

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
Instituto de Ciencias Agrícolas
Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias



**“PREBIÓTICOS Y PROBIÓTICOS COMO
MODULADORES DE LA FERMENTACION RUMINAL”**

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTA

JOSE DE JESUS ORTIZ GULUARTE

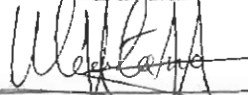
Director de Tesis

Dr. Martin Francisco Montaña Gómez

La presente tesis "Prebióticos y Probióticos como Moduladores de la Fermentación Ruminal" realizada por el C. José de Jesús Ortiz Guluarte, dirigido por el Dr. Martín Francisco Montaña Gómez, ha sido evaluada y aprobada por el comité particular abajo indicado, como requisito parcial para obtener el grado de:

Doctor en Ciencias Agropecuarias

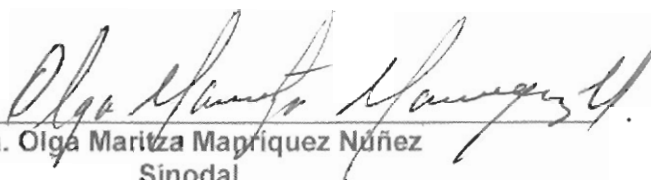
Comité Particular



Dr. Martín Francisco Montaña Gómez
Director de Tesis



Dr. Miguel Mellado Bosque
Co-Director de Tesis



Dra. Olga Maritza Mapriquez Nuñez
Sinodal



Dr. Juan Octavio Chirino Romero
Sinodal



Dr. Tomás Benjamín Rentería Evangelista
Sinodal

AGRADECIMIENTO

A mi director de tesis Dr. Martín Francisco Montaña Gómez por su valiosa ayuda y orientación brindada durante el programa de doctorado. Agradezco por depositar su confianza en mí y por su gran apoyo durante toda esta etapa en mi proyección tanto personal como profesional.

A la Dra. Olga Maritza Manríquez Núñez parte vital de mi éxito y desarrollo como profesional. Por su valioso consejo y orientación cuando más lo necesite, por sus palabras de motivación y todo su tiempo dedicado en mi formación.

Al PhD Trevor Alexander y al Lethbridge Research and Development Centre que depositaron su confianza en mí y me dieron la oportunidad de desarrollar este experimento y pertenecer a su equipo.

Al PhD Long Jin que estuvo a mi lado y a todas horas guiándome durante este experimento y sin ningún celo me compartió todo su conocimiento.

Agradezco a la Universidad Autónoma de Baja California por la valiosa oportunidad de prepararme y obtener el grado de Doctorado en Ciencias Veterinarias.

A mi Comité de Tesis, por su invaluable apoyo y asesoría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por su apoyo fundamental para la correcta finalización de mi formación.

DEDICATORIA

A mi padre que siempre está conmigo, a mi madre que motiva y llena mi corazón de fe en mí, a mis hermanas que parecen creer más en mí que yo mismo, a Aline, la familia que yo escogí y que incondicionalmente esta cada día a mi lado en este camino. Sepan que no soy otra cosa que la suma de los sacrificios, el apoyo, la fe y el amor que todos ustedes han puesto en mí, sepan que cada éxito no es solo mío sino de ustedes.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTO	i
DEDICATORIA	ii
RESUMEN	8
ABSTRACT	10
CONTENIDO	1
LISTA DE CUADROS	4
LISTA DE FIGURAS	5
INTRODUCCIÓN	8
HIPÓTESIS	3
OBJETIVO GENERAL	4
REVISIÓN DE LITERATURA	15
Prebióticos	15
<i>Mecanismos de acción producidos por detección de AGCC</i>	17
Inhibición de histona deacetilasa (HDACs)	17
Activación de los receptores acoplados a proteína G	18
<i>Absorción de minerales</i>	19
Probióticos	19
<i>Lactobacillus</i>	20
<i>Bifidobacteria</i>	21
<i>Propionibacteria</i>	22
<i>Levaduras</i>	22
Efecto en el microbioma del TGI	25
JUSTIFICACIÓN	2
MATERIALES Y MÉTODOS	5

Experimento <i>in vitro</i>	5
<i>Localización del estudio</i>	5
<i>Cultivo por lote</i>	5
<i>Fermentación in vitro</i>	5
<i>Aislamiento de ADN</i>	6
<i>Cuantificación de ADN y PCR</i>	10
Espectrofotometría:.....	10
Fluorespectrofotometría:.....	10
<i>Análisis de datos de secuenciación</i>	11
<i>Análisis estadístico</i>	11
Experimento <i>In vivo</i>	12
<i>Localización del estudio</i>	12
<i>Unidad experimental</i>	12
<i>Dietas</i>	12
<i>Asignación de tratamientos</i>	14
<i>Alimentación</i>	14
<i>Duración del experimento</i>	14
<i>Fermentación ruminal</i>	14
Nitrógeno amoniacal:.....	15
<i>Metagenómica</i>	16
<i>Digestibilidad</i>	16
Materia seca analítica:.....	17
Materia orgánica:.....	17
Almidón:.....	18
Fibra detergente neutra.....	20
Fibra ácido detergente.....	21
Nitrógeno.....	22
<i>Análisis estadístico</i>	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
<i>Fermentación ruminal y fecal in vitro</i>	50
<i>Composición taxonómica de bacterias ruminales</i>	59

<i>Composición taxonómica de comunidades bacterianas fecales.....</i>	60
Fermentación ruminal <i>in vivo</i>	77
<i>Digestibilidad aparente</i>	79
Composición taxonómica de comunidades bacterianas ruminales in vivo	80
Composición taxonómica de comunidades bacterianas fecales in vivo	81
CONCLUSIÓN.....	94
LITERATURA CITADA	97
ANEXO	107
1. Confidencialidad y propiedad intelectual.	107
2. University Research Participant Agreement.....	107
3. Artículo 1	107
4. Artículo 2	107

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Título	Pág
1	Composición nutricional de dietas experimentales utilizadas	40
2	Efecto de 3 diferentes fuentes de manana sobre los patrones de fermentación ruminal tras la incubación in vitro en diferentes puntos de tiempo	53
3	Efecto de 3 diferentes fuentes de manana sobre los patrones de fermentación fecal tras la incubación in vitro en diferentes puntos de tiempo	54
4	Influencia de dos fuentes diferentes de Manana en las características de digestibilidad total en ovinos Arcott x Arcott canadiense.	82
5-6	Influencia de dos fuentes diferentes de Manana en las características de fermentación ruminal en ovinos Arcott x Arcott canadiense	83-84

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Pág.
1-4	Efectos de tres diferentes fuentes de Manana sobre patrones de fermentación ruminal y fecal <i>in vitro</i>	55-58
5	Análisis de coordenadas principales (weighted) de microbiota de cultivo ruminal <i>in vitro</i>	67
6	Análisis de coordenadas principales (weighted) de microbiota de cultivo fecal <i>in vitro</i>	68
7	Efecto de 3 diferentes fuentes de manana sobre abundancia del phylum de bacterias ruminales a las (A) 4 y (B) 24 horas de incubación.	69
8-9	Efecto de 3 diferentes fuentes de manana sobre abundancia del género de bacterias ruminales a las 24 horas de incubación	70
10	Efecto de 3 diferentes fuentes de manana sobre abundancia del phylum de bacterias fecales a las (A) 4 y (B) 24 horas de incubación	71
11	Efecto de 3 diferentes fuentes de manana sobre abundancia del género de bacterias ruminales a las 4 horas de incubación.	72
12	Efecto de 3 diferentes fuentes de manana sobre abundancia del género de bacterias ruminales a las 24 horas de incubación	73
13	Mapa térmico de microbiota de cultivo ruminal <i>in vitro</i> después de 4 horas de fermentación. Inoculante ruminal	74
14	Mapa térmico de microbiota de cultivo ruminal <i>in vitro</i> después de 24h de fermentación	75

15	Mapa térmico de microbiota de cultivo fecal <i>in vitro</i> después de 4 horas de fermentación	76
16	Mapa térmico de microbiota de cultivo fecal <i>in vitro</i> después de 24 horas de fermentación	77
17	Efectos de dos diferentes fuentes de Manana sobre la producción de (A) Acetato y (B) Propionato a las 0,3,6,9 y 12 horas	85
18	Efectos de dos diferentes fuentes de Manana sobre la producción de (A) Butirato y (B) relación acetato/propionato a las 0,3,6,9 y 12 horas	86
19	Efectos de dos diferentes fuentes de Manana sobre la producción de (A) ácido valérico y (B) ácido caproico a las 0,3,6,9 y 12 horas	87
20	Efectos de dos diferentes fuentes de Manana sobre la producción de (A) gases Iso y (B) nitrógeno amoniacal a las 0,3,6,9 y 12 horas.	88
21	Efecto de dos diferentes fuentes de Manana sobre producción de metano a las 0,3,6,9 y 12 horas.	89
22	Efecto de dos diferentes fuentes de Manana sobre digestibilidad de materia seca (MS)(A), materia orgánica (MO)(A), fibra detergente neutra (FDN)(B) y fibra detergente acida (FDA)(B)	90
23	Efecto de dos diferentes fuentes de Manana sobre digestibilidad de nitrógeno (N) y almidón	91
24	Análisis de coordenadas principales (weighted) de microbiota ruminal, efecto por tiempo (A) y tratamiento (C). Muestra obtenida de corderos canulados del rumen a las 0,3,6,9 y 12 horas durante dos días. Análisis de coordenadas principales (weighted) de microbiota intestinal, efecto por tiempo (B) y tratamiento (D).	92

25	Efecto de 2 diferentes fuentes de manana sobre abundancia del género de bacterias ruminales. Muestra obtenida de corderos canulados del rumen a las 0, 3, 6, 9 y 12 horas durante dos días.	93
26	Efecto de 2 diferentes fuentes de manana sobre abundancia del género de bacterias intestinales. Muestra obtenida de corderos de forma directa a las 0, 3, 6, 9 y 12 horas durante dos días.	94

RESUMEN: Se realizaron dos estudios para evaluar el efecto de manana en el microbioma gastrointestinal del rumiante. EXPERIMENTO 1.- Se realizó un estudio *in vitro* de cultivo por lote. Los tratamientos aplicados como única fuente de energía disponible para la utilización bacteriana fueron 1) Control (C) sin ningún aditivo, 2) Granos secos de destilería más solubles (DG), 3) Bio-Mos 1% M/V (BM), 4) Manana puro 1% M/V (M). Todos los lotes fueron preparados en una solución 2:1 buffer y fluido ruminal y 10% W/V de heces de un novillo Angus previamente canulado del rumen. Las muestras se analizaron por triplicado en un diseño completamente al azar. Los frascos fueron sellados e incubados a 39°C en un mezclador rotatorio por 0, 2, 4, 8, 12 y 24 horas. Se encontraron efectos significativos en todos los patrones de fermentación ruminal y postruminal. La inclusión de manana puro como fuente de carbón elevó sustancialmente el propionato y disminuyó ($P < 0.05$) el acetato y nitrógeno amoniacal de los viales, causó un cambio marcado en el microbioma de las muestra favoreciendo el crecimiento de *Bacteroidetes*, disminuyendo la abundancia de *Firmicutes* en el rumen y de forma inversa en heces. EXPERIMENTO 2.- Se utilizaron 6 corderos Rideau Arcott x Canadian Arcott (54.2 ± 2.2 kg PV) en 6 corraletas individuales en un diseño de cuadrado latino replicado 3x3 para evaluar el efecto la inclusión de BioMos® y DDGs como fuente de mananoligosacáridos sobre los patrones de fermentación ruminal, digestibilidad aparente y microbioma gastrointestinal. Los 3 tratamientos consistieron en: C) Control, sin adición de mananoligosacáridos. BM) Bio-Mos®, 4.5 gr/kg MS de Bio-Mos®. DG) Granos secos de destilería más solubles de maíz como control positivo 31.4 g/kg MS. No se observaron efectos en la producción de acetato, propionato, butirato, metano o nitrógeno amoniacal ($P > 0.05$). Se observaron efectos significativos en la producción de gases Iso ($P < 0.05$) donde BM incrementó significativamente los niveles a las 0, 3 y 6 horas *postprandial*. No se observaron efectos ($P > 0.05$) en digestibilidad aparente de FDN, FDA, MS o MO. Se observaron efectos significativos en la digestibilidad aparente de nitrógeno y una tendencia en la digestibilidad de almidón. La

inclusión de BM en la dieta disminuyó la digestibilidad aparente de nitrógeno 6.89% en comparación al grupo C y tendió a disminuir la digestibilidad aparente de almidón 0.20%. Se observó un cambio en la diversidad de la microbioma ruminal y postruminal donde el uso de BM disminuyó en el rumen la abundancia de *Bacteroidetes*, *Corinebacteria* y *Methanobacter* mientras que elevó la abundancia de *Clostridia* y *Actinobacteria* y en heces aumentó la presencia de *Actinobacteria* y *Bacteroidetes* y disminuyó *Spirochaete*. Se concluyó que las bacterias capaces de utilizar manana como fuente de energía pertenecen principalmente al phylum *Bacteroides* y utilizan nitrógeno amoniacal del medio como fuente de nitrógeno, estas bacterias pueden tardar más de 4 horas en expresar genes para la producción de mannanasas o manosidades en su superficie. Dietas altas en concentrado limitan la presencia de bacterias utilizadoras de hemicelulosas y los beneficios de la utilización de manana para efectos de digestibilidad y fermentación ruminal se ven afectados.

Palabras Clave: Manana, Mananoligosacáridos, Probióticos, Prebióticos, Microbioma ruminal, Ovinos.

ABSTRACT: Two studies were conducted to evaluate the effect of mannan in the gastrointestinal microbiome of ruminants. EXPERIMENT 1.- An *in vitro* batch culture study was carried out. The treatments were the use of the following only energy source available for bacteria: 1) (C) Control without any additive, 2) (DG) dry distiller grain plus solubles, 3) (BM) Bio-Mos 1% M / V, 4) (M) pure mannan 1% M / V. All batches were prepared in a 2: 1 buffer and ruminal fluid solution and 10% W / V feces of previously rumen-cannulated Angus steer. The samples were analyzed in triplicate in a completely randomized design. The bottles were sealed and incubated at 39° C in a rotary mixer for 0, 2, 4, 8, 12 and 24 h. Significant effects were found in all rumen and post-rumen fermentation patterns. The inclusion of pure mannan as a source of carbon raised markedly the molar proportion of propionate and decreased acetate and ammonia in vials ($P < 0.05$), caused a marked change in the sample microbiome favoring especially the growth of Bacteroidetes and decreasing the abundance of *Firmicutes* in Rumen and inversely in feces. EXPERIMENT 2.- Six cannulated Rideau Arcott x Canadian Arcott lambs (54.2 ± 2.2 kg PV) in 6 individual pens in a 3x3 replicated Latin square design were used to evaluate the effect of the inclusion of BioMos® and DDGs as source of mannoooligosaccharides on the patterns of ruminal fermentation, apparent digestibility and gastrointestinal microbiome. The 3 treatments consisted of: C) Control, without the addition of mannoooligosaccharides. BM) Bio-Mos®, 4.5 gr / kg MS of Bio-Mos®. DG) corn dry distillery plus solubles as positive control 31.4 g/kg MS. No effects ($P > 0.05$) were observed in the production of acetate, propionate, butyrate, methane or ammonia. Significant effects were observed in the production of Iso gases ($P < .05$) where BM significantly increased the levels at 0, 3 and 6 hours postprandial. No effect on apparent digestibility of NDF, FDA, MS or MO was observed ($P > 0.05$). Significant effects were observed in the apparent nitrogen digestibility and a tendency in the digestibility of starch. The inclusion of BM in the diet decreased the apparent digestibility of nitrogen 6.89% compared to

group C and tended to decrease the apparent digestibility of 0.20% starch. A change in the diversity of the ruminal and post-cordial microbiome was observed where the use of BM decreased the abundance of *Bacteroidetes*, *Corinebacteria* and *Methanobacter* in rumen while increasing the abundance of Clostridia and *Actinobacteria* and in feces increased the abundance of *Actinobacteria* and *Bacteroidetes* and decreased *Spirochaete*. It was concluded that bacteria capable of using mannan as an energy source belong mainly to the phylum *Bacteroidetes* and use ammonia from the medium as a nitrogen source, these bacteria can take more than 4 hours to express genes to produce mannanases or mannosidases on its surface. High concentrate diets can limit the presence of hemicellulose using bacteria, therefore the benefits of using mannan for digestibility and ruminal fermentation effects can be affected.

Key words: Mannan, Mannooligosaccharides, Probiotics, Prebiotics, Sheep, BioMos®, Ruminal microbiome.

INTRODUCCIÓN

Los rumiantes representan un alto porcentaje de los de los animales domésticos a nivel mundial y entre los animales utilizados para la producción, son los mejores adaptados para la digestión de sustratos no aprovechables por el hombre, como las paredes celulares de las plantas. La lignocelulosa será siempre importante en el metabolismo ruminal, incluso en sistemas intensivos donde es incluida para mantener el medio ruminal saludable y reducir costos de producción. Más del 50% del carbón global es fijado por las plantas a través de la fotosíntesis lo que vuelve a los componentes celulares de las plantas la fuente más importante de carbón y energía renovable. Con la creciente población mundial, los sistemas productivos de alimento enfrentan cada vez mayores retos tanto financieros como logísticos lo que ha impulsado constantemente una línea de investigación para maximizar la eficiencia de estos sistemas. Ahora ya no es sólo necesario tomar en cuenta el factor de eficiencia económica sino también factores medio ambientales y de salud pública como la producción de metano, fijación de carbono medio ambiental, resistencia a antibióticos etc. La importancia de estos últimos en el impacto global actual ha llevado a desarrollar líneas de investigación especializadas en buscar soluciones a estos problemas, ya sea tratando de reducir las emisiones de gases, maximizando el uso de recursos naturales o buscando alternativas a los antibióticos utilizados en la industria cárnica.

Los avances en metagenómica han permitido ir más allá en la comprensión del microbioma en el tracto gastrointestinal del rumiante permitiendo identificar microorganismos que antes del 2000 era virtualmente imposible debido a la dificultad de los métodos de cultivo para su identificación. Las nuevas técnicas de clonación y secuenciación y el aumento en su aplicación para diferentes áreas han provocado una disminución considerable en los precios a través de los años. Ahora es posible, gracias a las técnicas

como ILUMINA que se basa en la secuenciación e identificación del gen 16S ribosomal bacteriano, identificar un gran número de microorganismo anaerobios antes imposibles de aislar, esto ha permitido una mayor comprensión del microcosmo que es el tracto gastrointestinal del rumiante. Con estas nuevas herramientas y obtención masiva de nuevos datos sobre el microbioma ruminal es posible desarrollar y buscar nuevas técnicas y alternativas para maximizar la utilización de nutrientes como carbohidratos estructurales, reducir la emisión de gases invernadero y la pérdida de energía que representan éstos, prevenir enfermedades gastrointestinales que representan un elevado porcentaje de los problemas que se presentan en la producción animal, además de mejorar la inmunidad del animal para un mejor estado de salud y calidad de vida que se refleja en una producción más alta y eficiente.

El uso de mananoligosacáridos ha sido utilizado por muchos años en la producción avícola y porcina con buenos resultados. En los últimos años se ha visto el aumento de su uso en la industria lechera como un promotor de salud y un preventivo para problemas gástricos. Estudios recientes han demostrado como la adición de manana en la dieta de vacas lecheras ha aumentado su producción y reducido la incidencia de problemas de salud relacionados a disturbios gástricos. De igual forma en becerros lactantes y en destete, la adición de manana ha aumentado sus niveles sanguíneos de inmunoglobulinas, ganancia diaria de peso, consumo, eficiencia y ha disminuido el porcentaje de mortalidad relacionado con coliformes y salmonella. La comprensión de como los mananoligosacáridos afectan el microbioma ruminal sería de gran utilidad para poder establecer y maximizar un protocolo para su utilización en animales de producción cárnica, tanto para maximizar su producción como para reducir el uso de antibióticos que es tan común en las prácticas de manejo en muchos países. Siendo la resistencia a los antibióticos un problema serio a nivel mundial, muchos países han prohibido su uso en sus sistemas productivos y han girado su atención a la investigación de nuevas opciones para procesos infecciosos. Es entonces el uso de prebióticos y probióticos una prometedora

opción que ha demostrado ya resultados satisfactorios en varios campos productivos y de salud pública.

REVISIÓN DE LITERATURA

Prebióticos

La suplementación de prebióticos resulta en un descenso en el pH debido a un aumento en la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), lo cual a su vez afecta la composición de la microbiota debido a la sensibilidad de algunas especies bacterianas al pH ácido, muchos beneficios de salud dentro y fuera del sistema gastrointestinal se han asociado a esta fermentación modulada. Se ha visto que *Bacteroidetes spp.* son relativamente sensibles a pH medianamente ácido mientras que *Firmicutes* y *Bifidobacterias* son más tolerantes a esta misma condición por lo cual son menos afectados con una disminución del pH (Duncan et al., 2009).

Diferentes fuentes de inulina, oligofruktosa (FOS), arabinoxylan-oligosacáridos, pectina, y otros oligosacáridos que se conocen por sus propiedades prebióticas han sido objeto de investigación en la actualidad. Martínez-Gutiérrez et al. (2017) utilizando *Agave salmiana* e Inulina Orafiti GR como fuente de FOS en un estudio in-vitro observaron un crecimiento más favorable (densidad óptica) del género *Bacillus* utilizando *A. salmiana* y de *L. acidophilus* utilizando inulina Orafiti GR. Sin embargo, *L. casei* mostró una mayor tasa de crecimiento. No se observaron diferencias importantes en la colonización de Bifidobacterias. El cambio de pH se observó principalmente en los medios que contenían cepas de *Lactobacillus* con excepción de aquellos medios que no contenían glucosa, glucosa + inulina o *L. casei*. Siendo los *Lactobacillus* bacterias especializadas en metabolizar carbohidratos y producir ácido láctico, secundariamente producen una disminución en el pH que confiere muchas de sus propiedades como probiótico a nivel intestinal. La ausencia de diferencias en la colonización de bifidobacterias en los medios de glucosa refuerza la idea de que las bifidobacterias prefieren FOS de cadena corta posiblemente por la carencia de β -fructofuranosidasa (Rossi et al., 2005).

