 Días)	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 Días)	42	61	69	69	39	45	34	

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

La diversidad de bacterias totales en el rumen es importante durante la degradación del alimento y fermentación, ya que esto permite tener una amplia variedad de enzimas, así como reacciones bioquímicas precisas que ayuden a hidrolizar el material vegetal a estructuras más simples y puedan tener mayor disponibilidad para los microorganismos y aumentar los productos de fermentación (López *et al.*, 2020).



Con respecto a las bacterias totales, la banda de amplificación por PCR corresponde a 130 pb, lográndose identificar esta banda característica en el gel testigo, el cual corresponde a la figura 1 (A). De acuerdo con estos resultados se puede mencionar que el probiótico con mejor efecto de adaptación de las bacterias totales fue el PNC, ya que este permitió que la microbiota de bacterias continuará creciendo en el rumen y por lo tanto, no afectará la degradación del alimento y fermentación ruminal.

Las bacterias del rumen participan en la degradación de celulosa, esta especie presenta más de 100 secuencias que codifican para enzimas que degradan polisacáridos (Morrison *et al.*, 2003; Jun *et al.*, 2007; Firkins, 2021), la mayoría son responsables de la degradación de sustratos celulosos, además estas bacterias degradan xilano, hemicelulosa y los monosacáridos de las paredes de las plantas (Mirón, 1991; Hobson & Stewart, 2012).

Se demostró que el PCRE tiene un efecto inhibitorio sobre *Fibrobacter succinogenes* en una concentración de 100%, ya que no se observa la banda específica para el oligonucleótido (121 pb) en comparación con el testigo como se observa en la figura 1 (H), sin embargo, para las concentraciones de 66 y 33% esta banda si está presente (Figura 1, J, K).

Los hongos anaerobios ruminales desempeñan un papel estratégico en la digestión de alimentos fibrosos, ya que presentan una gran habilidad para colonizar paredes de celulosa lignificada y para debilitar los tejidos fibrosos de las plantas, así como la degradación de los componentes estructurales de su pared celular (Galindo *et al.*, 2017). Para los hongos anaerobios (120 pb), estos no se vieron afectados con la suplementación del probiótico en ninguna de sus concentraciones (Figura 1, P, Q, R, S, T, U).

El efecto de los probióticos parece estar relacionado con los mecanismos y procesos metabólicos llevados a cabo por los microorganismos que participan en la fermentación ruminal y formación de metano, Rodríguez *et al.* (2013) plantean que son muchas las bacterias y levaduras que se pueden usar de forma benéfica para mantener una flora digestiva sana y en equilibrio. Los microorganismos más usados son *Lactobacillus sp.*, *Sreptococcus faeccium*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. stearothermophyllus* y *S. cerevisiae*.

Los *Lactobacillus* crecen rápidamente en el intestino, son quizá los más conocidos, se trata de bacterias que pueden transformar la lactosa en ácido láctico. Este aumento de ácido láctico disminuye el pH intestinal, lo cual afecta la supervivencia de microorganismos no benéficos para la flora ruminal, patógenos, entre otros.