Actualmente se ha asociado la presencia de productos nitrogenados residuos del metabolismo proteico a diversos problemas de salud. Mientras que los prebióticos pueden aumentar la actividad sacarolítica estos reducen de forma concomitante la fermentación proteolítica, la cual comienza por la hidrólisis de proteínas y aminoácidos por proteasas y peptidasas bacterianas. Se asume que la proporción de hexosa fermentada a ácido láctico por bacterias productoras de ácido láctico incrementa cuando la tasa de crecimiento específico de estas bacterias aumenta y el pH disminuye (Mills et al., 2014). Debido a una rápida fermentación de los substratos prebióticos, las concentraciones de AGCC aumentan, lo cual causa una reducción en el pH, debido a que la mayoría de las proteasas bacterianas tienen un pH óptimo de neutro a ligeramente alcalino, éstas no funcionan bien a bajos niveles de pH y la descomposición de la proteína se reduce (Rastall, 2004). Otro mecanismo involucrado es el de la represión de catabolitos que implica que la transcripción de genes involucrados en el metabolismo de aminoácidos es silenciada en la presencia de carbohidratos resultando en la inhibición de la desaminación de aminoácidos. Un tercer mecanismo involucra un aumento en la asimilación de proteína y aminoácidos por las bacterias debido a un aumento en sus necesidades para biosíntesis (Cummings y Bingham, 1987).

Solo el efecto de acidificación que producen los prebióticos puede explicar algunos de estos beneficios observados, el aumento en la producción de AGCC dispara dos mecanismos que han sido identificados como importantes. 1.- La inhibición de histona deacetilasa y 2.- La activación de receptores acoplados a proteína G. En adición a esto, los AGCC entran fácilmente en las células por difusión pasiva o por transporte activo y actúan internamente manipulando diferentes sitios en el interior de la célula (Layden et al., 2012).

Mecanismos de acción producidos por detección de AGCC

Inhibición de histona deacetilasa (HDACs)

La expresión genética esta modulada por la modificación epigenética de ADN que involucra dos mecanismos independientes principalmente: metilación de ADN y acetilación de histonas. La acetilación de los residuos de lisina en las histonas resulta en una cromatina menos compacta más fácil de ser transcrita. En contraste, la remoción de grupos acetil por la HDACs resulta en una estructura mucho más densa que resulta en el silencio de expresión genética. Las células de los mamíferos contienen 18 diferentes HDACs las cuales se agrupan en 4 clases (I al IV) (Santini et al., 2007). Los AGCC butirato y propionato son inhibidores de HDACs e inducen hiper-acetilación de histonas que pueden en este sentido afectar la expresión genética. Los inhibidores de HDACs muestran propiedades antiinflamatorias y puede inducir arresto del crecimiento, maduración y apoptosis de células cancerígenas en colon. Se ha observado que el mecanismo por el cual el butirato induce la apoptosis de estas células involucra la cascada de caspasa. Primero, butirato activa proteinkinasa activada por mitógeno p38, la cual en turno aumenta la expresión y actividad del receptor de peroxisoma-proliferador-activado gamma. Este activa caspasa-8 y -9 llevando a un incremento de caspasa-3 que eventualmente resultará en muerte celular (Venema y Carmo, 2015). El receptor de peroxisoma-proliferador-activado gamma controla la expresión de un gran número de genes y juega un papel fundamental en la respuesta inmune debido a su habilidad de inhibir la expresión inflamatoria de citocinas y de dirigir la diferenciación de células inmunes hacia fenotipos antiinflamatorios. La activación entonces de este receptor ha demostrado ser efectiva en la profilaxis, y en menor medida, en el tratamiento de colitis crónica en varios modelos animales (Viladomiu et al., 2013).

Activación de los receptores acoplados a proteína G

Estudios previos (Brown et al., 2003; Nilsson et al., 2003; Le Poul et al., 2003), han identificado los AGCC como ligandos para los receptores acoplados a proteína G GPR43 y GPR41 llamados ahora receptor de ácido graso 2 (FFAR2) y 3 (FFAR3). FFAR2 se encuentra altamente expresado en células inmunes como monocitos y neutrófilos, así como en tejido adiposo, bazo, páncreas y medula ósea. Además, FFAR2 se ha observado en la mucosa del colon humano, especialmente en las células entero-endocrinas L que producen péptido similar al glucagón tipo 1 y péptido YY. Los AGCC parecen tener afinidad por estos receptores, mientras que el acetato activa preferencialmente FFAR2 butirato el cual parece tener afinidad a FFAR3 y el propionato posee una potencia similar para activar FFAR2 y FFAR3.

En ratas tratadas con oligofructosa por 4 semanas se observó que el número de células expresando GLP-1 se duplican en el colon proximal por un aumento en la diferenciación de factores de neurogenina 3 y NeuroD (Cani et al., 2007). En un estudio similar, se demostró que en paralelo con un incremento en las células GLP-1, la densidad de células entero-endocrinas positivas a FFAR2 aumentó en ratas tratadas con oligofructosa, lo que demuestra la co-expresión de FFAR2 y GLP-1 (Kaji y Ryo, 2011). Más recientemente se identificó el receptor de ácido hidrocarboxílico 2 como importante en la respuesta inmune de la mucosa colónica. Este receptor reconoce butirato con una baja afinidad así que se requieren concentraciones milimolares para su activación, en casos de la ocurrencia de cáncer, la expresión de este receptor se encuentra silenciado. La re-expresión de este receptor en células cancerosas inducen apoptosis, pero solo en la presencia de sus ligandos butirato y nicotinato, bajo estas circunstancias GPR109a activado por butirato promueve reacciones antiinflamatorias en los macrófagos colónicos y células dendríticas y las habilita para inducir diferenciación de células T reguladoras y células T productoras de IL-10 (Venema y Carmo, 2015).

Absorción de minerales

EL aumento en la producción de AGCC acidifica el medio intestinal lo que promueve la absorción de minerales, especialmente magnesio y calcio debido a que aumenta su solubilidad. La adición de fructooligosacáridos en la dieta podría también aumentar la longitud de las vellosidades y la profundidad de las criptas que a su vez resultaría en una mayor superficie de absorción en la mucosa.

Probióticos

Mezclas de probióticos han demostrado que son capaces de incrementar la eficiencia de la dieta, ganancias diarias y desempeño en general, tanto en ganado de carne como en ganado de leche (Krehbiel et al., 2003; Seo et al., 2010). Aun así, los mecanismos de acción de como los probióticos causan estos efectos aún son inciertos. Diversos estudios han mostrado que estos beneficios están relacionados con la estimulación de actividad fibrolítica de microorganismos celulolíticos, y un incremento en la densidad poblacional de bacteria ruminal cultivable que se cree aumenta la digestibilidad y la utilización de las fuentes de energía (Newbold et al., 1996; Mosoni et al., 2007; Guedes et al., 2008; Chaucheyras-Durand and Durand, 2010).

Recientemente, varios mecanismos se han propuesto. Algunos estudios indican que algunos probióticos bacterianos pueden promover el crecimiento debido a una mitigación de enfermedades que usualmente causarían retraso en el desarrollo, así como mejorando la habilidad del huésped de digerir las fuentes de energía más eficientemente y aumenta la absorción de la digesta (Krehbiel et al., 2003; Seo et al., 2010). La suplementación diaria con levaduras en ganado de carne puede aumentar las medidas de desempeño como ganancia diaria de peso, consumo de materia seca, eficiencia y peso final (Chaucheyras-Durand y Durand, 2010; Lesmeister et al., 2004). La variabilidad en los resultados observados en consumo de materia seca y desempeño

podrían deberse a la variación en dosis, cepas, prácticas, condiciones ambientales y la especie huésped.

La suplementación de dietas con agentes microbianos en vacas lecheras durante su periodo de transición fue evaluada en un experimento realizado por Nocek y Kautz (2006). En este experimento una combinación de levaduras y *Enterococcus faecium* produjo un ambiente favorable para el incremento de digestibilidad de forraje y consumo de materia seca. Estos resultados concuerdan con los de Li et al. (2017) quienes evaluaron el efecto de *Acremonium terricola* sobre la digestibilidad de vacas lecheras. El consumo de materia seca no se vio afectado pero la digestibilidad aparente de MS y la digestibilidad de proteína cruda aumentó linealmente en respuesta al incremento de *Acremonium terricola*. En este estudio se utilizó una dieta a base de heno de alfalfa y otra a base ensilaje de maíz. La tasa de desaparición de MS no presentó diferencias entre tratamientos o dietas, sin embargo, en la dieta a base de ensilaje de maíz suplementada con probióticos la tasa de desaparición de proteína cruda fue más alta. Una hipótesis es que este microorganismo pudo, entre otros efectos, aumentar la población de protozoarios. Se ha observado que existe una relación entre la digestibilidad de proteína cruda y la población de protozoarios (Faciola y Broderick, 2013). Altos números de protozoarios en novillos puede incrementar la producción de butirato y aumentar el reciclamiento de N bacteriano y así aumentar la producción total de amoníaco. Los niveles de amoníaco óptimos para una digestión eficiente son de 5-25 mg/dL que concuerdan con los observados en este estudio. El uso de este probiótico parece mostrar un mecanismo de acción diferente al de bacterias productoras de ácido láctico o levaduras.

Lactobacillus

A pesar de que éstos se han utilizado por varias décadas, hoy en día difícilmente se conocen los mecanismos moleculares que involucran los efectos

de los probióticos. Principalmente dos cepas han sido estudiadas a fondo *L. rhamnosus* GG y *L. plantarum* WCFS1, así como mutantes de estas mismas cepas. Estos microorganismos pueden ayudar proveyendo un flujo constante de ácido láctico, adaptando el microbioma ruminal general a la acumulación de ácido láctico, estimulando bacterias utilizadoras de ácido láctico y estabilizando el pH ruminal (Seo et al., 2010).

Se ha observado que especialmente las moléculas de superficie son las que juegan un papel crucial en la interacción con el huésped, esta interacción puede ser afectada por la dosis, ruta y frecuencia de administración. Los probióticos pueden actuar directa o indirectamente en el huésped vía modulación de la composición y/o actividad de la microbiota comensal y/o la estimulación del sistema inmune. En general los efectos de los probióticos son similares a los de los prebióticos en que logran cambiar las condiciones del TGI para que sea más favorable para la colonización de bacterias benéficas como *Lactobacilli* y *Bifidobacteria* y menos favorable para microorganismos nocivos. Los probióticos poseen moléculas efectoras presentes en la envoltura celular bacteriana que interactúan con el huésped y ayudan en la funcionalidad probiótica (Venema y Carmo, 2015).

Bifidobacteria

Las bifidobacterias son habitantes naturales del TGI que poseen adaptaciones genéticas que les permiten la colonización del canal digestivo, y estas podrían interferir en los elementos que mantienen la homeostasis del TGI y ayudar a mantenerla. La mayoría de las bifidobacterias han sido aisladas del TGI de animales y humanos, son bacterias sacarolíticas capaces de usar diferentes fuentes de carbón como inulina, oligofructosa, arabinoxylan-oligosacáridos, pectina, oligosacáridos lácteos y mucina gástrica. La capacidad y afinidad de metabolizar estos carbohidratos es específico de la especie y cepa. Las bifidobacterias poseen una gran cantidad y variedad de enzimas

modificadoras de carbohidratos, así como transportadores ABC para facilitar la asimilación y metabolismo de los carbohidratos. La producción de butirato puede verse aumentada con uso de bifidobacterias como probióticos, se ha observado que bifidobacteria provee oligosacáridos y monosacáridos, así como acetato y lactato que sirven como sustrato para degradadores secundarios productores de butirato (Turroni et al., 2018).

Propionibacteria

Luo et al. (2017) evaluaron el efecto *in vitro* de propionibacteria como probiótico. Propionibacteria es un grupo de bacterias nativas de la microflora ruminal que generalmente se encuentran en pocas cantidades bajo condiciones normales caracterizadas por ser utilizadoras de ácido láctico como fuente de carbón principal, teniendo propionato como un producto de eliminación (Koniarova, 1993). Los resultados indicaron que los niveles de ácido láctico en el fluido ruminal se redujeron mientras que los niveles de acetato y propionato aumentaron significativamente con la adición de propionibacteria al medio. Acetato y propionato entonces estarían listos para ser absorbidos a través de la pared ruminal como fuente energética para el huésped (Peters et al., 1990; Pascal 1999). En este estudio la respuesta fue dosis relativa, lo que refuerza la idea de que los probióticos funcionan dependientes de la dosis a diferencia de los prebióticos que parecen funcionar independientemente de los niveles administrados.

Levaduras

Las levaduras tienen la capacidad de ser usadas como prebióticos y probióticos, los efectos parecen ser similares independientemente del uso de levaduras vivas como probióticos o componentes de la pared celular de las levaduras como prebióticos. Pocos estudios existen evaluando los efectos de los componentes de la pared celular sobre el microbioma ruminal o los efectos moleculares que causan (McCann y Loo, 2017).

Los productos más comunes disponibles para el uso en rumiantes son levaduras vivas de *Saccharomyces cerevisiae*, estas levaduras potencialmente podrían reducir los signos de acidosis en ganado lechero siendo este padecimiento uno de los principales responsables en la disminución de la producción de leche en vacas en alta producción. Se ha observado que las levaduras vivas pueden limitar la producción de lactato por *Streptococcus bovis* y favorece la reabsorción de lactato por *Megasphaera elsdenii* o *Selenomonas ruminantium*. *Streptococcus bovis* es conocido por ser uno de los principales productores de ácido láctico en problemas de acidosis por su gran capacidad de fermentar rápidamente carbohidratos solubles y producir ácido láctico (Correidora et al., 2017). Uno de los mecanismos por el cual los probióticos pueden modificar la microbiota es por la producción de bacteriocinas, péptidos producidos por bacterias y que actúan como antibiótico contra algunas bacterias y facilitan la colonización de otras en el TGI (Cotter et al., 2005). Se ha propuesto que alrededor de 30-99% de Bacteria y Archaea producen al menos una bacteriocina (Klaenhammer, 1988; Riley, 1998).

Se ha observado que la habilidad de las levaduras de mejorar la producción de leche y la ganancia de peso en ganado se debe a la estimulación de actividad bacteriana en el rumen. Pinloche et al. (2013) observaron que con la adición de levaduras en la dieta de ganado lechero se produjo una mayor concentración de AGV, un mayor pH ruminal y niveles más bajos de lactato y potencial redox. En este estudio se observó también un cambio en el grupo fibrolítico principal (*Fibrobacter* y *Ruminococcus*) y bacterias productoras de ácido láctico (*Megasphaera* y *Selenomonas*). Se observó que el uso de levaduras cambió la distribución del phylum principal: *Bacteroidetes* disminuyó significativamente mientras que *Firmicutes* incrementó. La ocurrencia de proteobacteria disminuyó significativamente. A nivel género, el uso de levaduras incrementó la ocurrencia relativa de *Megasphaera*, *Ruminococcus*, *Eubacterium*, *Selenomonas* y *Bifidobacterium*. Estos resultados son similares a los observados por Xu et al. (2017) donde a pesar de no encontrar diferencia en

bacteria fecal, a nivel ruminal se observó un aumento significativo en bacterias fermentativas como *Bacteroidetes*, *Roseburia*, *Ruminococcus*, *Clostridium*, *Coprococcus* y *Dorea*, así como de bacterias benéficas como *Faecalibacterium prausnitzii* en vacas lecheras suplementadas con *Lactobacillus casei* Zhang y *Lactobacillus plantarum* P-8. Parte del efecto que causan en promover la regulación de pH y aumentar el metabolismo de ácido láctico puede ser por su capacidad de utilizar oxígeno del medio lo cual puede disminuir el potencial redox, lo que favorece un ambiente anaerobio requerido para una fermentación óptima (Opsit et al., 2012).

Actualmente, la investigación para entender los efectos moleculares causados por el uso de levaduras como probióticos parece estar enfocado en componentes de la pared celular, especialmente sacáridos compuestos por manosa como mananoligosacáridos (MOS). Se observó que en ovejas lactantes el uso de MOS elevó el hematocrito y el conteo total de células rojas y blancas cuando se combinó en un protocolo alimenticio que incluía el uso de paja y ensilaje, es curioso mencionar que mismos niveles de suplementación de MOS, pero en una dieta estricta de paja no tuvo el mismo efecto (Klebaniuk et al., 2008). Efectos en la salud del TGI también han sido observados en conejos de engorda donde se observó que animales suplementados con MOS desarrollaron un aumento en el tamaño de las vellosidades en el íleon además de reducir el conteo de coliformes y *Lactobacillus* en el ciego (Oso et al., 2013). Los efectos en aumento de producción y consumo de materia seca podrían estar ligados a los beneficios discutidos anteriormente del uso de moduladores de fermentación en el microbioma ruminal (disminución de pH, aumento de propionato y acetato, estimulación de bacterias utilizadoras de acetato).

Aunque menos estudiado, se ha probado el uso de levaduras como probióticos en ovinos de engorda. Hady y Teleb (2012) evaluaron el efecto de *Saccharomyces cerevisiae* y glucomannan esterificado en corderos Barki. La suplementación de glucomannan incrementó significativamente tanto globulina

como albumina en sangre comparado con el grupo tratado con *S. cerevisiae* y el grupo control. Esta habilidad inmunomoduladora puede ser atribuida a la habilidad del β -(1-3)-glucan de activar no específicamente el sistema inmune celular y humoral del huésped y de potenciar la funcionalidad de macrófagos, así como su proliferación y la de monocitos.

Efecto en el microbioma del TGI

Actualmente se conoce que el microbioma del TGI juega un papel importante en el almacenamiento, absorción y gasto energético. Actualmente también se ha reconocido su papel importante en la presencia de diferentes enfermedades como alergias, obesidad, diabetes, cáncer, problemas inflamatorios o autoinmunes. La manipulación entonces del microbioma del TGI puede causar efectos benéficos en el estado de salud del huésped lo que en sistemas de producción se traduciría en una mayor eficiencia de producción.

A principios de 1990 el campo de la microbiología comenzó a evolucionar hacia técnicas no dependientes de los cultivos, los científicos entonces ya no estaban limitados a las especies que se podían aislar de una comunidad y que podían ser cultivadas en medios artificiales. Gracias al estudio de ácidos nucleicos con PCR o electroforesis en gel en gradiente y otras técnicas moleculares permitieron la construcción de “bibliotecas” usando plásmidos y vectores para describir los primeros genomas bacterianos. La evolución y avance científico en las técnicas moleculares desde PCR en tiempo real hasta secuenciación masiva de ADN ha creado un avance acelerado en la obtención de información y la construcción de “bibliotecas”. En los últimos años gracias a las técnicas moleculares para el estudio de metagenómica es posible tener un conocimiento mucho más amplio y preciso de una población microbiana, tanto a nivel taxonómico como genómico.

Los efectos positivos sobre la microbiota del TGI se ha observado en diferentes estudios y especies. En peces *Rutilus* (*Rutilus frisii kutum*) se observó cómo la población bacteriana heterotrófica autóctona de bacterias

productoras de ácido láctico fue significativamente más alta (Log CFU g⁻¹) con el uso de prebióticos y probióticos como Vitacel®, Primalac® o xylooligosacáridos comparado con el grupo control (Taheri et al., 2018). El uso de probióticos en rumiantes en la producción animal se ha estudiado principalmente en ganado lechero como una medida para reducir los niveles de ácido láctico y así evitar problemas de acidosis. Se ha observado que la habilidad de las levaduras de mejorar la producción de leche y la ganancia de peso en ganado se debe a la estimulación de actividad bacteriana en el rumen. Pinloche et al. (2013) observaron en respuesta a la adición de levaduras en la dieta de ganado lechero una mayor concentración de AGV, un mayor pH ruminal y niveles más bajos de lactato y potencial redox. En este estudio se observó también un cambio en el grupo fibrolítico principal (*Fibrobacter* y *Ruminococcus*) y bacterias productoras de ácido láctico (*Megasphaera* y *Selenomonas*). Alrededor del 20% de las OTUs fueron compartidas por todos los grupos experimentales, esto muestra una presencia de un fuerte núcleo general de la microbiota. El phylum más abundante fue *Firmicutes* con un promedio de abundancia relativa de 53.8%, el segundo fue *Bacteroidetes* con una abundancia relativa del 35.8%. Se observó que el uso de levaduras cambió la distribución del phylum principal: *Bacteroidetes* disminuyó significativamente mientras que *Firmicutes* incrementó. La ocurrencia de proteobacteria disminuyó significativamente. A nivel género, el uso de levaduras incrementó la ocurrencia relativa de *Megasphaera*, *Ruminococcus*, *Eubacterium*, *Selenomonas* y *Bifidobacterium*. Se observó una tendencia de *Fibrobacter* a incrementar. Hubo una disminución en la abundancia relativa de *Prevotella* y una tendencia de *Syntrophococcus* y *Mitsuokella* a disminuir. Se incrementó significativamente la presencia de *Catenibacterium* y *Sporobacter* y una tendencia de *Acetivibrio* a incrementar. Estos resultados son similares a los observados por Xu et al. (2017) donde a pesar de no encontrar diferencia en bacteria fecal, a nivel ruminal se observó un aumento significativo en bacterias fermentativas como *Bacteroidetes*, *Roseburia*, *Ruminococcus*, *Clostridium*, *Coprococcus* y *Dorea*,

así como de bacterias benéficas como *Faecalibacterium prausnitzii* en vacas lecheras suplementadas con *Lactobacillus casei* Zhang y *Lactobacillus plantarum* P-8. Parte del efecto que causan en promover la regulación de pH y aumentar el metabolismo de ácido láctico puede ser por su capacidad de utilizar oxígeno del medio lo cual puede disminuir el potencial redox lo que favorece un ambiente anaerobio requerido para una fermentación óptima (Opsit et al., 2012).

Diferentes fuentes de inulina, oligofruktosa (FOS), arabinoxilano-oligosacáridos, pectina, y otros oligosacáridos que se conocen por sus propiedades prebióticas han sido objeto de investigación en la actualidad. Martínez-Gutiérrez et al. (2017) utilizando *Agave salmiana* e Inulina Orafit GR como fuente de FOS en un estudio *in-vitro* observaron un crecimiento más favorable (densidad óptica) del género *Bacillus* utilizando *A. salmiana* y de *L. acidophilus* utilizando inulina Orafit GR. Sin embargo, *L. casei* mostró una mayor tasa de crecimiento; no se observaron diferencias importantes en la colonización de *Bifidobacterias*. El cambio de pH se observó principalmente en los medios que contenían cepas de *Lactobacillus* con excepción de aquellos medios que no contenían glucosa, glucosa + inulina o *L. casei*. Siendo los *Lactobacillus* bacterias especializadas en metabolizar carbohidratos y producir ácido láctico secundariamente producen una reducción en el pH que confiere muchas de sus propiedades como probiótico a nivel intestinal. La ausencia de diferencias en la colonización de bifidobacterias en los medios de glucosa refuerza la idea de que las bifidobacterias prefieren FOS de cadena corta posiblemente por la carencia de β -fructofuranosidasa (Rossi et al., 2005).

La utilización de cultivos de levaduras o extractos no parece tener una diferencia. Callaway y Martin (1997) estudiaron el efecto de extractos de levaduras o cultivo de levaduras sobre bacterias utilizadoras de ácido láctico (*S. ruminantium* y *M. elsdenii*) *in vitro*. Además de estimular el crecimiento de estas bacterias, también se observó un cambio en su patrón de fermentación al inocular levaduras en el medio. *S. ruminantium* produce primariamente acetato

y propionato. Con la adición de levaduras al 5% se observó que se incrementó el acetato y AGV totales y el propionato tendió a incrementar, sin embargo, la proporción acetato: propionato no cambió. *M. elsdenii* produce principalmente acetato y propionato y algunas cepas pueden producir cantidades variables de butirato y valerato. Después de la administración de levaduras no produjo cambios importantes en la utilización de ácido láctico de esta bacteria, sin embargo, produjo una disminución en la proporción de acetato: propionato. El estimular bacterias utilizadoras de ácido láctico es uno de los mecanismos más importantes por el cual las levaduras ayudan a mantener una fermentación óptima ruminal en regímenes alimentarios que incluyen concentrados con altos carbohidratos altamente solubles

Qin et al. (2018) observaron que en aves de engorda suplementadas con *S. boulardii* y *B. subtilis* B10 la comunidad bacteriana a lo largo del duodeno, íleon y yeyuno se agrupó en dos clústeres en el grupo control, mientras que en grupo suplementado con *B. subtilis* la comunidad bacteriana del ciego formó un clúster separado del íleon y yeyuno. Los cambios principales se observaron a nivel de género en el duodeno y yeyuno, y se mantuvo sin cambios en el íleon y ciego. La abundancia de *Lactobacillus* en ambos grupos con probióticos fue mucho más alta que en el grupo control; *Clostridium* en el grupo suplementado con *B. subtilis* fue más abundante que en los otros dos grupos. Sin embargo, la abundancia de *Bacteroidetes* y *Oscillospira* fue mayor en el grupo control. El cambio en el microbioma del TGI con la utilización de *Lactobacillus* como probióticos ha mostrado efectos similares en ratones. Angelakis et al. (2012) observaron un aumento significativo en copias ADN de *Lactobacillus spp* y *Firmicutes* a los dos días post-inoculación, sin embargo, este efecto se dejó de observar a los 16 días post-inoculación, *Bacteroidetes* solo mostró una tendencia a disminuir.

JUSTIFICACIÓN

La literatura existente con respecto a los efectos de manana sobre el microbioma ruminal es muy escasa, así como la relacionada con el uso de BioMos® en dietas de ovinos. Los estudios existentes que evalúan el efecto de las levaduras en producción animal muestran una gran variabilidad mayormente causada por la falta de conocimiento acerca de sus mecanismo de acción. Se ha propuesto que el manana en las paredes de las levaduras podría ser uno de los principales componentes involucrados en los efectos benéficos que poseen. Es entonces de importancia evaluar e identificar los microorganismos que están involucrados en la utilización de manana como fuente de energía y observar su relación con los posibles efectos positivos en el desempeño animal. Acorde a nuestro conocimiento este es el primer estudio que evalúa el efecto de manana puro sobre las bacteria ruminales y fecales.

HIPÓTESIS

La inclusión de diferentes fuentes de prebióticos y probióticos puede provocar un cambio marcado en el microbioma ruminal, afectando los patrones de fermentación bacteriana y afectando positivamente los patrones de fermentación, digestión y metabolismo ruminal.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto prebióticos y probióticos como moduladores de la fermentación ruminal.

Objetivos específicos: 1) Determinar las bacterias capaces de utilizar manana como fuente de energía. 2) Determinar si el manana contenido en *Saccharomyces cerevisiae* es altamente utilizable por las bacterias ruminales. 3) Evaluar sus efectos sobre digestibilidad total y patrones de fermentación en un estudio *in vivo*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Experimento *in vitro*

Localización del estudio

El experimento se realizó en las instalaciones de investigación en metagenómica y biotecnología del centro de investigación y desarrollo de *Agriculture and Agri-food Canada* en Lethbridge (*Lethbridge Research and Development Centre*) ubicado al sur de la ciudad de Lethbridge, con ubicación geográfica de 49.70 Latitud Norte y 112.76" Longitud Oeste. El clima es de tipo semi-árido según la clasificación climática de Köppen BSk, donde el mes más frío es enero, con una temperatura mínima promedio de -5.1°C siendo julio el mes más cálido con una temperatura máxima histórica de 38.1 °C. La temperatura media anual es de 6.4 °C.

Cultivo por lote

No se utilizó sustrato tanto para los cultivos ruminales o fecales. Los tratamientos aplicados como única fuente de energía disponible para la utilización bacteriana fueron 1) (C) Control sin ningún aditivo, 2) (DG) granos secos de destilería más solubles, 3) (BM) Bio-Mos 1% M/V, 4) (M) manana puro 1% M/V. Todos los lotes fueron preparados en una solución 2:1 buffer y fluido ruminal y 10% W/V de heces.

Fermentación *in vitro*

Se utilizó un novillo Angus previamente canulado del rumen alimentado con heno de alfalfa. El contenido ruminal fue colectado vía la cánula. Las muestras se tomaron 2 horas después de alimentarse, y éstas consistieron en aproximadamente 1.5 L de fluido ruminal el cual fue filtrando a través de 4 capas de tela de gasa en un matraz al que se le había agregado CO₂ previamente.

El fluido homogenizado se agregó a dos volúmenes de solución buffer previamente temeperizada a 39°C para obtener el *inoculum* de fluido ruminal. Aproximadamente 20 mL de *inoculum* fue agregado en triplicado en frascos para suero de 35 mL conteniendo 1% W/V de cada tratamiento (BM, DDGs y M) o Control. Los frascos fueron sellados e incubados a 39°C en un mezclador rotatorio por 0, 2, 4, 8, 12 y 24 horas. Los frascos obtenidos a la 0-h fueron procesados inmediatamente después la adición del *inoculum*. Para los grupos restantes los frascos en triplicado fueron removidos del mezclador en su tiempo correspondiente y puestos en hielo antes de ser procesados. Las concentraciones de ácidos grasos volátiles se determinaron por medio de cromatografía de gases. Para esto, se centrifugaron las muestras en tubos Falcon de 15 mL a 4C 12000 g x 10 minutos. Una vez centrifugada las muestras, se trasfirieron 1.5 mL de sobrenadante a un tubo de recolección eppendorf de 2 mL adicionado con .3 mL de ácido metafosfórico (250 mg/mL) para ser desproteinizado. La muestra fue después combinada con 0.2 mL de 0.1 M ácido crotónico como estándar interno y fue analizado en un cromatógrafo de líquido y gas Hewlett Packard modelo 6890N (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) con una columna capilar de silicio ZB-FFAP (30 m x 0.32 mm D.I. y 1.0 m grosor del filme; Phenomenex, Torrance, CA, USA) y un detector de flama ionizante. Para la determinación de nitrógeno amoniacal, 1.6 mL del supernadante se combinó con 0.15 mL de 650 g/L de ácido tricloroacético y se analizó por el método de salicilato (Kempers y Zweers, 1986). Los carbohidratos solubles (WSC; equivalente de glucosa) se determinaron por el método de Nelson-Somogyi usando un lector micro-plate Dynatech MRX (Dynatech Laboratories Inc., Chantilli VA, USA) a 630 nm.

Aislamiento de ADN

Se liofilizaron aproximadamente 30 mL del fluido homogenizado de cada tratamiento para la obtención de ADN en un liofilizador por 7 días. Una vez liofilizadas las muestras, estas fueron pulverizadas en un pulverizador de bolas horizontal a una frecuencia de 260/s y t 02:40 minutos.

Se utilizó el kit de aislamiento PowerSoil DNA (Qiagen Inc., Mississauga, ON, Canadá). El procedimiento para el aislamiento fue el siguiente:

1. Se agregaron 0.25 g de muestra dentro de los tubos PowerBead.
 - a. Estos tubos contienen micro cuentas y solución buffer que ayuda a la dispersión de partículas y ayuda a disolver ácidos húmicos mientras protege los ácidos nucleicos de la degradación
2. Una vez agregada la muestra, se mezcló suavemente en un vortex.
 - a. Es aquí donde comienza la dispersión de partículas.
3. Se agregaron 60 μ L de solución C1 y se mezcló de nuevo en un vortex.
4.
 - a. La solución C1 contiene SDS y otros agentes que se requieren para la lisis completa de la célula, además de esta función lítica el SDS es un detergente aniónico que rompe ácidos grasos y lípidos asociados con la membrana celular de la mayoría de los organismos.
5. Se aseguraron los tubos horizontalmente utilizando un adaptador para sujeción de tubos en vortex MO BIO (MO BIO Catalogo # 13000-V1-24) y se mezcló en vortex por 10 minutos a máxima velocidad.
 - a. El movimiento aleatorio de las micro cuentas provoca un choque constante que ayuda a la lisis de las paredes celulares bacterianas mientras las soluciones agregadas previamente provocan una lisis química de los demás componentes.
6. Una vez mezclado en el vortex, los tubos fueron centrifugados a 10,000 x g por 30 segundos a temperatura ambiente.
7. Después se transfirió el supernadante a un tubo limpio de 2 mL para recolección.

- a. Se obtuvieron alrededor de 400-500 μL de supernadante por muestra.
8. Se agregaron 250 μL de solución C2, se mezcló en vortex por 5 segundos y después fue incubado a 4°C por 5 minutos.
 - a. La solución C2 (Inhibitor Removal Technology®) contiene un reactivo para precipitar material orgánico que no contenga ADN como sustancias húmicas, residuos celulares y proteínas.
9. Se centrifugaron los tubos a 10,000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente.
 - a. Durante la centrifugación todo el material libre de ADN comienza a precipitarse formando un pellet sólido.
10. Evitando el pellet, se retiraron 600 μL de supernadante a un tubo limpio de 2 mL para recolección.
11. Se agregaron 200 μL de solución C3, se mezcló en vortex brevemente y se incubó el tubo a 4° C por 5 minutos.
 - a. La solución C3 (Inhibitor Removal Technology®) tiene la misma función que la C2.
12. Se centrifugaron los tubos a 10,000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente.
13. Evitando el pellet se transfirieron no más de 750 μL a un tubo limpio de 2 mL para recolección.
14. Se agregaron 1.2 mL de solución C4 al supernadante y se mezcló en vortex por 5 segundos.
 - a. La solución C4 es una solución salina altamente concentrada, debido a que el ADN se liga fuertemente al sílice y esto permite la purificación y filtrado en el siguiente paso.
15. Se transfirieron 675 μL del supernadante a un filtro de columna, se centrifugó a 10,000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente y el residuo filtrado fue descartado.

- a. Al estar en solución salina, el ADN es ligado a la membrana de sílice del filtro de la columna mientras que todos los contaminantes pasan a través del filtro.
16. Se transfirieron 675 μ L adicionales del supernadante al filtro, se centrifugó a 10,000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente y se descartó de nuevo el residuo filtrado.
 17. Se transfirió el restante de muestra y se repitió el procedimiento de centrifugado.
 18. Se agregaron 500 μ L de solución C5 y se centrifugaron los tubos a 10,000 x g por 30 segundos a temperatura ambiente.
 - a. La solución C5 es una solución para lavado a base de etanol utilizada para lavar y purificar el ADN ligado en la membrana de sílice del filtro de columna. Esta solución remueve la sal residual, ácido húmico y otros contaminantes.
 19. Se descartó el material filtrado dentro del tubo de recolección que contiene todo el material contaminante.
 20. Se centrifugó el filtro de columna a 10,000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente.
 - a. Esto permite eliminar los restos de solución C5 de la membrana de sílice.
 21. Se colocó el filtro de columna en un tubo de recolección limpio de 2 mL.
 22. Se agregaron 100 μ L de solución C6 en el centro de la membrana del filtro.
 - a. La solución C6 (10 mM Tris) es un buffer para elución estéril que se coloca en el centro de la membrana del filtro y resulta en una liberación más eficiente del ADN fijado en el sílice de la membrana. Al pasar por la membrana, la solución C6 arrastrara consigo el ADN que permanecía hasta ese momento ligado al sílice.

23. Se centrifugó a 10,000 x g por 30 segundos a temperatura ambiente.
24. Se elimina el filtro del tubo y todo el material filtrado se encuentra listo para su análisis secuencial.

Cuantificación de ADN y PCR

Se midió la concentración y pureza (260/280) de ADN extraído por medio de espectrofotometría y fluoro-espectrofotometría antes de ser enviado a Genome Quebec (Montreal, Quebec, Canadá), todas las muestras con concentración bajas (< 10 ng/microlitro) fueron sometidos a PCR y observados por electroforesis en gel para confirmar la presencia de ADN.

Espectrofotometría:

Se analizó 1 microlitro de muestra de ADN en un espectrofotómetro. Todas aquellas muestras que presentaron una concentración menor a 10 ng/μL fueron descartadas y se repitió el procedimiento de extracción de ADN de ellas.

Fluoro-espectrofotometría:

Fue necesario medir la concentración de ADN por medio de fluoro-espectrofotometría por requerimiento de la compañía Genome Quebec para secuenciar. El procedimiento fue el siguiente:

1. Se prepara una solución de reactivo PicoGreen dsDNA (1 mL en dimetil sulfoxido) 1:200 del concentrado en 10 mM de Tris-HCl, 1 mM EDTA y a un pH de 7.5 (solución TE)
2. En tubos de fluorescencia de metacrilato de 2 mL se colocan 125 μL de TE, 125 μL de solución de trabajo PicoGreen y 2 μL de ADN de la muestra. Esto logra un factor de dilución de 125.
3. Se colocan 2 μL en el fluoro-espectrofotómetro para ser analizado. Por cada 15 muestras fue analizado un blanco.

Procedimientos de PCR y preparación de bibliotecas fue realizada por la compañía al realizar la secuenciación. Para la detección ADN bacteriano se codifico 16S rADN, para la amplificación el fragmento 390-bp se utilizaron los primers universales forward 515FB (5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3') y reverse 806RB (5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3'). Las condiciones para PCR utilizadas fueron: 94° C por 3 min, 22 ciclos de 94° C por 45 s, 50° C por 60 s, y 72° C por 90 s, seguido de 72° C por 10 min.

El contenido final de todas las reacciones de PCR (25.0 mL) fue: 13.0 µL PCR-grade wáter, 2 X 10.00 µL PCR máster mix, 0.5 µM (10 µM) de cada primer (forward y reverse) y 1.0 µL de ADN modelo (In vitrogen, Burlington, ON, Canadá). Un control negativo sin ADN se incluyó en cada corrida. El procedimiento de PCR se llevó a cabo en un termociclador PTC 100 (M.J. Research Inc., Watertown, MA, USA). Los amplicones etiquetados fueron polarizados con concentraciones equimolares y secuenciados usando el sistema Illumina MiSeq PE250 con el kit reactivo MiSeq v2 2 x 250 (Illumina, Montreal, CA).

Análisis de datos de secuenciación

Las secuencias en bruto fueron sorteadas basado en sus marcadores únicos, recortadas para calidad usando QIIME pipeline versión 1.9.0 (<http://qiime.org/tutorials/tutorial.html>). Un total de 172 892 lecturas libres de quimeras y de alta calidad con una longitud media de 411 bp fueron obtenidas para los subsiguientes análisis. Se utilizó el algoritmo UCHIME para remover las secuencias quiméricas, todas las secuencias se acumularon en unidades taxonómicas operacionales (OTUs) con un umbral de 97% de identidad usando CD-HIT. Los singletons fueron filtrados fuera de los OTUs para análisis siguientes. Para comparar las muestras con diferentes longitudes, cada muestra fue reducida a 8821 lecturas.

Análisis estadístico

EL cambio global en la estructura de la comunidad bacteriana ruminal fue evaluado por análisis de coordenadas principales (PCoA) en UniFrac rápido

(<http://bmf.colorado.edu/fastunifrac/>), mapas de calor e histogramas de barras. Ácidos grasos volátiles y nitrógeno amoniacal para cada tratamiento fue analizado por el procedimiento de modelos mixtos (PROC MIXED de SAS) en un modelo completamente al azar con 4 tratamientos y 3 repeticiones. Los efectos principales de los tratamientos fueron considerados como factor fijo y la repetición fue considerada como aleatorio. Se realizó una comparación múltiple de medias usando LS MEANS con el procedimiento PDIF de SAS.

Experimento *In vivo*

Localización del estudio

El experimento se realizó en las instalaciones de investigación en pequeños rumiantes del centro de investigación y desarrollo de *Agriculture and Agri-food Canada* en Lethbridge (*Lethbridge Research and Development Centre*) ubicado al sur de la ciudad de Lethbridge, con ubicación geográfica de 49.70 Latitud Norte y 112.76" Longitud Oeste. Las instalaciones cuentan con ambiente controlado con una temperatura media de 24° C. El clima es de tipo semi-árido según la clasificación climática de Köppen BSk, donde el mes más frío es enero, con una temperatura mínima promedio de -5.1°C siendo julio el mes más cálido con una temperatura máxima histórica de 38.1 °C. La temperatura media anual es de 6.4° C.

Unidad experimental

Se utilizaron seis ovinos macho Canadian Arcott x Rideau Arcott con un peso promedio de 54.2 kg (+/- 4.29 kg) y 7 meses de edad previamente castrados del rumen y castrados, alojados en 6 corraletas individuales con comedero y bebedero automático individual.

Dietas

Las dietas se presentan en la TABLA 1, se formularon (BMS) en forma de pellet de acuerdo con los requerimientos del NRC (2007). El consumo (BMS) de las dietas fue ad libitum, asegurando un rechazo diario de al menos el 5%

del total ofrecido. Los animales tuvieron acceso libre al agua durante todo el experimento.

TABLA 1.- Composición nutricional de dietas experimentales utilizadas

Ingrediente % MS	T1	T2	T3
	C ^a	BM ^b	DG ^c
Alfalfa	20.2	20.1	18.0
Grano de cebada	69.1	69.1	69.1
Pasta de canola	4.62	4.23	3.59
cDDGs			3.14
Bio-Mos®		0.45	
Cloruro de amonio	0.56	0.56	0.56
Minerales	0.54	0.54	0.54
Dical®	0.67	0.67	0.67
Carbonato de calcio	0.56	0.56	0.56
Melaza deshidratada	2.63	2.63	2.63
Deccox®	0.02	0.02	0.02
Vitamina ADE	0.03	0.03	0.03
Aceite de canola	1.12	1.12	1.12
Composición % MS ^d			
Materia seca	92.7	92.3	92.2
Fibra detergente neutro	34.2	33.9	34.2
Fibra detergente ácido	12.3	12.5	12.1
Proteína cruda	15.9	16.0	16.2
Almidón	40.0	39.7	39.8
Materia orgánica	98.0	98.0	98.0

^a Control. Ningún aditivo se utilizó en esta dieta.

^bBioMos®. Dieta basal con la adición de 4.5 gr/kg MS de Bio-Mos®

^cDDGs. Dieta basal con la adición de 31.4 gr/kg MS de granos secos de destilería más solubles de maíz.

Los tratamientos consistieron en la adición de diferentes fuentes de mananoligosacáridos y un grupo control. C) Control (Animales alimentados con la dieta basal sin la adición de mananoligosacáridos. BM) Bio-Mos® (Animales alimentados con dieta basal con la adición de 4.5 gr/kg MS de Bio-Mos®) y DG) granos secos de destilería más solubles como control positivo (Animales alimentados con dieta basal con la adición de 31.4 gr/kg MS de DDGs). Cada tratamiento fue ofrecido en forma de pellet, las raciones fueron elaboradas en la planta de procesamiento de alimentos del centro de investigación.

Asignación de tratamientos

Cinco días antes de iniciar el experimento, los animales fueron pesados individualmente, desparasitados y asignados de manera aleatoria a 6 corrales (1 animal por corral) y fueron pesados de nuevo en el día 1. Durante los 5 días previos al experimento, los animales recibieron la misma dieta control.