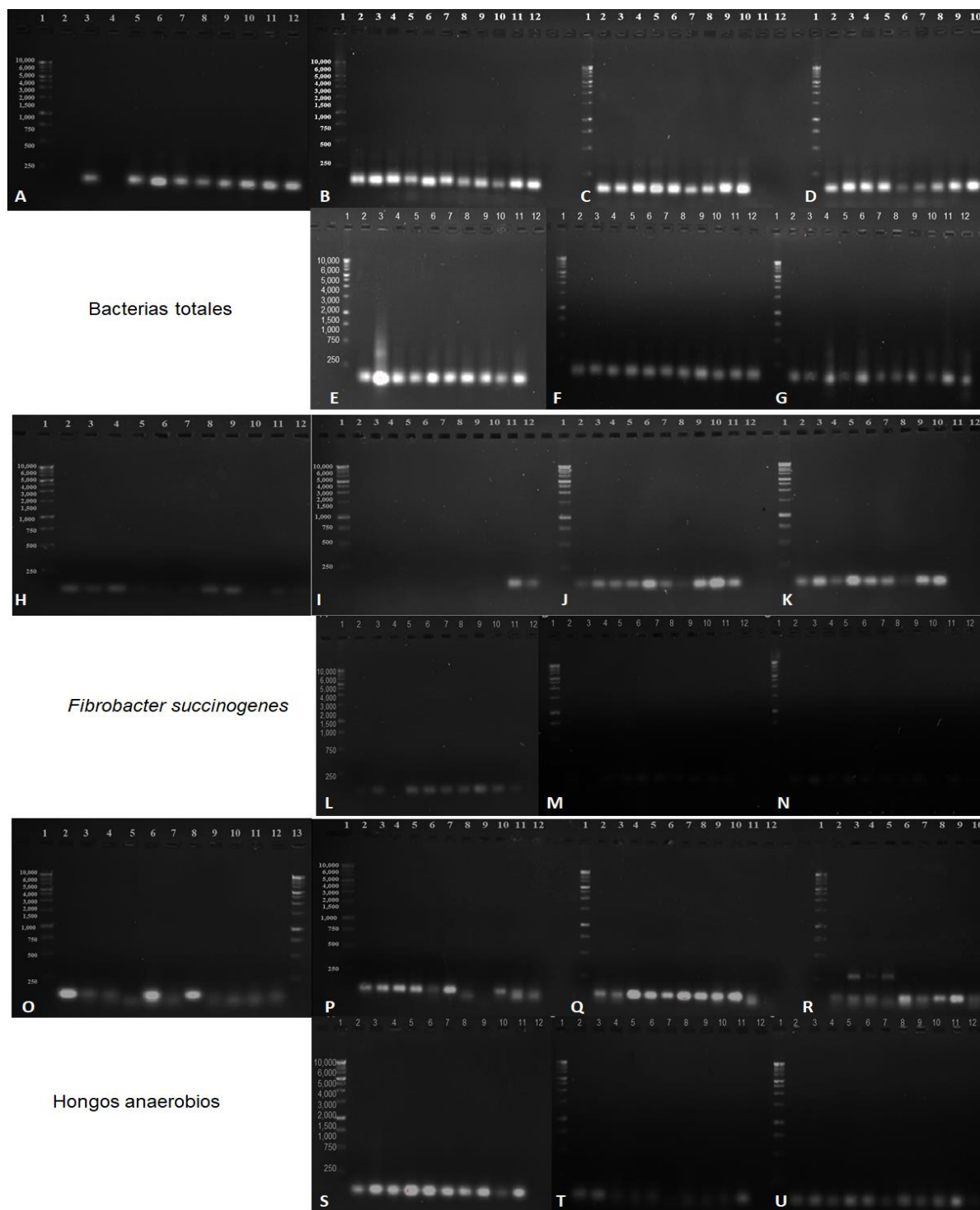


Figura 1. Amplificación de banda por PCR. Carril 1, Marcador de peso molecular (250 a 10,000 pb); rango del MP Carril 2, M1 (0 días); Carril 3, M2 (30 días); Carril 4 al 11, M3 (60 días -6, 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48 h-); Carril 12, M4 (110 días). Bacterias totales (A, B, C, D, E, F, G), *Fibrobacter succinogenes* (H, I, J, K, L, M, N) y hongos anaerobios (O, P, Q, R, S, T, U) en cada uno de los tratamientos (Testigo, 100%, 66% y 33%) con probiótico comercial (PCRE) y probiótico no comercial (PNC).



CONCLUSIONES

El probiótico no comercial puede ser una alternativa para complementar la dieta de los ovinos en crecimiento en la región del cañón de Juchipila, Zacatecas, México, por generar un incremento de bacterias y protozoarios. Los probióticos son un aditivo que se puede utilizar con éxito ya que no modificó la población de bacterias totales y hongos anaerobios en el rumen.

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>