Alimentación

Durante toda la prueba se ofreció alimento fresco una vez al día a las 08:30. El consumo de agua fue *ad-libitum*, los microminerales fueron adicionados en la dieta de acuerdo con los requerimientos establecidos en el NRC (2007). Las raciones fueron pesadas diariamente antes de ser servidas y el rechazo al día siguiente.

Duración del experimento

El periodo experimental duró 63 días, dividido en 3 periodos de 21 días que incluyó el mes de noviembre a enero. La fase de adaptación fue durante los primeros 14 días de cada periodo (1-14 d). En el día 15 y hasta el día 21 los animales fueron puestos en las unidades metabólicas y se les colocó una bolsa colectora de heces. Durante este periodo los animales recibieron el mismo tratamiento que durante la fase de adaptación, los animales fueron regresados al menos dos horas a sus corraletas después de dos días de adaptación en las unidades metabólicas, después se regresaron a las unidades metabólicas para comenzar la toma de muestras por 5 días.

Fermentación ruminal

Para determinar los efectos en pH ruminal, se utilizó un dispositivo residente automatizado para la medición del perfil de pH (LRCpH datalogger). Los dispositivos fueron colocados el día 17 hasta el día 21 de cada periodo (5 días totales) que registró el pH cada minuto. Los sistemas se calibraron con una solución pH 4 y pH 7 antes de colocarlos y después de retirarlos el día 21.

El día 15 y 16 de cada periodo se tomaron muestras de fluido y sólidos ruminales (0.15 L de contenido/muestra/animal) antes de ser alimentados y en intervalos de 3 horas por un periodo de 12 horas (0, 3, 6, 9,12 h) para el análisis de ácidos grasos volátiles y nitrógeno amoniacal. Las muestras fueron filtradas por 4 capas de tela de muselina para retirar sólidos y recolectadas en un tubo Falcon de 50 mL. Las muestras fueron puestas en un contenedor a 4° C en el que fueron transportadas al laboratorio para su procesamiento.

Una vez las muestras en el laboratorio se transfirieron 12 mL a un tubo Falcon de 15 mL para su almacenamiento como respaldo, el resto fue centrifugado a 4° C 12000 g x 10 minutos. Una vez centrifugada la muestra, se transfirió 1.5 mL de sobrenadante a un tubo de recolección eppendorf de 2 mL adicionado con .3 mL de ácido metafosfórico y un tubo de recolección eppendorf de 2 mL adicionado con 0.3 mL de ácido tricloroacético. Una vez colectada las muestras se mezclaron el vortex por 3 segundos y se congelaron a -20° C para su posterior análisis.

Los ácidos grasos volátiles fueron analizados de la misma forma que en el estudio *in vitro*.

Nitrógeno amoniacal:

El procedimiento se realizó en un analizador de flujo segmentado automatizado compuesto por. -

1. Detector digital Astoria Pacific 305D® (Astoria-Pacific Inc. Oregon, USA) con software FASPac2® (Astoria-Pacific Inc. Oregon, USA)
2. Muestreador Astoria Pacific 311® (Astoria-Pacific Inc. Oregon, USA)
3. Colector Technicon II® #170-0108-01 (SEAL Analytical Inc. Wisconsin, USA)
4. Cartucho analítico de NH₃-N (SEAL Analytical Inc. Wisconsin, USA)

5. Bomba Technicon III® # 133-A014-01 (SEAL Analytical Inc. Wisconsin, USA)

La determinación de nitrógeno amoniacal en este procedimiento está basada en el procedimiento descrito por Weatherburn (1967) el cual se calcula con colorimetría en el que un color verde esmeralda (indofenol) es formado por la reacción de amoniaco, salicilato de sodio, nitroprusido sódico e hipoclorito de sodio en un medio alcalino a pH de 12.8-13.0 a $37 \pm 3.0^\circ$ C. Este complejo después es leído a 660 nm.

Metagenómica

El día 16 se tomaron muestras de contenido ruminal a las 0, 3, 6, 9 y 12 horas después de la alimentación y fueron congeladas en nitrógeno líquido al momento de ser colectadas, las muestras de heces fueron colectadas in situ y congeladas de la misma forma. Las muestras fueron colocadas después en un congelador a -80 C por 24 horas y fueron colocadas en un leofilizador por 11 días.

Una vez leofilizadas las muestras, estas fueron pulverizadas en un pulverizador de bolas horizontal a 260 f/s y t 02:40 minutos. Las muestras fueron recolectadas en frascos de 9 cm^3 etiquetados previamente, estas muestras fueron después utilizadas para la extracción de ADN.

Se utilizó el kit de aislamiento *PowerSoil® DNA* (Qiagen Inc., Mississauga, ON, Canada). El procedimiento para extracción fue el mismo utilizado en el estudio in-vitro previo.

Digestibilidad

En el día 17 el consumo fue restringido a 0.90 de consumo *ad libitum* para evitar problemas de rechazo (determinado por los registros de consumo del día 10 al 16 antes de que los animales entraran a las unidades). El consumo restringido comenzó el día 17 y se extendió hasta el día 21. Se les colocó un arnés adaptado para la colección de heces, el análisis se realizó bajo la técnica de recolección total de heces y registro de consumo y rechazo diario (en caso

de ocurrir para determinar digestibilidad total. Estas muestras fueron aleatoriamente seleccionadas para determinación de MS y análisis químicos.

Para la composición de las muestras se colocó diariamente en un horno el 50% de las muestras recolectadas de heces para determinación de MS a 55° C por 72 horas, una vez determinada la MS se submuestreó 50 g de cada muestra obtenida durante los 5 días de recolección total obteniendo finalmente 250 g de heces para análisis por animal. Antes de comenzar en cada periodo la colección total, se tomaron muestras de 250 g de las dietas experimentales para determinación de MS. Las muestras obtenidas al final de cada periodo fueron después molidas en un molino eléctrico Retsch ZM200 (Retsch GmbH, Germany) y pasadas por un filtro de 1 mm para su posterior análisis de laboratorio.

Los análisis de laboratorio que se realizaron fueron para determinación de materia seca analítica (MSA) FDN (fibra detergente neutra), FDA (fibra detergente ácida), MO (materia orgánica), nitrógeno para cálculo de proteína cruda (PC) y almidón.

Materia seca analítica:

Antes de realizar los análisis de laboratorio se determinó la MSA de las muestras. Se pesaron 500 mg de muestra en una báscula analítica Dual Range X5205 (Mettler Toledo OH, EUA) en un crisol de cerámica de 20 mL previamente secados a 105°C por 24 horas. Los crisoles con las muestras se colocaron de nuevo en el horno a 135°C por dos horas y posteriormente fueron pesados en la misma báscula analítica.

Materia orgánica:

Después de la determinación de MS, los crisoles fueron puestos en una mufla a 440°C por 3 horas a incineración para determinación de materia orgánica. Una vez fuera de la mufla, los crisoles fueron puestos en un horno de aire forzado a 105°C por 1 hora y posteriormente fueron pesados en la misma báscula analítica donde se inició el análisis de materia seca.

Almidón:

Se realizó el análisis de almidón de acuerdo con el protocolo estándar operacional 3446.6001.00 del *LeRDC*.

1. Se pesaron 100 mg de muestra de las dietas y 500 mg de muestra de heces en tubos falcón de 50 mL, 24 tubos en dos racks por corrida. El orden de los tubos fue el siguiente:
 - a. 1) B (Blanco, sin muestra)
 - b. 2, 3, 4, 5, 6, 7) STD Dextrosa (0.01 g, 0.02 g, 0.04 g, 0.06 g, 0.08 g, 0.1 g. curva estándar de glucosa)
 - c. 9,10) AM (0.1g de almidón de maíz)
 - d. 11) T (tubos con muestra a analizar, 100 y 500 mg)
2. Se agregaron 25 mL de 0.1 N acetato sódico a temperatura ambiente a cada tubo.
3. Se agregaron 200 μ L de Termamyl® (Alfa-amilasa termolábil) con una pipeta electrónica y puntas de 2.5 ml. Se mezcló en vortex por 5 segundos a velocidad baja para asegurar que la homogeneidad del contenido y que toda la muestra se encontrara en la base y no en las paredes.
4. Se colocaron los tubos en un mezclador a baño María a 140-150 r/min^{-1} 90°C por 60 minutos con espacio entre cada tubo para asegurar que el agua fluyera entre ellos. En este paso se espera que el almidón se gelatinice. Se revisó la temperatura del baño María al principio y al final de cada ronda.
5. Durante la hora del baño María los tubos se mezclaron en vortex a los 10, 20 y 40 minutos.
6. Los tubos fueron removidos después de 60 minutos en el baño María y removiéndoles las tapas fueron enfriados a 60° C (se colocó un termómetro en el tubo blanco para monitorear la temperatura). Es importante que los tubos no bajaran de 55°C ya que la temperatura

no sería suficiente para la degradación enzimática. Se recolocaron las tapas a los tubos y se mezclaron en vortex por 5 segundos.

7. Una vez los tubos a 60° C, rápidamente se agregan 200 UI de Megazyme® (Aminoglucosidasa) a cada tubo con una pipeta electrónica y una punta de 10 mL.
8. Se colocaron los tubos en un mezclador a baño María a 140 r/min⁻¹ y 60°C +/- 2C por 120 minutos y se revisó la temperatura del baño al inicio y al final.
9. Durante los 120 minutos los tubos se mezclaron en vortex a los 30 y 60 minutos.
10. Una vez transcurridos los 120 minutos los tubos fueron removidos del baño y se dejaron enfriar por 5-10 minutos para después ser centrifugados a 29000 g x 15 min.
11. Se retiraron 0.5 mL de supernadante con una pipeta a un tubo de prueba pre-etiquetado (dos tubos de prueba por muestra). A cada tubo se le agregaron 9.5 mL (10 mL total) de agua destilada y se mezcló en vortex por 5 segundos.
12. Se pipetearon 50 µL de cada muestra en cada poso de una placa micro-tituladora y se incubó la placa a temperatura ambiente por 20 min.
13. Se tomaron las lecturas de densidad óptica de las muestras en la placa en un lector a 490 nm (Eppendorf® Microplate Reader)
14. Se calculó la cantidad de almidón en la muestra de acuerdo con la siguiente formula:

$$a. \text{ \% Almidón} = \frac{\text{mg glucosa}}{1.11(\text{peso de la muestra (\% MS)})(\text{mg})} * 100$$

Fibra detergente neutra

Los análisis se realizaron con el sistema analítico ANKOM® A2000 (ANKOM Technology, Macedon NY). Se utilizaron las bolsas de filtrado F57 con el método #13 descrito a continuación. -

1. Se pesó en una báscula analítica 0.45-0.50 g de muestra (1mm) dentro de las bolsas de filtrado. Las bolsas de filtrado están construidas con medios resistentes al calor y son químicamente inertes, son capaz de sellarse con calor y retienen partículas de hasta 25 micrones mientras permiten que la solución penetre.
2. Cada medición incluyó el peso de la bolsa de filtrado, peso de las muestras y peso de la bolsa con muestra. Las bolsas fueron selladas con calor inmediatamente después de ser pesadas.
3. Se colocaron las bolsas en el contenedor un digestor ANKOM²⁰⁰⁰ con agitación a 65 rpm (ANKOM Technology, Macedon NY). El digestor realiza la digestión de fibra a $100 \pm 0.5^\circ$ C y mantiene una presión de 10-25 psi mientras crea un flujo similar entre todas las bolsas que permite una extracción uniforme.
4. El contenedor se llenó con 2 L de solución NDF
 - a. 30 g de docecyl sulfato sódico (USP)
 - b. 18.61g de dehidrato
 - c. 6.81 g de borato sódico
 - d. 4.56 g de fFosfato sódico dibásico (anhídrido)
 - e. 10 mL trietilene glicol
 - f. 1L de agua destilada
 - g. Solución a 6.9 – 7.1 pH
5. Posteriormente se agregaron 20 g de sulfito de sodio (Na_2SO_3) y 4 mL de alfa amilasa bacteriana termoestable con actividad de 17400 unidades liquefon/mL
6. El proceso consta de 70 minutos de lavado en solución detergente, seguido de 3 enjuagues con amilasa y agua. Todo el procedimiento se realiza con agua $>70^\circ\text{C}$.

7. Una vez que el proceso en el digestor, las muestras fueron retiradas del contenedor y colocadas en un vaso de precipitado de 250 mL con suficiente acetona para cubrir las bolsas y se dejaron remojar durante 3-5 minutos.
8. Después de estar en acetona, las muestras se retiraron del vaso de precipitado y se colocaron en una pantalla de alambre dentro de un gabinete de seguridad con extractor y se dejaron secar al aire.
9. Una vez secas al aire, las bolsas se colocaron en un horno a $105 \pm 2^\circ \text{C}$ por 2 horas para su completo secado.
10. Una vez fuera del horno las bolsas se colocaron en una bolsa desecante a la cual se le retiró el aire y se dejaron enfriar a temperatura ambiente.
11. Como último paso, las muestras fueron pesadas en la misma báscula analítica.
12. El cálculo de FDN se realizó de la siguiente forma. -

a. $\% \text{ FDN} = \frac{100 \times [W3 - (W1 \times C1)]}{W2}$ donde. -

- i. W1.- Peso de la bolsa
- ii. W2.- Peso de la muestra
- iii. W3.- Peso de la bolsa con muestra después de la extracción
- iv. C1.- Blanco para corrección (peso promedio dado del peso después del secado en horno dividido entre el peso original del blanco)

Nota.- Se incluyó un blanco por cada corrida en el sistema ANKOM que incluye 23 muestras. Esto fue con la finalidad de rastrear la pérdida de partículas de las bolsas y realizar las correcciones por humedad.

Fibra ácido detergente

Se analizó FAD con el mismo sistema ANKOM mencionado anteriormente. La preparación de las muestras fue igual a las preparadas para FDN y el equipo utilizado fue el mismo.

La composición de la solución utilizada para la extracción de FAD fue:

1. 20 g de Cetyl trietanolamonium bromido (CTAB)
2. 1L de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 1.00N ANKOM®
3. La fórmula utilizada para el cálculo de FDA fue la misma utilizada para FDN.

$$\% \text{ FAD} = \frac{100 \times [W3 - (W1 \times C1)]}{W2}$$

Nitrógeno

Previamente al análisis de nitrógeno las muestras que se colectaron durante la colección total fueron pulverizadas y se determinó por el método de combustión de nitrógeno de Dhumas. El método y preparación de muestras fue el siguiente.

1. Se pesaron 5 mg de heces y alimento, 5 en capsulas metálicas de 8 mm x 5 mm (OEA labs, Callington, UK). Las primeras cinco cápsulas de cada corrida fueron pesadas con 1 mg, 3 mg, 5 mg, 7 mg y 10 mg de nitrógeno como estándar.
2. El contenido de nitrógeno se calculó con la siguiente formula.

a. $\% \text{ N (BMS)} = \frac{\% \text{ N (salido de la columna)} * \text{MS analítica}}{100}$

3. EL cálculo de proteína cruda se realizó con la siguiente formula

a. $\text{PC (BMS)} = \% \text{ N (BMS)} * \text{F donde. -}$

i. $\text{F} = 6.25$

Análisis estadístico

Se determinó normalidad y homogeneidad de varianzas de los datos usando el procedimiento Univariate de SAS (SAS Inst., Inc., Cary, NC). Los datos fueron analizados subsecuentemente usando el procedimiento Mixed de SAS en un diseño de cuadrado latino replicado 3 x 3 con 6 animales y 3

tratamientos. Para todas las variables de interés el animal se consideró la unidad experimental.

Para los análisis de fermentación ruminal y digestibilidad, el modelo incluyó bloque, tratamiento, periodo y el efecto aleatorio del animal. Los datos de fermentación ruminal fueron analizados como medidas repetidas incluyendo los efectos fijos descritos previamente e incluyendo el tiempo de muestreo, siendo el animal el efecto aleatorio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fermentación ruminal y fecal *in vitro*

Los resultados de la fermentación ruminal *in vitro* se presentan en la TABLA 2. Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.001$) en producción total de gas, acumulación de AGVs, acetato, propionato y amoníaco tanto en la fermentación ruminal como en la incubación fecal. Las diferencias se observaron durante todo el periodo experimental.

La producción total de gas ruminal (Fig. 1A) se observó diferente a través del tiempo de experimentación. A pesar de que los cuatro tratamientos difirieron, se pudo observar una similitud numérica entre el tratamiento C y M durante las primeras 12 horas y entre el BM y DG durante el periodo completo de 24 horas. Los tratamientos BM y DG aumentaron los niveles de producción total de gas rápidamente desde las primeras dos horas 412 % y 402 % con respecto al grupo control y 287% y 280% con respecto al grupo M. A las 12 horas las diferencias fueron de 310% y 330% con respecto al grupo control y 195% y 209% con respecto al grupo M. Durante las últimas 12 horas, el tratamiento M elevó considerablemente su producción total de gas casi a los niveles que presentaron los grupos BM y DG. Las diferencias a las 24 horas fueron 403% y 371% con respecto al grupo control y sólo de 35.6% y 26.6% con respecto al grupo M.

Durante las primeras 4 horas de fermentación fecal todos los tratamientos, salvo el grupo C (el cual fue menor), no mostraron diferencias significativas en la producción de gas total (Fig. 1B). A las 8 horas la producción de gas del tratamiento C y M alcanzó su meseta y se mantuvo constante hasta el final de la prueba. El grupo BM y DG no mostraron diferencias significativas entre si durante toda la prueba y tuvieron la mayor producción de gas en comparación al grupo C y M (378% y 181%, respectivamente).

La similitud en el patrón de producción de gas total entre tratamientos se observó también en los demás productos de fermentación. Durante las primeras 12 horas de fermentación ruminal la producción de acetato (Fig. 2A) fue similar entre el tratamiento C y M y la misma similitud numérica se observó entre los grupos BM y DG a pesar de ser diferentes significativamente. A las 2 horas de fermentación los grupos C y M tuvieron una producción de 7.89% y 6.49% más alta que los grupos BM y DG, respectivamente, esta diferencia se mantuvo casi de manera constante hasta las 12 horas. Durante las últimas 12 horas de fermentación la producción de acetato entre el grupo BM y M no presentó diferencias ya que el grupo M registro una reducción drástica en la producción de acetato durante este periodo al igual que el grupo BM a partir de las 8 horas de fermentación, pero de una manera menos marcada. La disminución de acetato del grupo M en las últimas 12 horas fue de 11.78% mientras que la de BM a partir de las 8 horas fue de 4.27%. Al final de las 24 horas el grupo M y BM tuvieron una producción similar de acetato y la disminución total fue de 13.1% y 4.12% con respecto al grupo C y DG, respectivamente.

Durante la incubación fecal tanto los grupos BM y DG, así como C y M no mostraron diferencias significativa a las 2, 8 y 12 horas en la producción de acetato (Fig. 2B). Tal y como se observó previamente, BM y DG se comportaron similarmente, pero diferentes a C y M que se comportaron similarmente entre sí. La producción de acetato fue menor en los grupos DG (52.5%) y BM (54.1%) que en los grupos C (78.0%) y M (73.7%). Todos los grupos disminuyeron su producción de acetato en las últimas 12 horas de incubación.

De manera opuesta y como era de esperarse, los resultados de la producción ruminal de propionato (Fig. 3A) son casi una imagen invertida de la producción de acetato. Los tratamientos fueron diferentes significativamente entre si durante las primeras 12 horas de fermentación, pero como se observó previamente, hubo una similitud numérica entre los grupos C y M y BM y DG. Durante el periodo completo, el grupo DG y BM se comportaron de forma muy similar con una diferencia entre sí que se movió alrededor del 3% no

presentando diferencias entre sí a las 8 horas, en las últimas 12 horas BM mostró un aumento del 5.10% en comparación a DG. A las 2 horas de fermentación los grupos C y M tuvieron una producción de 19.3% y 17.0% menor que los grupos BM y DG, respectivamente, esta diferencia se mantuvo casi de manera constante hasta las 12 horas. Durante las últimas 12 horas de fermentación la producción de propionato del grupo M registró un aumento marcado mientras que los demás grupos se mantuvieron relativamente constantes. El aumento de propionato en las últimas 12 horas del grupo M fue de 42.3% y la diferencia a las 24 horas fue de 50.8%, 23.4% y 19.5% en comparación al grupo C, DG y BM, respectivamente.

La actividad fermentativa y producción de propionato en la incubación fecal (Fig. 3B) de los grupos C y M fue mínima. Durante las primeras 12 horas ambos tratamientos se mantuvieron en una meseta sin actividad en la producción de propionato, después de las 12 horas de incubación el tratamiento M produjo un incremento en la producción de propionato de 27.8% en comparación al grupo C. En las últimas 12 horas se observó también un incremento en la producción de propionato por efecto de los tratamiento BM y DG, donde al final de la prueba el tratamiento DG fue el que produjo la mayor cantidad de propionato en heces (incremento de 165% en comparación al grupo C).

La producción de nitrógeno amoniacal ruminal (Fig. 4A) fue diferente significativamente entre los tratamientos y durante todos los puntos de muestreo. El comportamiento de todos los tratamientos fue similar hasta las primeras 8 horas donde la producción de nitrógeno amoniacal comenzó a descender en el grupo M y a las 12 en el grupo C, mientras que en los grupos BM y DG continuó incrementando. La disminución de nitrógeno amoniacal del grupo M fue de 77.1% después de las 8 horas mientras que en las últimas 12 horas la disminución en el grupo C fue 7.78%. A las 24 horas el tratamiento M había disminuido la producción de nitrógeno amoniacal en 80.2%, 85.7% y 87.8% con respecto al grupo C, DG y BM, respectivamente.

La producción de nitrógeno amoniacal en heces (Fig. 4B) se mantuvo sin cambios en el grupo M y C, mientras que en el grupo BM y DG tuvo un aumento constante durante las primeras 12 horas donde después comenzó a disminuir. Durante las primeras 2 horas todos los tratamientos salvo M se comportaron de forma similar, el grupo M fue el que produjo la menor cantidad de nitrógeno amoniacal en heces durante toda la prueba (27.22% menos que el grupo C).

TABLA 2.- Efecto de 3 diferentes fuentes de manana sobre los patrones de fermentación ruminal tras la incubación in vitro en diferentes puntos de tiempo

Ítem	Fuentes de Energía				SEM	P-Value
	C	DG	BM	M		
GAS Total, ml						
2 h	1.65 ^a	8.29 ^b	8.45 ^c	2.18 ^d	0.69	<0.001
4 h	3.39 ^a	15.1 ^b	14.2 ^c	4.28 ^d	1.06	<0.001
8 h	6.13 ^a	26.1 ^b	23.7 ^c	8.34 ^d	0.72	<0.001
12 h	7.82 ^a	33.7 ^b	32.1 ^c	10.9 ^d	0.38	<0.001
24 h	10.2 ^a	48.0 ^b	51.4 ^c	37.9 ^d	0.12	<0.001
Acetato, %						
2 h	73.8 ^a	69.3 ^b	68.4 ^c	74.1 ^a	0.31	<0.001
4 h	74.3 ^a	68.8 ^b	67.8 ^c	73.9 ^a	0.28	<0.001
8 h	74.1 ^a	68.0 ^b	67.9 ^b	73.9 ^a	0.16	<0.001
12 h	74.4 ^a	68.0 ^b	67.2 ^c	73.8 ^d	0.10	<0.001
24 h	74.8 ^a	67.8 ^b	65.0 ^c	65.1 ^c	0.04	<0.001
Propionato, %						
2 h	15.1 ^a	18.2 ^b	18.7 ^c	15.1 ^a	0.16	<0.001
4 h	14.7 ^a	18.3 ^b	18.8 ^c	15.0 ^d	0.08	<0.001
8 h	14.3 ^a	18.9 ^b	18.8 ^b	14.7 ^c	0.11	<0.001
12 h	13.8 ^a	19.5 ^b	19.7 ^c	14.7 ^d	0.02	<0.001
24 h	12.6 ^a	19.6 ^b	20.6 ^c	25.6 ^d	0.14	<0.001
NH₃-N, mM^c						
2 h	12.7 ^a	13.4 ^b	15.4 ^c	10.8 ^d	0.16	<0.001
4 h	13.0 ^a	13.2 ^a	15.0 ^b	10.7 ^c	0.79	<0.001
8 h	13.8 ^a	14.7 ^b	16.7 ^c	13.3 ^d	0.18	<0.001
12 h	16.7 ^a	16.5 ^b	15.0 ^c	10.3 ^d	1.09	<0.001
24 h	15.4 ^a	21.4 ^b	25.1 ^c	3.05 ^d	0.24	<0.001

^a C, control. Ningún aditivo se utilizó en esta dieta; BM, BioMos® Alltech®. Dieta basal con la adición de 4.5 gr/kg MS de BioMos®; DG, dieta basal con la adición de 31.4 g/kg MS de granos secos de destilería más solubles de maíz; M, mananoligosacárido puro $\alpha(1-6)$ y $\alpha(1-2)$ y $\alpha(1-3)$.

^b Medias con diferente letra en la misma fila son estadísticamente diferentes (P < 0.05).

^c NH₃-N, Nitrógeno amoniacal.

TABLA 3.- Efecto de 3 diferentes fuentes de manana sobre los patrones de fermentación fecal tras la incubación in vitro en diferentes puntos de tiempo

Ítem	Fuentes de energía				SEM	P-Value
	Control	DG	BM	M		
GAS total, ml						
2 h	1.68 ^a	2.59 ^b	2.58 ^b	2.69 ^b	0.39	<0.001
4 h	2.68 ^a	4.49 ^b	4.45 ^b	4.23 ^b	0.53	<0.001
8 h	3.38 ^a	7.71 ^b	7.83 ^b	5.57 ^c	0.61	<0.001
12 h	3.40 ^a	10.4 ^b	10.7 ^b	5.85 ^c	0.65	<0.001
24 h	3.70 ^a	17.7 ^b	17.9 ^b	6.30 ^c	0.57	<0.001
Acetato, %						
2 h	79.8 ^a	68.2 ^b	68.5 ^b	78.2 ^a	1.49	<0.001
4 h	82.0 ^a	67.3 ^b	63.6 ^c	79.6 ^d	0.22	<0.001
8 h	80.6 ^a	64.1 ^b	65.6 ^b	78.1 ^a	2.31	<0.001
12 h	79.7 ^a	64.8 ^b	61.7 ^b	80.8 ^a	1.01	<0.001
24 h	78.0 ^a	52.5 ^b	54.1 ^c	73.7 ^d	0.27	<0.001
Propionato, %						
2 h	12.3 ^a	23.9 ^b	23.4 ^b	12.8 ^a	1.13	<0.001
4 h	11.5 ^a	24.7 ^b	24.8 ^b	11.5 ^a	0.76	<0.001
8 h	12.2 ^a	26.4 ^b	23.3 ^c	12.2 ^a	1.79	<0.001
12 h	12.4 ^a	27.6 ^b	25.9 ^b	13.1 ^a	0.79	<0.001
24 h	15.1 ^a	40.1 ^b	33.1 ^c	19.3 ^d	0.21	<0.001
NH₃-N, mM^c						
2 h	8.41 ^a	8.45 ^b	8.87 ^c	6.35 ^d	0.16	<0.001
4 h	8.34 ^a	8.99 ^b	9.79 ^c	6.33 ^d	0.29	<0.001
8 h	8.67 ^a	10.2 ^b	10.5 ^b	6.35 ^c	0.28	<0.001
12 h	8.48 ^a	10.1 ^b	11.4 ^c	6.09 ^d	0.09	<0.001
24 h	8.89 ^a	8.25 ^b	10.7 ^c	6.47 ^d	0.26	<0.001

^a C, control. Ningún aditivo se utilizó en esta dieta; BM, BioMos® Alltech®. Dieta basal con la adición de 4.5 gr/kg MS de BioMos®; DG, dieta basal con la adición de 31.4 g/kg MS de granos secos de destilería más solubles de maíz; M, mananoligosacárido puro α(1-6) y α(1-2) y α(1-3).

^b Medias con diferente letra en la misma fila son estadísticamente diferentes (P < 0.05).

^c NH₃-N, Nitrógeno amoniacal.

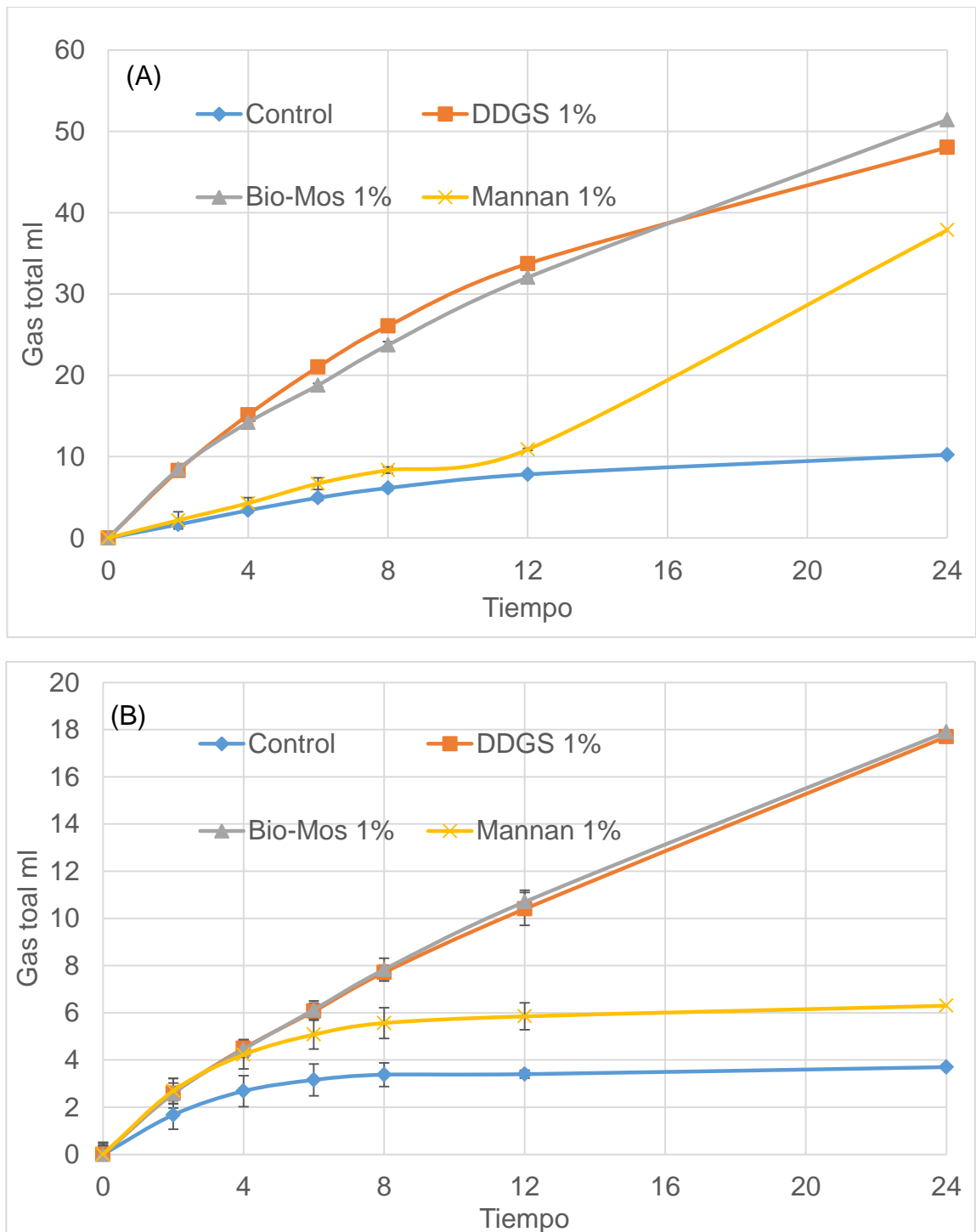


Figura 1.- Efectos de tres diferentes fuentes de manana sobre producción de gas total de la fermentación (A) ruminal y (B) fecal *in vitro* a las 0, 4, 8, 12 y 24 horas. Muestras *in vitro* de rumen y heces sin sustrato inoculadas con Bio-Mos (BM), granos secos de destilería más solubles de maíz (GD) o manana puro (M) como única fuente de carbón. El grupo control (CON) no fue inoculado con ninguna fuente de carbón.

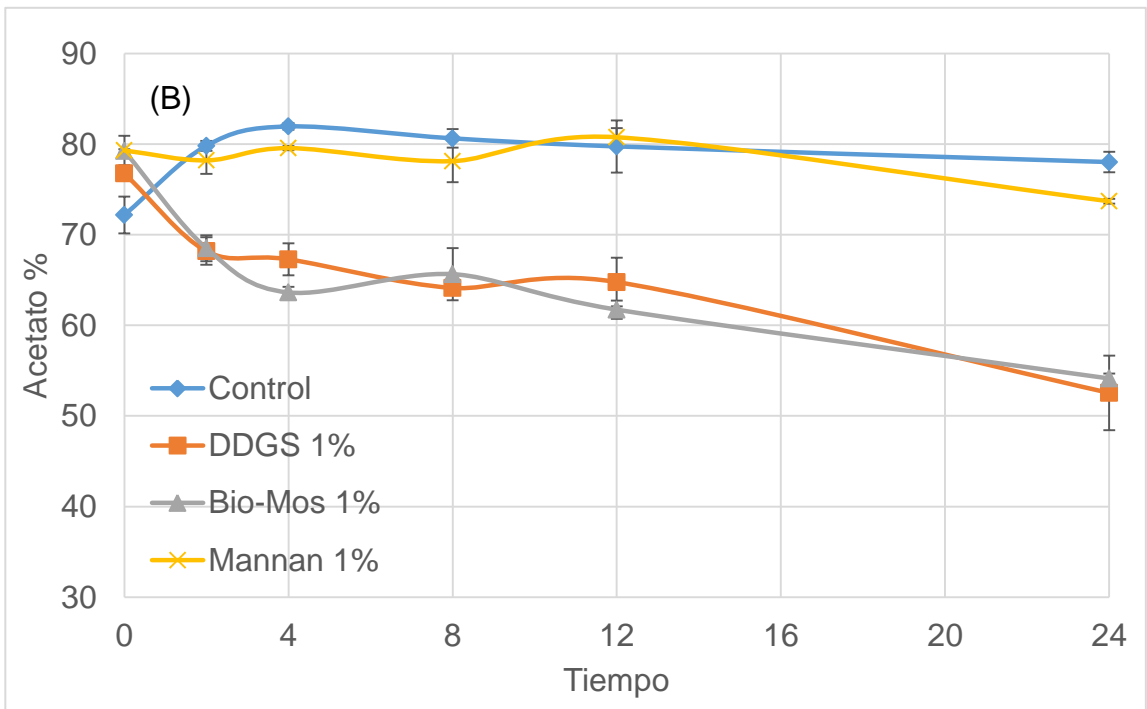
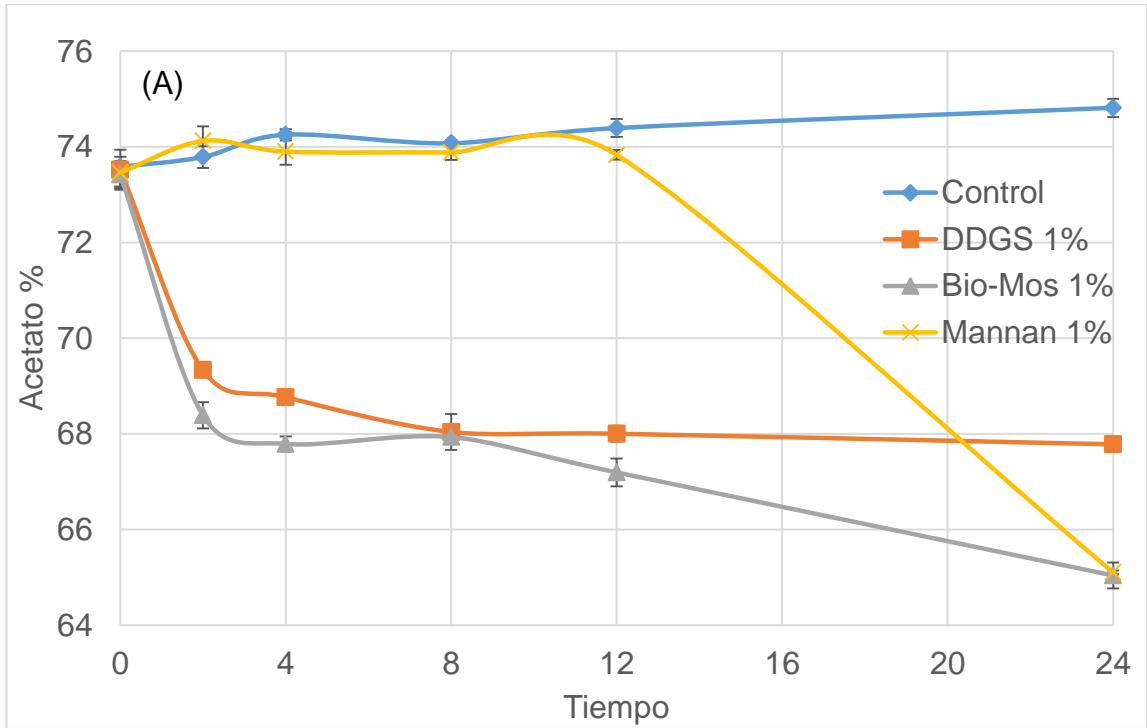


Figura 2.- Efectos de tres diferentes fuentes de manana sobre producción de acetato de la fermentación (A) ruminal y (B) fecal *in vitro* a las 0,4,8,12 y 24 horas. Muestras *in vitro* de rumen y heces sin sustrato inoculadas con Bio-Mos (BM), granos secos de destilería más solubles de maíz (GD) o manana puro (M) como única fuente de carbón. El grupo control (CON) no fue inoculado con ninguna fuente de carbón.

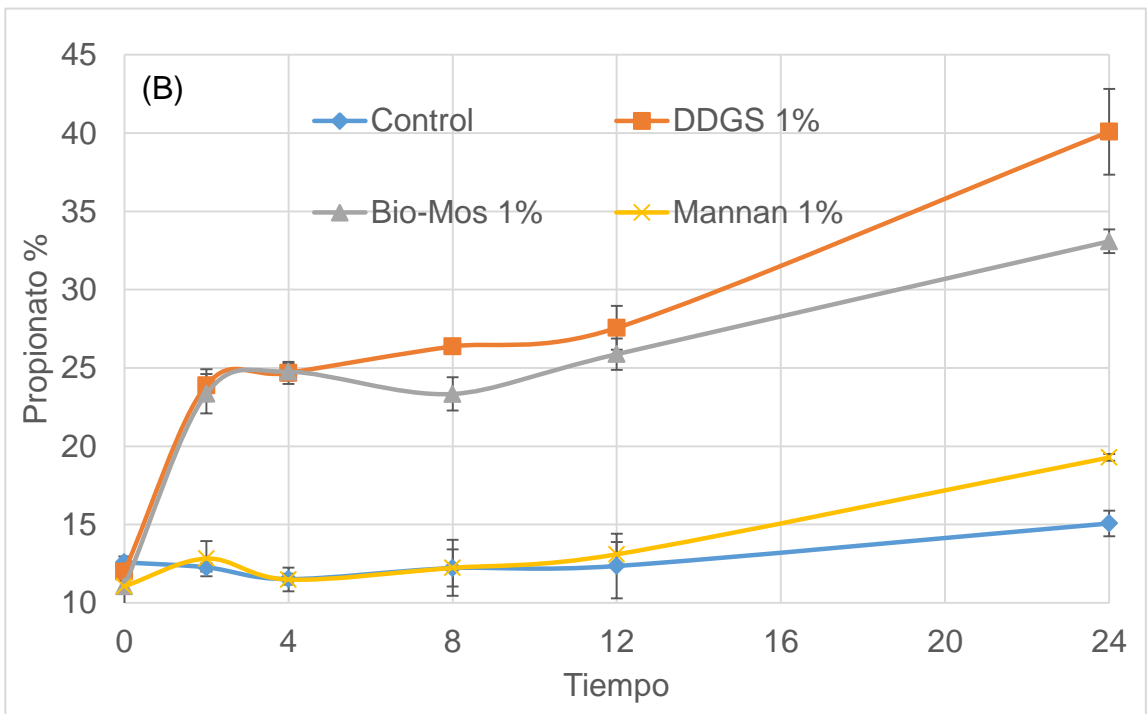
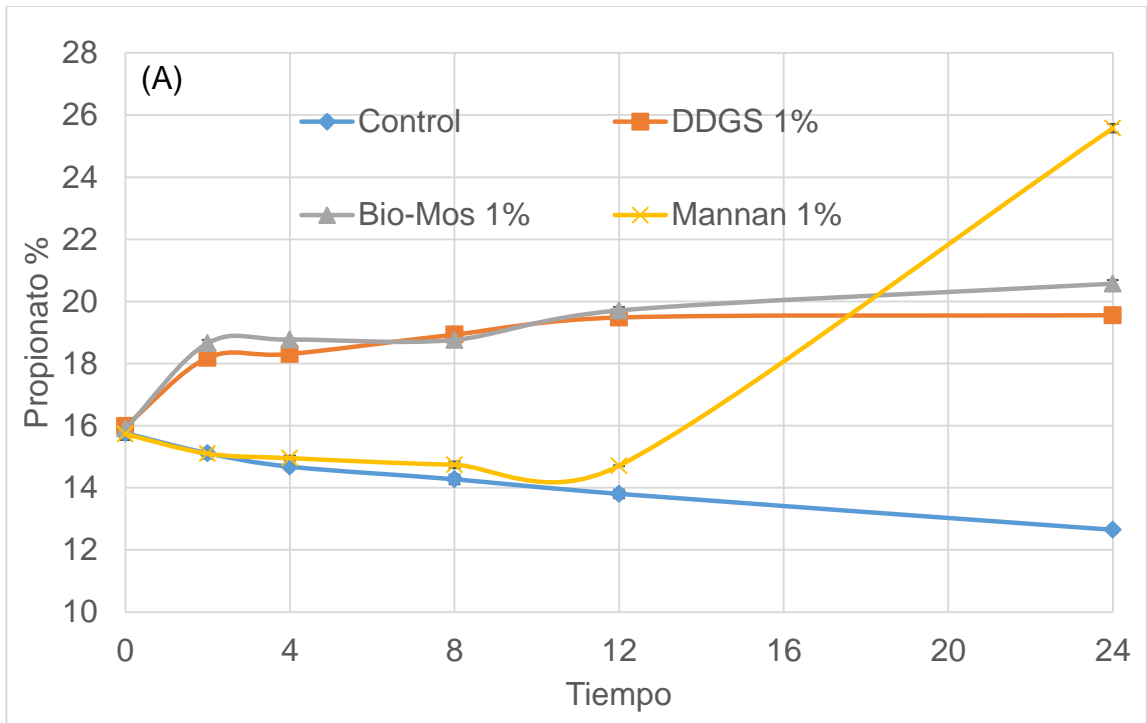


Figura 3.- Efectos de tres diferentes fuentes de manana sobre producción de propionato de la fermentación (A) ruminal y (B) fecal *in vitro* a las 0, 4, 8, 12 y 24 horas. Muestras *in vitro* de rumen y heces sin sustrato inoculadas con Bio-Mos (BM), granos secos de destilería más solubles de maíz (GD) o manana puro (M) como única fuente de carbón. El grupo control (CON) no fue inoculado con ninguna fuente de carbón.

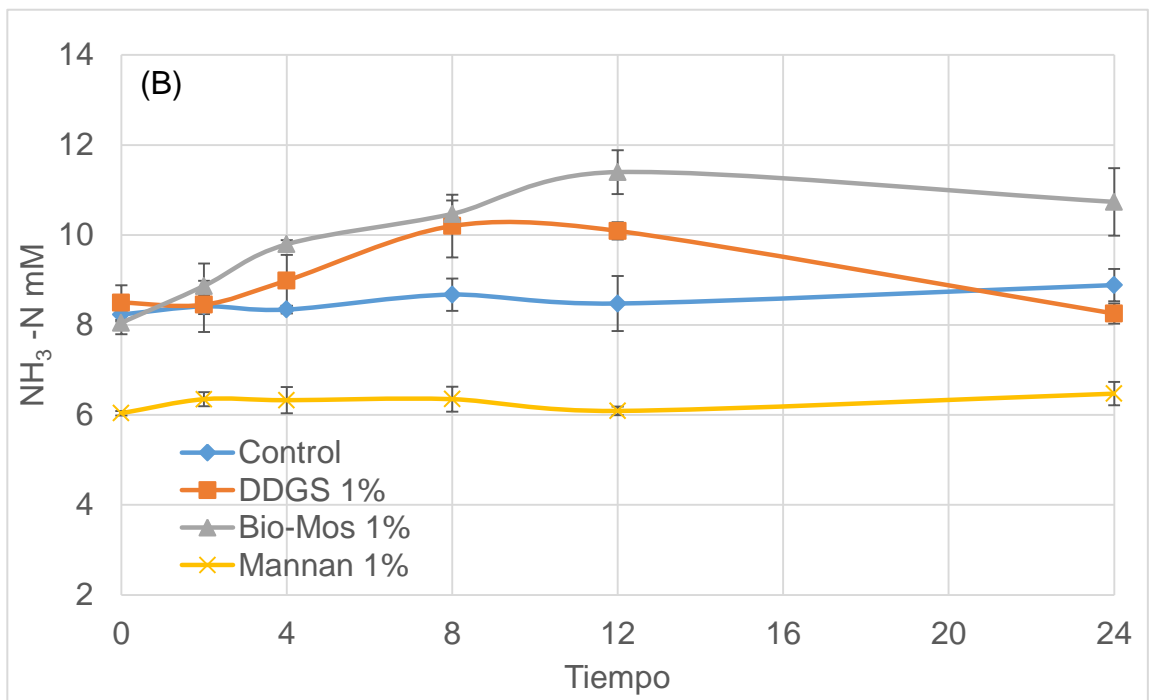
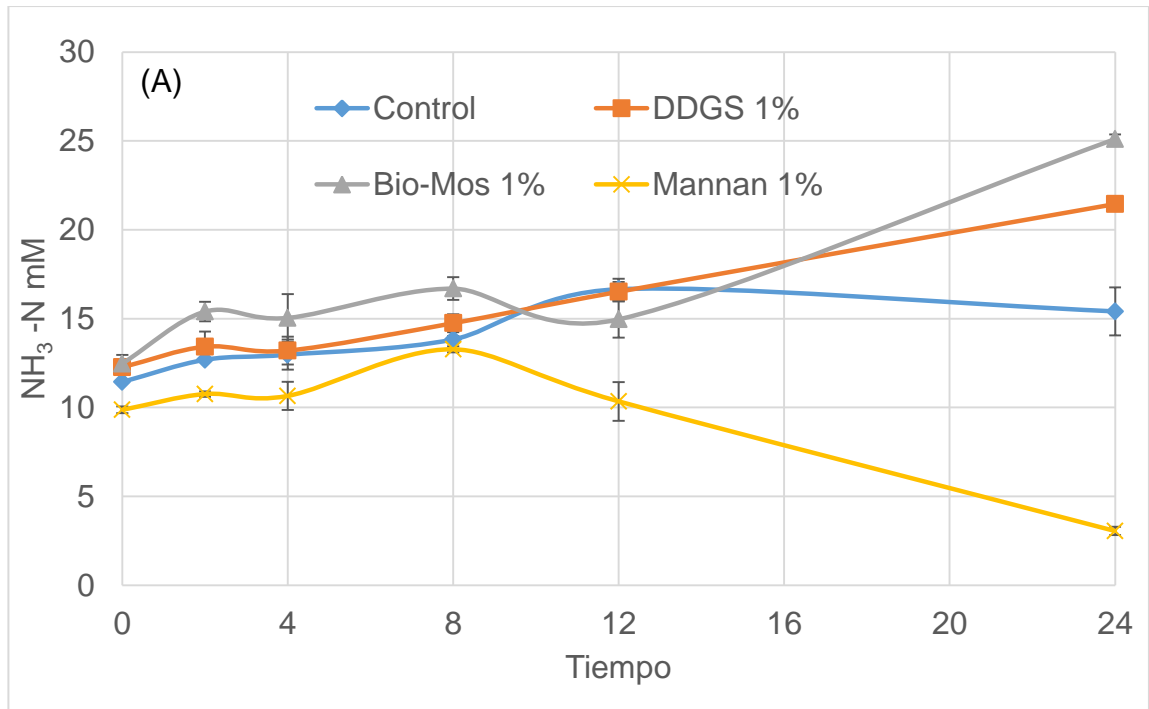


Figura 4.- Efectos de tres fuentes de manana sobre la producción de nitrógeno amoniacal de la fermentación (A) ruminal y (B) fecal *in vitro* a las 0, 4, 8, 12 y 24 horas. Muestras *in vitro* de rumen y heces sin sustrato inoculadas con Bio-Mos (BM), granos secos de destilería más solubles de maíz (GD) o manana puro (M) como única fuente de carbón. El grupo control (CON) no fue inoculado con ninguna fuente de carbón.

Composición taxonómica de bacterias ruminales

El uso de diferentes fuentes de carbón provocó que se lograra observar un cambio en las poblaciones microbianas que fue más marcado mientras más paso el tiempo de fermentación. Estos cambios se pueden observar en una gráfica de componentes principales a las 4 (Fig. 5A) y 24 (Fig. 5B) horas donde se puede ver la formación de clústeres definidos conforme el tiempo transcurre mostrando la diferencia en el microbioma de los grupos. Los cambios en abundancia relativa de cada grupo se observaron después de 4 horas donde se observó el primer cambio entre poblaciones. A las 4 horas de incubación el phylum predominante (Fig. 7A) en todas las muestras fue *Bacteroidetes* seguido de *Firmicutes* y *Euyarchaeota*, otros phylums identificados observados fueron *Lentisphaerae*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Planctomycetes* y *Tenericutes*. Los principales géneros (FIG. 8) observados en este tiempo fueron *Prevotellaceae*, *Bacteroidia*, *Bacteroidetes*, *Methanobrevibacter*, *Methanobacteriaceae*, *Methanobacteriales*, *Methanobacteria*, *Archaea*, *Christensenellaceae*, *Clostridia*, *Firmicutes*, *Succinicladium*, *Acidaminococcaceae*, *Selenomonadales* y *Ruminococcaceae*. No se observaron diferencias importantes entre tratamientos en este tiempo. A las 24 horas (Fig. 7B) de fermentación el phylum *Bacteroidetes* incrementó en abundancia y a casi el doble al utilizar M como fuente de carbón, en los grupos DG y C el phylum dominante observado fue *Firmicutes* a diferencia de lo observado a las 4 horas donde *Bacteroidetes* fue el phylum principal. El phylum *firmicutes* también fue favorecido en el grupo BM, sin embargo, su abundancia no fue mayor a la de *Bacteroidetes* a las 4 horas. Otros phylum observados fueron *Lentisphaerae*, *Actinobacteria*, *Planctomycetes*, *Fibrobacteres*, *Tenericutes* y *Spirochaetae*. Los géneros identificados en este punto (Fig. 9) fueron *Prevotellaceae*, *Bacteroidia*, *Bacteroidetes*, *Christensenellaceae*, *Clostridia*, *Firmicutes*, *Methanobrevibacter*, *Methanobacteriaceae*, *Methanobacteriales*, *Methanobacteria*, *Archaea* y *Ruminococcaceae*. En el grupo M los géneros más abundantes fueron *Prevotellaceae*, *Bacteroidia* y *Bacteroidetes* (>60%) mientras que en el grupo C y DG la abundancia fue no

más de alrededor de 5% y alrededor del 20% en el grupo BM. El grupo M se observó un cambio completo en la población bacteriana a comparación del grupo control, al parecer el uso de manana como fuente de carbón favorece el crecimiento de bacterias del phylum *Bacteroidetes* y disminuye *Firmicutes*. A las 24 horas este efecto provocó un cambio en la abundancia relativa de las poblaciones, mientras que en el grupo control *Firmicutes* fue el phylum dominante (aproximadamente 50%) en el grupo M representó alrededor del 10% únicamente y alrededor de 40% en el grupo BM. Al mismo tiempo el phylum *Bacteroidetes* se volvió el dominante en abundancia en los grupos M (85%) y BM (50%). Los principales géneros involucrados en este cambio parecen ser *Prevotella*, *Bacteroidia*, *Bacteria*, *Christensenellaceae* y *Clostridia*. Observando un mapa de calor a las 4 (Fig.13) y 24 (Fig. 14) horas es posible observar la actividad bacteriana y la separación entre las poblaciones de cada tratamiento.

Composición taxonómica de comunidades bacterianas fecales

El uso de diferentes fuentes de carbón provocó que se lograra observar un cambio en las poblaciones microbianas fecales que fue más marcado mientras más tiempo de fermentación pasó. Estos cambios se pueden observar en una gráfica de componentes principales a las 4 (Fig. 6A) y 24 (Fig. 6B) horas donde se puede ver como se forman clústeres definidos conforme el tiempo transcurre mostrando la diferencia en el microbioma de los grupos. Los cambios en abundancia relativa de cada grupo se observaron después de 4 horas donde se observó el primer cambio entre poblaciones. A las 4 horas de incubación el phylum predominante (FIG. 10A) en todas las muestras fue *Firmicutes*, seguido de *Bacteroidetes* y *Proteobacteria*, otros phylums identificados observados fueron *Verrucomicrobia*, *Euryarchaeota*, *Lentisphaerae*, *Actinobacteria*, *Cyanobacteria* y *Tenericutes*. Aproximadamente 40 géneros diferentes fueron identificados en las muestras fecales donde los principales (FIG. 11) observados en este tiempo fueron *Ruminococcaceae*, *Clostridia*, *Firmicutes*,

Bacteroidaceae, *Bacteroidia*, *Bacteria*, *Christensenellaceae*, *Akkermansia* entre otros. A las 24 horas de fermentación (Fig. 10B) el phylum *Firmicutes* disminuyó casi al 50% al utilizar M como fuente de carbón y *Bacteroidetes* se convirtió en el phylum dominante al mismo tiempo que también se observó un incremento en la abundancia de *Proteobacteria*, en los grupos DG y C el phylum dominante observado fue *Firmicutes* y no se observaron cambios importantes en su abundancia, sin embargo, *Verrucomicrobia* y *Proteobacteria* disminuyeron mientras que *Bacteroidetes* aumentó su abundancia. Otros phylum observados fueron *Euryarchaeota*, *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria*, *Tenericutes*, *Cyanobacteria* y *Fibrobacteres*. Los géneros identificados en este punto fueron aproximadamente 37 diferentes (Fig. 12) dentro de los cuales los principales fueron *Prevotellaceae*, *Bacteroidia*, *Lachnospiraceae*, *Bacteria*, *Escherichia-Shigella*, *Enterobacteriaceae*, *Enterobacteriales*, *Gammaproteobacteria*, *Proteobacteria*, *Streptococcaceae* y *Lactobacillales*, entre otros. En el grupo M los géneros más abundantes fueron *Prevotellaceae*, *Bacteroidia* y *Bacteroidetes* (>40%) valores muy similares al grupo BM. En el grupo C estos géneros no superaron el 3% y en DG alcanzaron un máximo de 24%. La abundancia de los géneros *Escherichia-Shigella*, *Enterobacteriaceae*, *Enterobacteriales*, *Gammaproteobacteria* y *Proteobacteria* fue mayor con el uso de manana y BioMos® como fuente de carbón mientras que con el uso de BioMos® el crecimiento de *Lactobacillales*, *Lachnospiraceae* y *Butivibrio*, fue mayor que en todos los grupos. Observando esta actividad en un mapa de calor a las 4 (Fig. 15) y 24 (Fig.16) horas es claro el cambio en abundancia de cada uno de los grupos y se observa como la actividad de manana parece estar centrada en el rumen y no tracto postruminal.

Existe muy poca literatura disponible sobre los efectos de mananoigosacáridos (manana) en patrones de fermentación en rumiantes, la forma más común de encontrar literatura asociada a estos efectos es aquella que menciona el uso de *Saccharomyces cerevisiae* como aditivo en dietas. Manana es el segundo polisacárido más importante de la pared celular de las levaduras y comprende aproximadamente 40% de la materia seca de la pared

celular (Xie et al., 2017; Shurson, 2018). Dada la abundancia natural de manana, muchos microorganismos producen sistemas enzimáticos para hidrolizar completamente el manana a azúcares simples que puedan ser usados como fuentes de energía (Jiang et al., 2006)

En este estudio la adición de diferentes fuentes de manana a los viales de fermentación aumento la producción de propionato y redujo la producción de acetato ruminal resultando en una disminución en la relación acetato: propionato. Estos resultados concuerdan con los de Sullivan y Martin (1999) quienes evaluaron los efectos de la adición de *S. cerevisiae* a cultivos de fermentación y observaron que en aquellos cultivos donde utilizaron como sustrato fuentes de fibra produjeron diferencias significativas en propionato y acetato similares a las encontradas en este estudio, sin embargo, estos efectos no pudieron observarse en aquellos cultivos donde se utilizaron como sustrato fuentes de carbohidratos solubles. En este experimento estos resultados se pueden explicar observando los diagramas de beta diversidad. A nivel ruminal el género *Prevotella* fue mucho mayor en viales infundidos con fuentes de manana. El mayor cambio se observó en el grupo M, *Prevotella ruminicola* constituye uno de los grupos más numerosos recuperados de muestras ruminales o intestinal y juegan un papel importante en la utilización de polisacáridos de origen vegetal incluyendo xylanos, pectinas y almidón, además de jugar un papel importante en el metabolismo proteico y peptídico (Gorzard et al., 1997, Bacmap.whisartlab.com/organisms/1076). *Prevotella* es una bacteria con actividad proteolítica importante y es capaz de utilizar nitrógeno amoniacal, proteico, péptidos o aminoácidos como fuente de nitrógeno, aunque parece desarrollarse mejor con aminoácidos disponibles como principal fuente de nitrógeno (Griswold y Mackie 1995). La mayoría de los microorganismos capaz de utilizar mananoligosacáridos como fuentes de energía son microorganismos que poseen también una actividad importante en la utilización de hemicelulosas (Moreira and Filho, 2008). Todas estas observaciones concuerdan con los hallazgos en este estudio donde se puede observar una marcada especialización por el phylum *Bacteroidetes* para utilizar manana como fuente

de energía mientras que se observa una disminución importante en los niveles de nitrógeno amoniacal del medio del grupo M.

Los incrementos en los niveles de propionato y disminución de acetato con el uso de manana concuerdan con la disminución en la abundancia de *Ruminococcaceae*, *Christensenellaceae* y *Archaea*. En otros estudios se ha observado que *Ruminococcaceae* en presencia de *Methanobacter* cambia sus patrones de fermentación y se vuelve un productor de acetato (Latham y wolin 1997) lo que explicaría los niveles más altos de acetato en el resto de los grupos. Además de que se ha observado que las bacterias gram negativas sacarolíticas del género *Christensenellaceae* forman como producto final de la fermentación de glucosa principalmente acetato y butirato en pequeñas cantidades (Masami et al., 2012).

Otros experimentos in vitro han reportado que la adición de *S. cerevisiae* a los viales ha estimulado el uso de ácido láctico del medio y promovido la digestión de celulosa, presumiblemente por un cambio en el microbioma ruminal. Algunas de las bacterias que podrían estar asociadas a estos efectos y podrían ser beneficiadas por el uso de *S. cerevisiae* podrían ser *Selenomonas ruminantium* (HD4 y HD18), *Megasphera elsdenii* (B159 y T81), *Fibrobacter succionogenes* S85 y *Ruminococcus flavefaciens* FD1 (Callaway y Martin, 1997). Estos resultados se observaron a pesar de no haber agregado ningún sustrato a los viales de fermentación y concuerdan con observaciones de estudios previos (Callaway y Martin, 1997). Los efectos observados en el microbioma con el uso de levaduras pueden estar explicado en gran parte por el manana contenido en su pared celular pero también se ha observado que cambios en el pH del medio puede afectar el microbioma como el caso de *Bacteroidetes spp.* son relativamente sensibles a pH medianamente ácido mientras que *Firmicutes* y *Bifidobacterias* son más tolerantes a esta misma condición por lo cual son menos afectados a una disminución en el pH (Duncan et al., 2009). Por lo cual los cambios observados en el microbioma de los diferentes tratamientos pueden deberse no solo al manana sino a otros

componentes de las levaduras que logran acidificar el medio elevando la producción de ácidos grasos de cadena corta.

Como se observa en el presente estudio el cambio en el microbioma ruminal y fecal es marcado a las 24 horas. El phylum y los géneros favorecidos con el uso de manana podrían contar con una actividad elevada de B-mananasas capaces de romper la complicada estructura de los mananoligosacáridos y obtener D-mannosa y D-glucosa como fuente de energía. Acorde a nuestro conocimiento, existe muy escasa literatura que discuta los mecanismos metabólicos de las bacterias ruminales para la utilización de manana. Siendo manana un polisacárido este no puede penetrar la pared celular. En este caso, moléculas más pequeñas, la cuales son productos de la degradación de manana, actúan como inductores y juegan un papel importante en la regulación de biosíntesis de manana. Estas moléculas son monómeros y oligosacáridos que son liberados del manana por la acción de un nivel basal de enzimas hidrolíticas presentes en la célula (Moreira y Filho, 2008). Las enzimas degradadoras de manana están compuestas por β -mananaasa (1,4- β -D-manana mannohidrolasa, EC 3.2.178), β -mannosidasa (1,4- β -D-mannopyranoside hidrolasa, EC 3.2.1.25), y β -glucosidasa (1,4- β -D-glucoside glucohidrolasa, EC 3.2.1.21). Enzimas adicionales como la acetyl manana esterasa y la α -galactosidasa (1,6- α -D-galactoside galactohidrolasa, EC 3.2.1.22) son requeridas para la remoción de los sustituyentes de la cadena lateral que pueden estar adheridos en diferentes puntos de la estructura del manana, creando así más puntos para la subsecuente hidrólisis enzimática (Filho 1998). Cuskin et al., 2016 identificaron en el phylum Bacteroidetes tres loci de utilización de polisacáridos (PUL-man 1/2/3) relacionados al metabolismo de manana expresando la actividad de alfa manosidasa y alfa mananasa. En su estudio mutantes deficientes en PUL-Man 1/2/3 no fueron capaces de crecer en un medio in vitro de manana de levadura. Una β -mananaasa de *B. subtilis* parece presentar un mecanismo al ser incubado con copra-manana donde libera principalmente mannotetrosa, mannobiosa y mannotriosa (Jiang et al., 2006).

EL incremento tan marcado en los principales phylum con el uso de fuentes de manana como fuente de energía podría indicar que los manooligosacáridos provocaron un proceso estricto de selección en la comunidad microbiana y solo unos cuantos miembros de la población microbiana son capaces de utilizarlos. En el presente estudio se observó al usar manana como fuente de energía que la comunidad bacteriana se afectó más a nivel ruminal que postruminal, mientras que al utilizar BioMos® la comunidad se afectó más en tracto postruminal que ruminal, estos resultados concuerdan con los observados en lechones (Hang y Zhu 2012). El uso de BioMos® aumentó la presencia de lactobacillus a nivel postruminal, estos resultados concuerdan con diversos estudios del uso de levaduras como probióticos (Hang y Zhu 2012; Oso et al., 2013).

En el presente estudio la producción de gas total ruminal se incrementó de manera constante en los tratamientos de BM y DG sin embargo tuvieron que transcurrir 12 horas de incubación para que el efecto de manana se observara evidente. La producción de gas total se explica por la suma de los productos de fermentación donde acetato descendió marcadamente a las 12 horas con la utilización de manana lo que podría sugerir que aquellas bacterias que son capaces de utilizar este oligosacárido como fuente de energía requieren de un tiempo para alcanzar las condiciones óptimas para la actividad enzimática o la expresión de genes asociados al metabolismo de manana para poder volverlo una fuente de energía biodisponible. En varios estudios en general las enzimas han mostrado su mayor actividad a un pH y temperatura que va de 3.0–7.5 y 45-92°C respectivamente. La termo estabilidad puede variar de los 10 minutos a las 8 horas a diferentes temperaturas. Estas enzimas difieren también en sus parámetros cinéticos y puntos isoeléctricos (Arcand et al., 1993; Duffaud et al., 1997; Setati et al., 2001; Jiang et al., 2006; Chen et al., 2007). El incremento en el pH parece correlacionarse con la formación de hemicelulasas (mananaasa y galactosidasa) y celulasa (endoglucanasa) en cultivos de *Heterobasidion annosum*, la producción de β -mananaasa por *Scopulariopsis candida* parece incrementar con incrementos en la concentración de NaCl en el medio sin

embargo esta elevación en niveles de salinidad ha mostrado efectos negativos en cepas de *Verticillium dahliae* (Olsson et al., 2003; Mudau and Setati, 2006). La disminución casi inmediata en la producción de acetato con BM se debería entonces a otros componentes de las levaduras o aditivos en el producto comercial ya que a las 8 horas se observa una disminución menos acelerada que la que se observó con el uso de manana que resulto en mismos niveles de acetato a las 24 horas en ambos. La falta de efecto de manana sobre la producción de acetato en heces durante las primeras horas podría deberse a que las bacterias implicadas solo tienen función en el rumen y no en el tracto postruminal, sin embargo, se observó un efecto depresivo en las últimas 12 horas de fermentación fecal que podría deberse al tiempo necesario para la adaptación metabólica necesaria de bacterias no especializadas en la utilización de mananoligosacáridos. Lo anterior puede también explicar el incremento tan marcado en la producción de propionato en a las 12 horas de incubación en los vials conteniendo manana como única fuente de carbón. De igual forma el estímulo de manana sobre propionato en heces fue limitado, siendo mucho mayor la de BM debido a la fermentación de otros componentes por bacterias del tracto postruminal. Los microorganismos comúnmente pueden producir diferentes formas de enzimas degradadoras de manana (Xu et al., 2002). La multiplicidad de enzimas degradadoras de manana puede ser causada por una gran cantidad de factores como diferencias en el procesamiento de ARN mensajero y modificaciones post-traslacionales o debido a los requerimientos para ligar o degradar sustratos de diferentes complejidad (Johnson et al., 1990; Viikari et al., 1993; Ferreira and Filho, 2004).

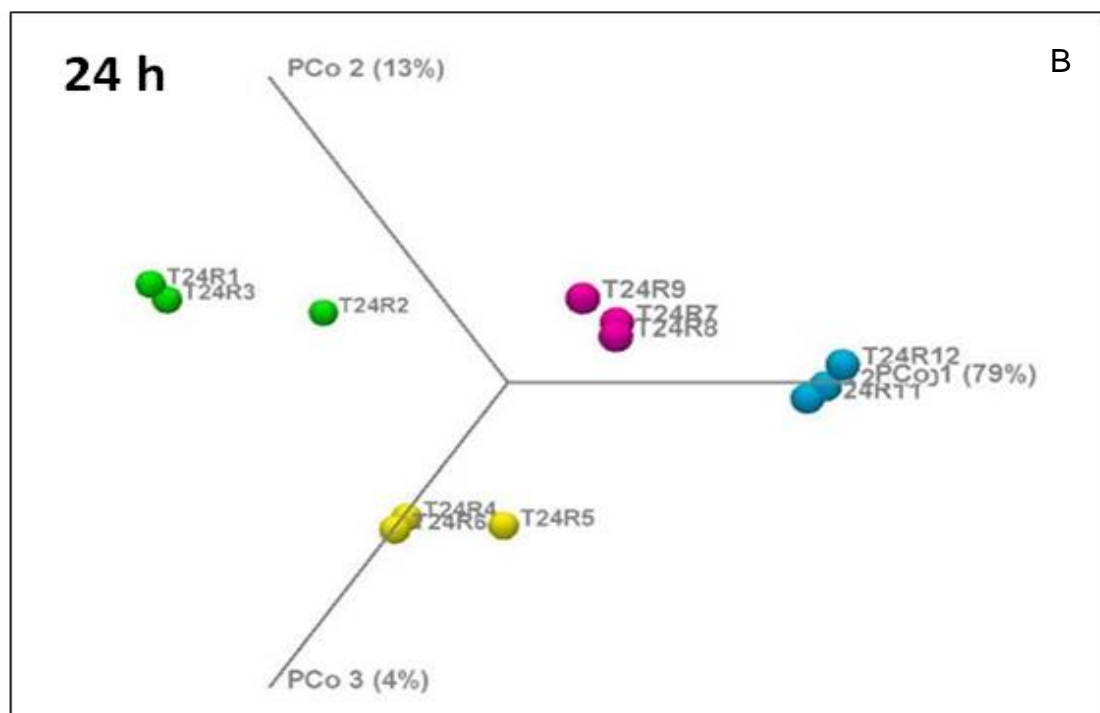
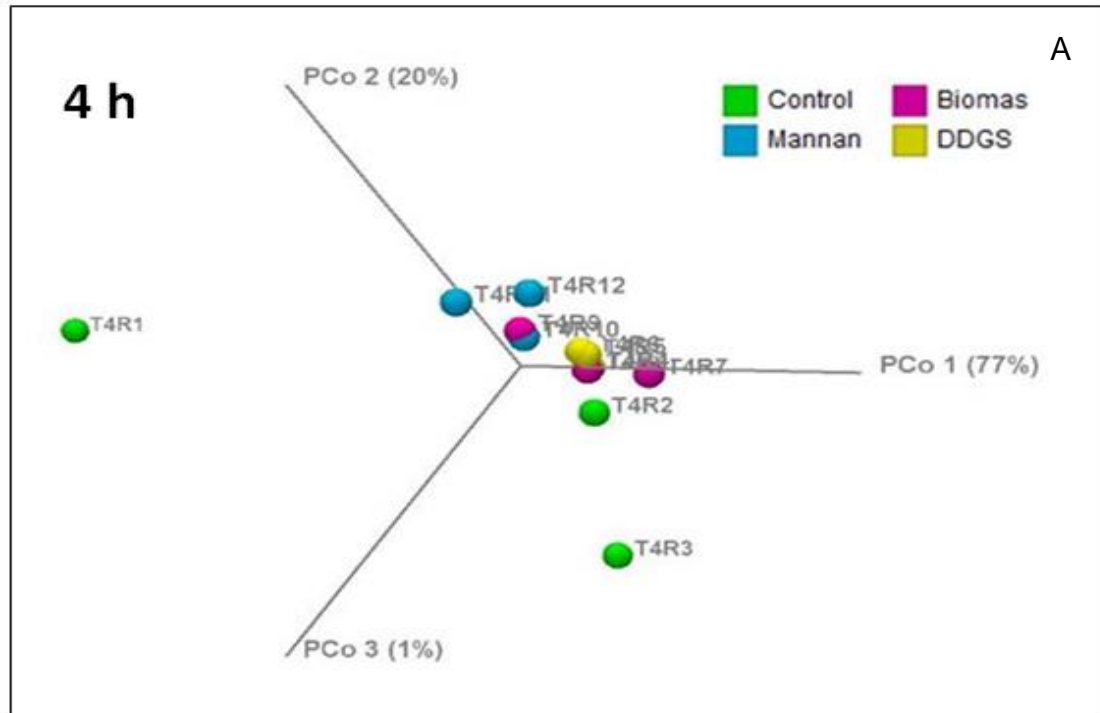


Figura 5. Análisis de coordenadas principales (weighted) de microbiota de cultivo ruminal in vitro después de 4 horas (A) y 24 horas (B) de fermentación. Inoculante ruminal obtenido de una vaquilla alimentada con heno de alfalfa. Los sustratos utilizados fueron Bio-Mos® (1% W/V), granos secos de destilería más solubles de maíz (1% W/V; DDGS), manana puro (1% W/V), y un grupo Control sin sustrato.

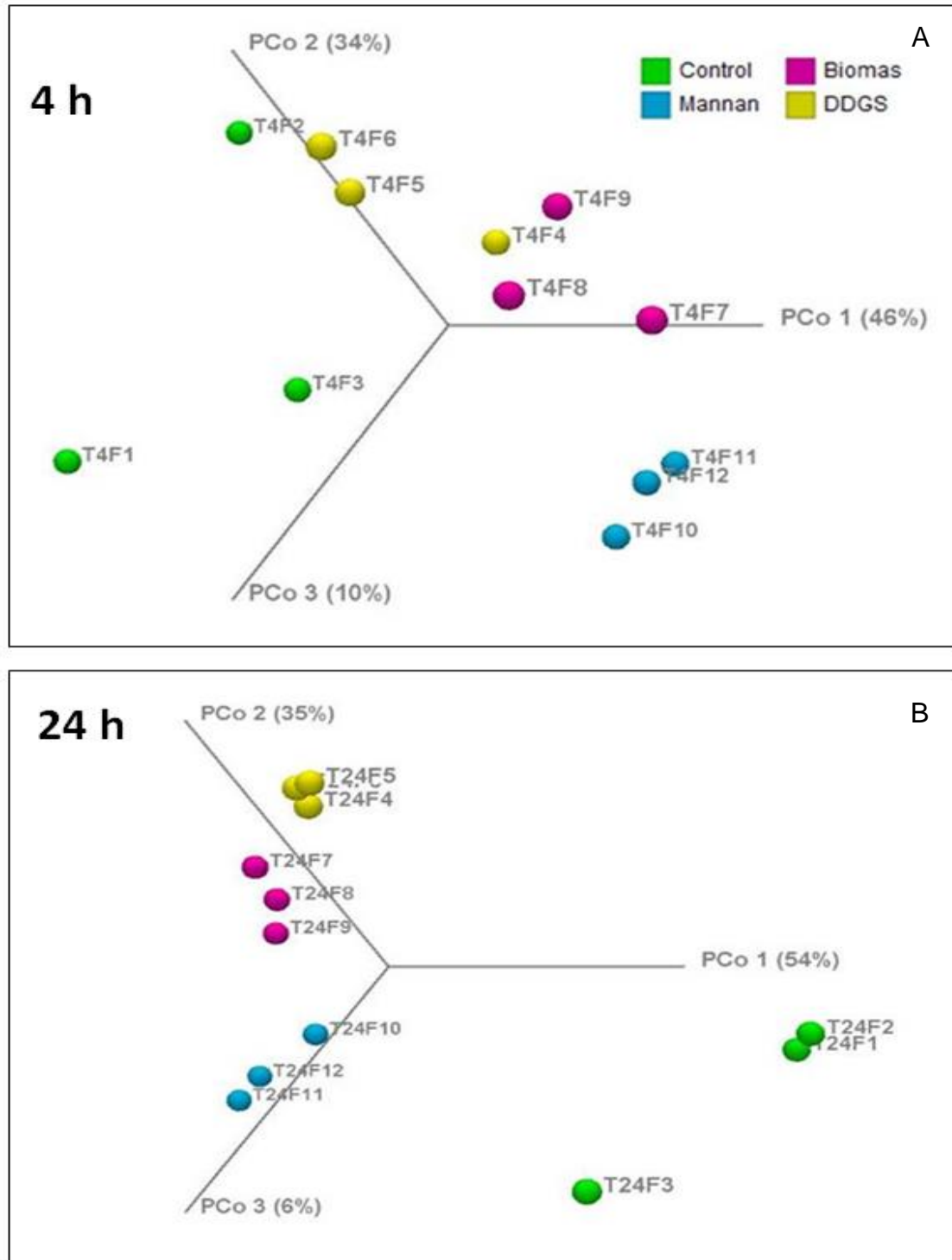


Figura 6. Análisis de coordenadas principales (weighted) de microbiota de cultivo fecal in vitro después de 4 (A) y 24 (B) horas de fermentación. Inoculante ruminal obtenido de una vaquilla alimentada con heno de alfalfa. Los sustratos utilizados fueron Bio-Mos® (1% W/V), granos secos de destilería más soluble de maíz (1% W/V; DDGS), manana puro (1% W/V), y un grupo Control sin sustrato.

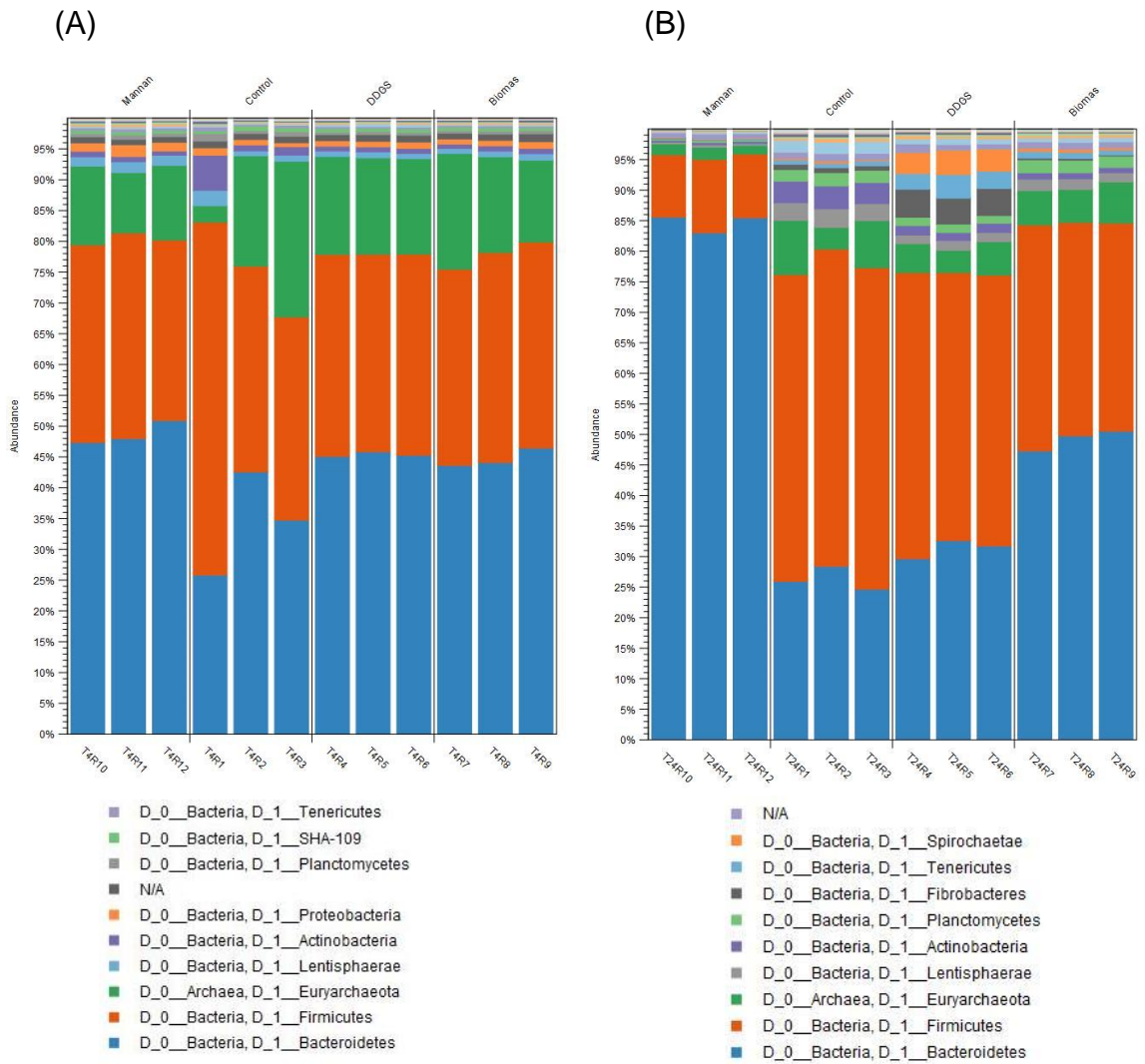


Figura 7.- Efecto de 3 diferentes fuentes de manana sobre abundancia del phylum de bacterias ruminales a las (A) 4 y (B) 24 horas de incubación.

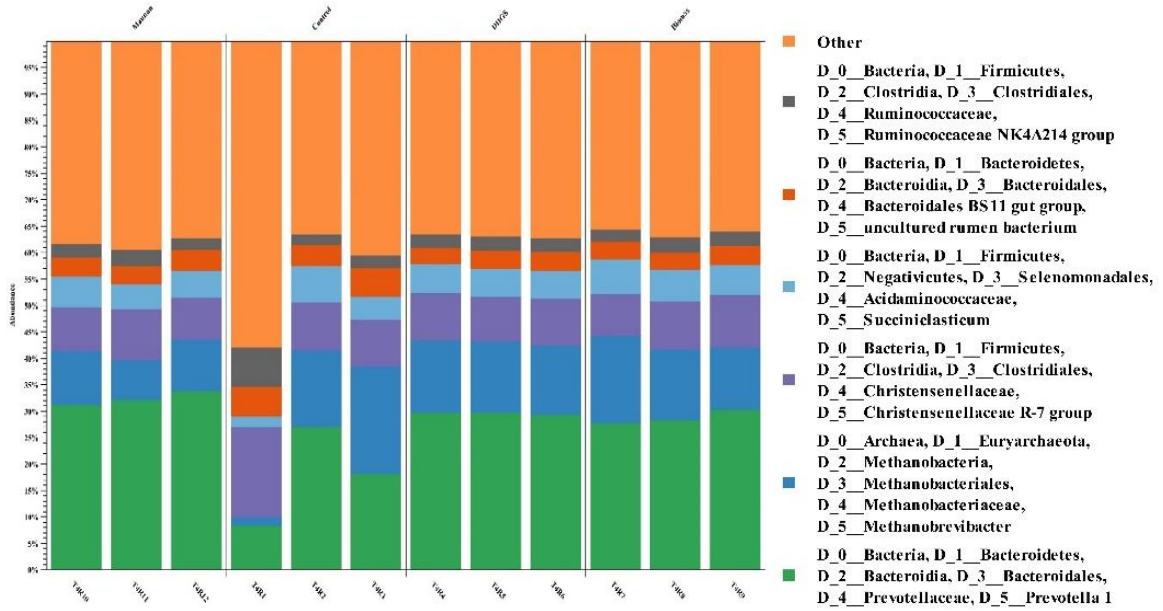


Figura 8.- Efecto de 3 fuentes de manana sobre la abundancia del género de bacterias ruminales a las 4 horas de incubación.

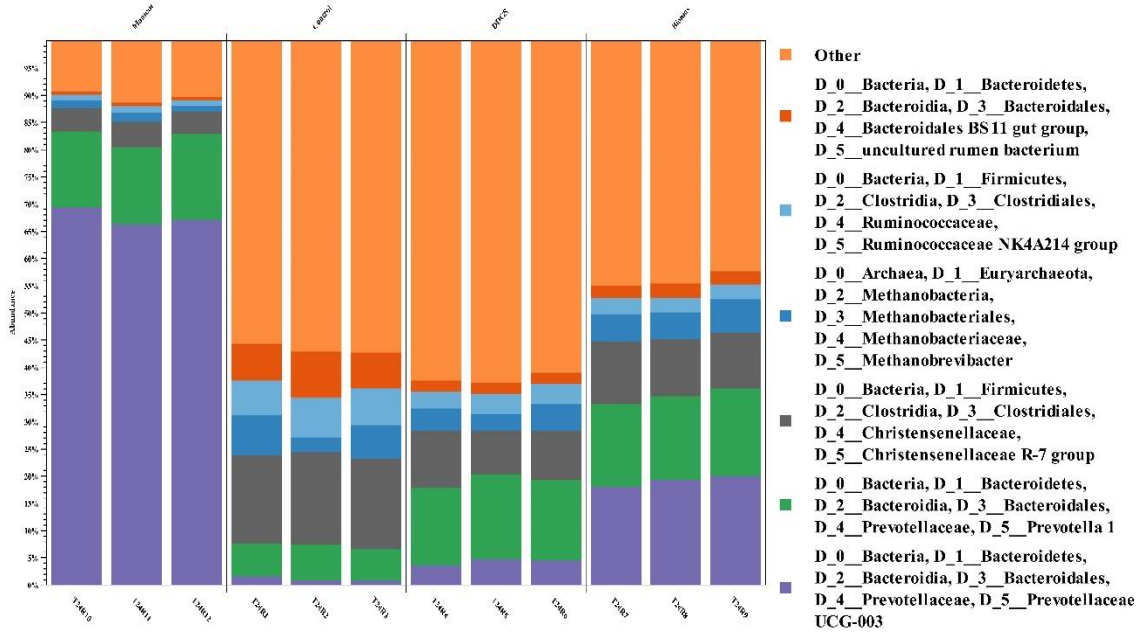


Figura 9.- Efecto de 3 fuentes de manana sobre la abundancia del género de bacterias ruminales a las 24 horas de incubación.

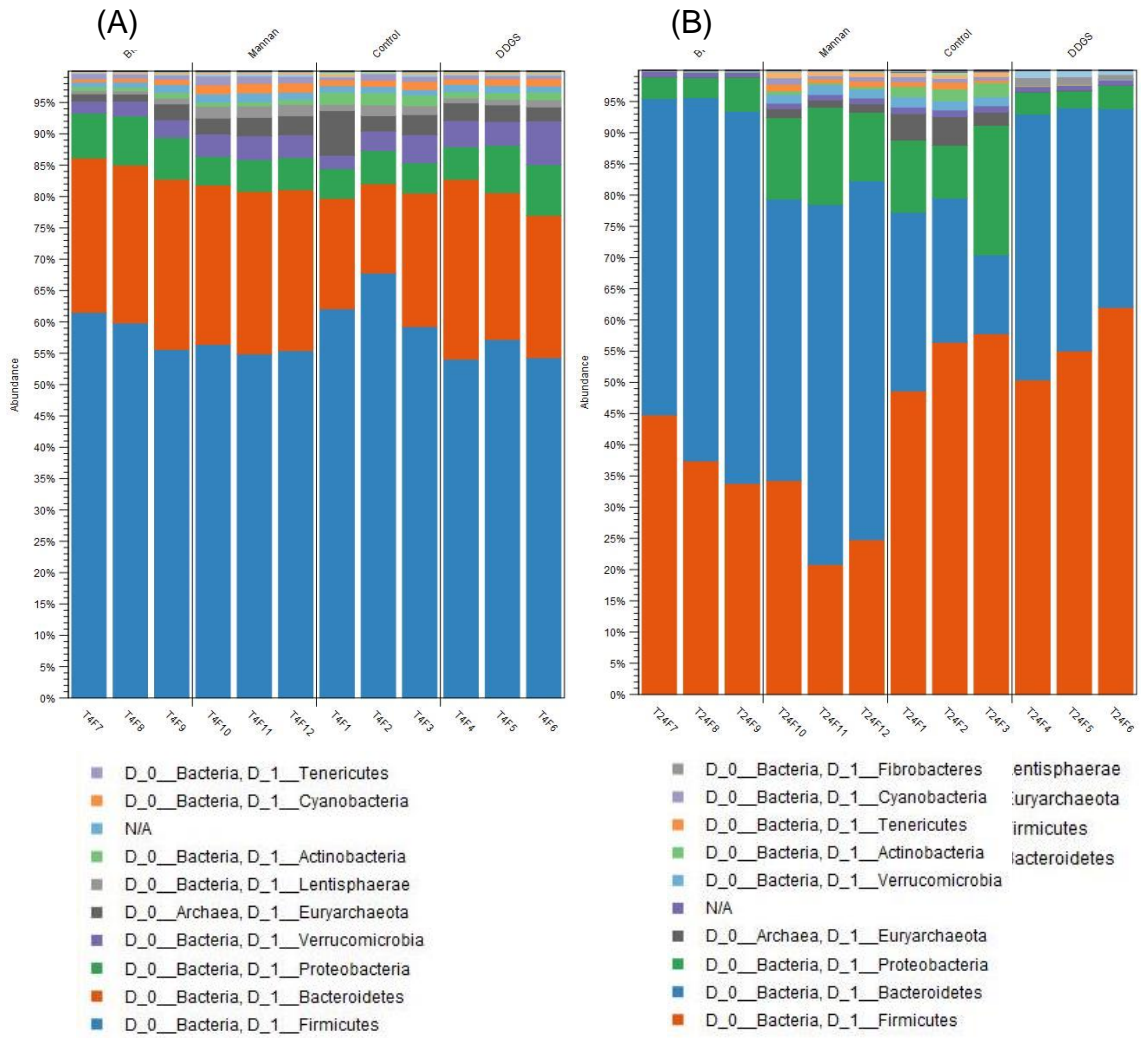


Figura 10.- Efecto de 3 diferentes fuentes de manana sobre la abundancia del phylum de bacterias fecales a las (A) 4 y (B) 24 horas de incubación.

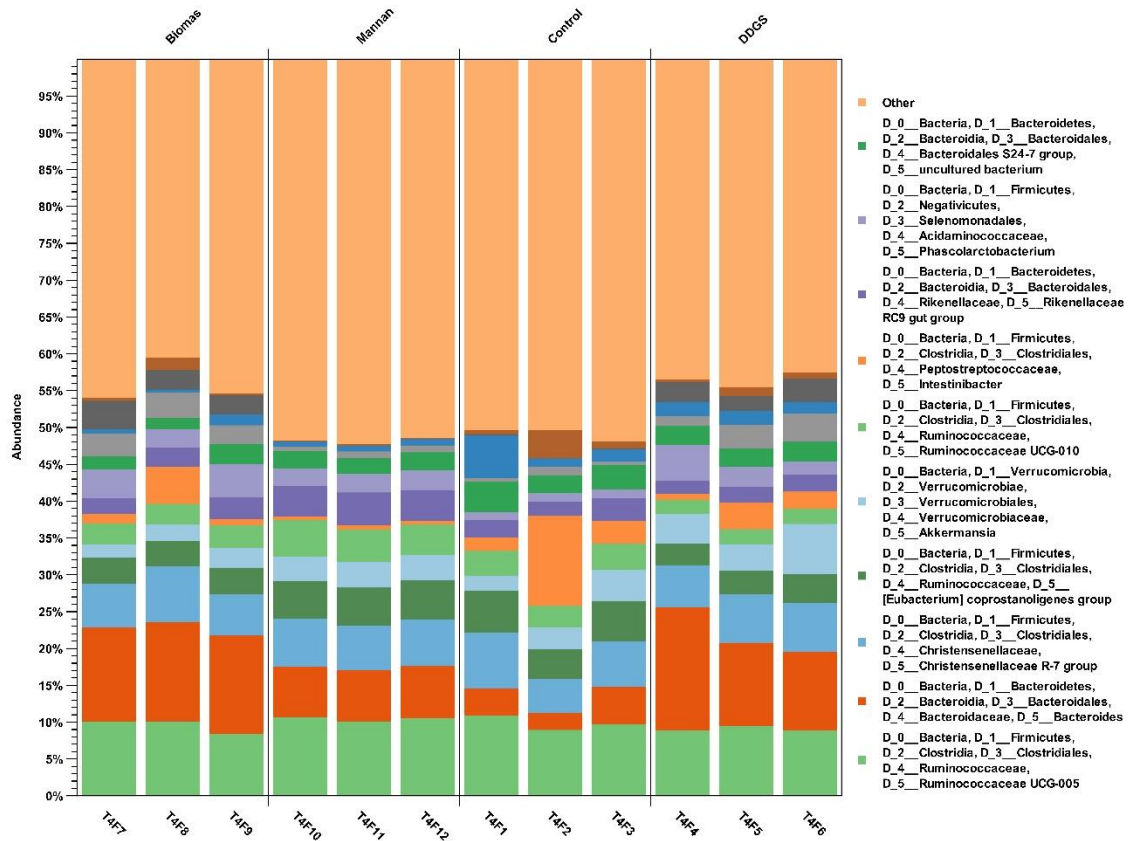


Figura 11.- Efecto de 3 diferentes fuentes de manana sobre abundancia del género de bacterias ruminales a las 4 horas de incubación.

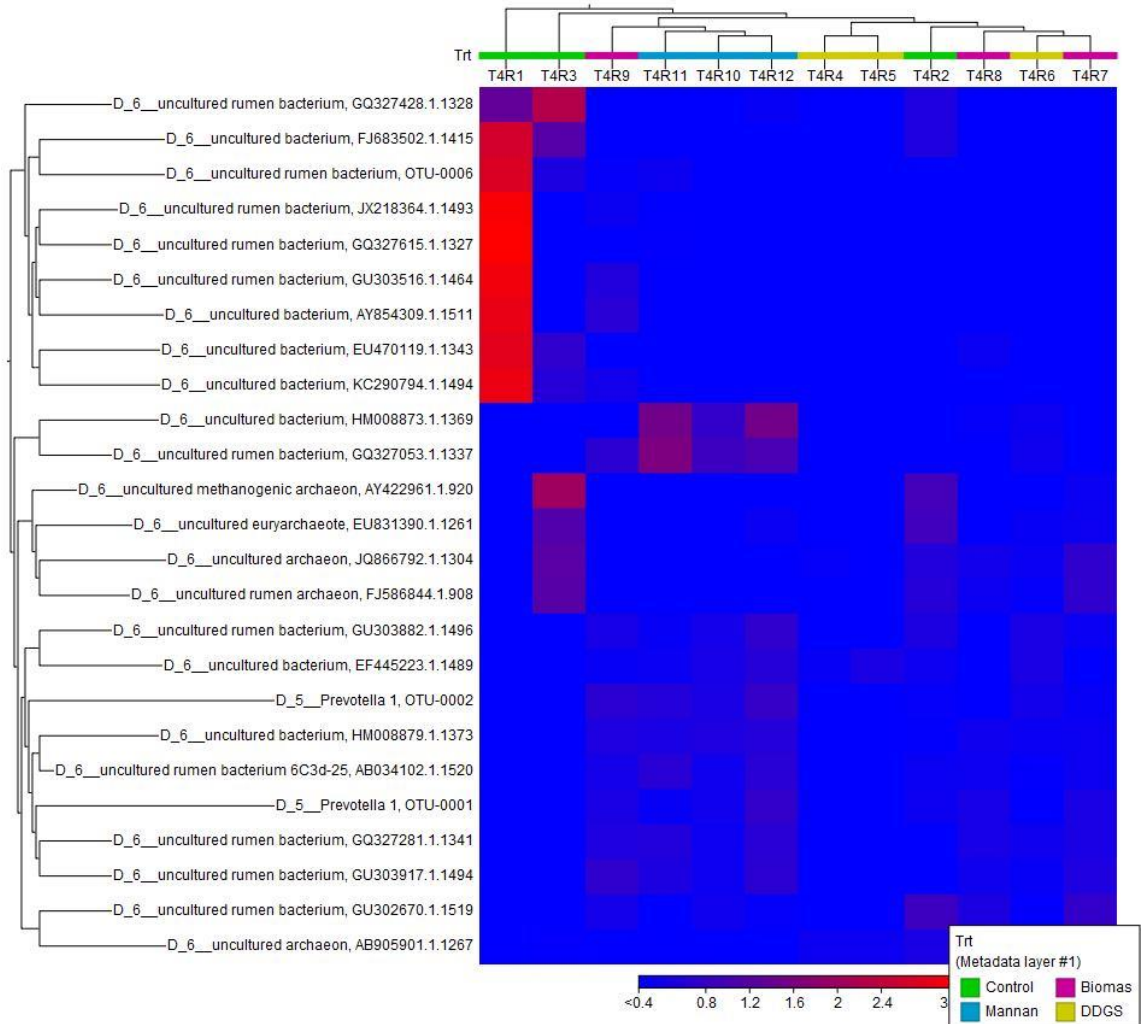


Figura 13.- Mapa térmico de microbiota de cultivo ruminal *in vitro* después de 4 horas de fermentación. Inoculante ruminal obtenido de una vaquilla alimentada con heno de alfalfa. Los sustratos utilizados fueron Bio-Mos® (1% W/V), granos secos de destilería más solubles de maíz (1% W/V; DDGS), manana puro (1% W/V), y un grupo Control sin sustrato.

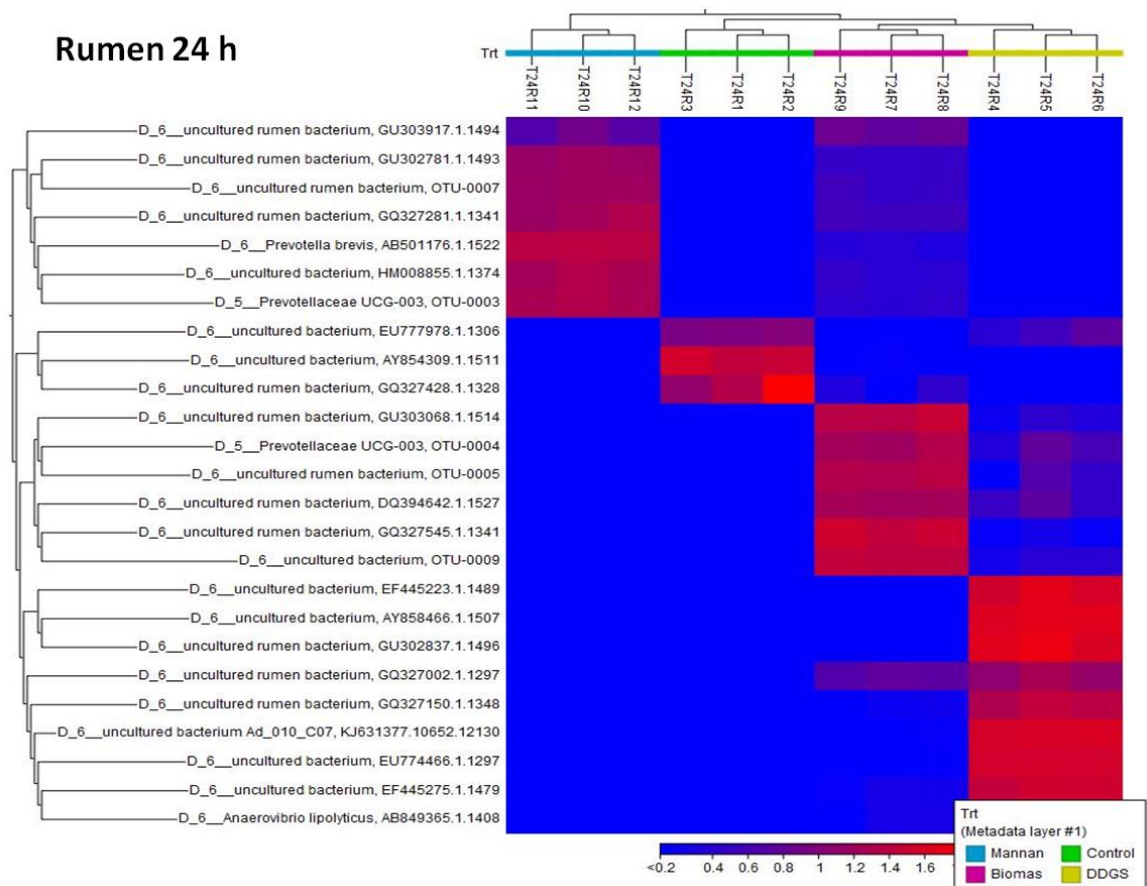


Figure 14.- Mapa térmico de microbiota de cultivo ruminal *in vitro* después de 24h de fermentación. Inoculante ruminal obtenido de una vaquilla alimentada con heno de alfalfa. Los sustratos utilizados fueron Bio-Mos® (1% W/V), granos secos de destilería más solubles de maíz (1% W/V; DDGS), manana puro (1% W/V), y un grupo Control sin sustrato.

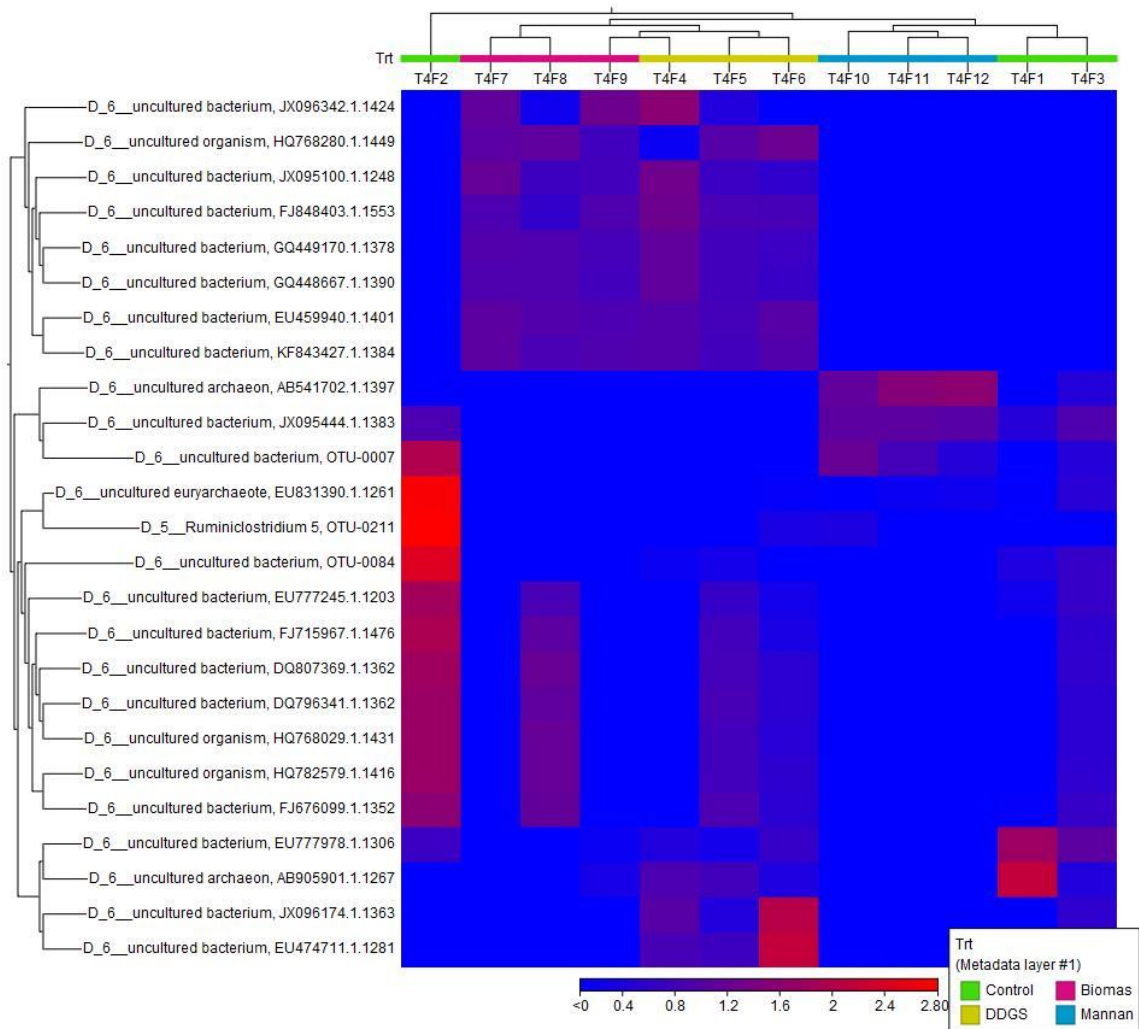


Figure 15.- Mapa térmico de microbiota de cultivo fecal *in vitro* después de 4 horas de fermentación. Inoculante ruminal obtenido de una vaquilla alimentada con heno de alfalfa. Los sustratos utilizados fueron Bio-Mos® (1% W/V), granos secos de destilería más solubles de maíz (1% W/V; DDGS), manana puro (1% W/V), y un grupo Control sin sustrato.

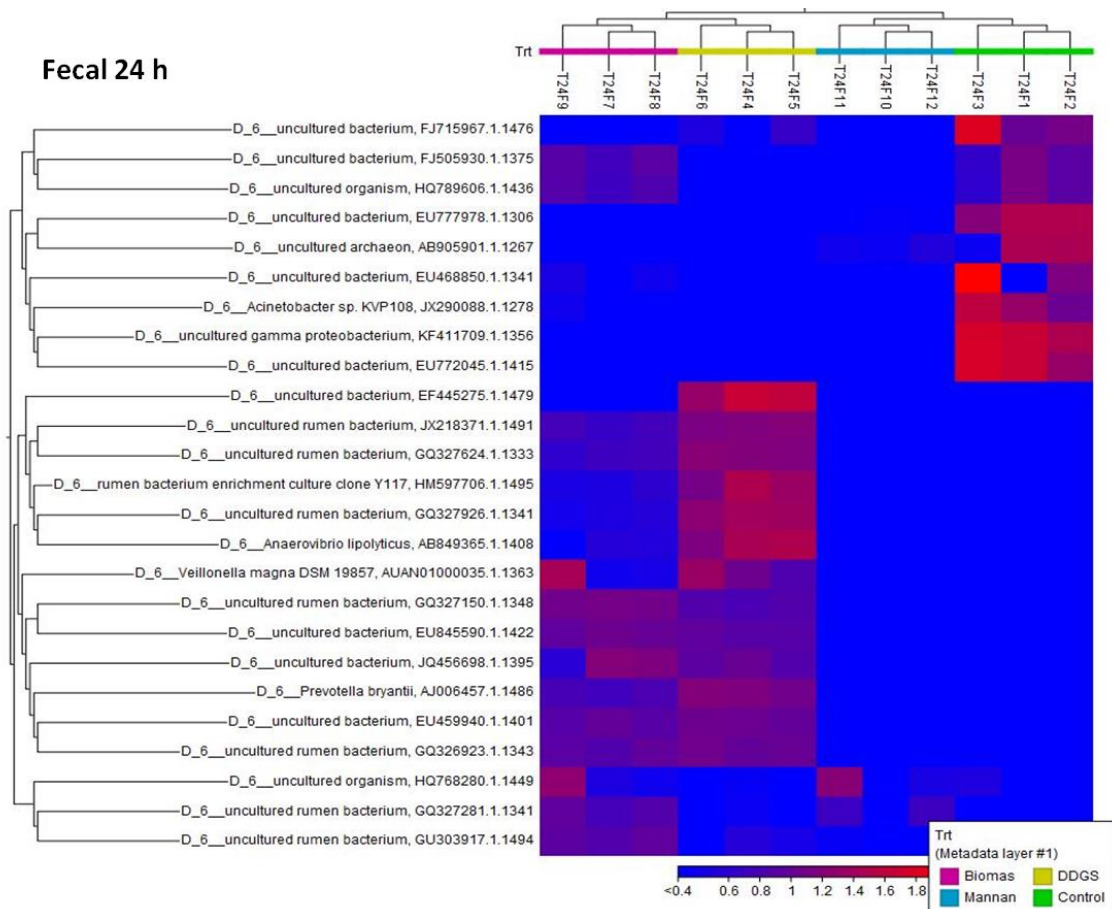


Figure 16.- Mapa térmico de microbiota de cultivo fecal *in vitro* después de 24 horas de fermentación. Inoculante ruminal obtenido de una vaquilla alimentada con heno de alfalfa. Los sustratos utilizados fueron Bio-Mos® (1% W/V), granos secos de destilería más solubles de maíz (1% W/V; DDGS), manana puro (1% W/V), y un grupo Control sin sustrato.

Fermentación ruminal *in vivo*

Los resultados de la Influencia de dos fuentes diferentes de manana en los patrones de fermentación ruminal de ovinos se presentan en la TABLA 5. No se encontraron diferencias significativas en producción de gas total, acetato (Fig. 17A), propionato (Fig. 17B), butirato (Fig. 18A), relación acetato: propionato (Fig. 18B), ácido valérico (Fig. 19A), ácido caproico (Fig. 19B), nitrógeno amoniacal (Fig. 20B) y metano (Fig. 21).

Se observaron diferencias significativas en la producción de gases iso (Fig. 20A) a las 0 y 3 horas, diferencia que se convirtió en tendencia a las 6 horas y no significativa después de este tiempo.

Otros estudios han observado cambios en la producción de AGVs. Miranda et al. (1996) observó un incremento en la producción de acetato y butirato con la adición de *Saccharomyces cerevisiae* en la dieta. Las diferencias observadas y los patrones están asociados a la disponibilidad del sustrato y la población microbiana (Song y Kenelly, 1990). Los cambios positivos de la suplementación de levaduras en la producción de AGVs se puede incrementar con el consumo de materia seca y por la proporción y cantidad de concentrado, FDN y PC en la dieta. En este mismo estudio, observó como la concentración de nitrógeno amoniacal fue menos en los grupos control que en aquellos suplementados con *Saccharomyces cerevisiae*. En muchos estudios no se han observado cambios en la digestibilidad *in situ* de proteína o la producción de nitrógeno amoniacal (Wohlt et al., 1991; Erasmus et al., 1992; Sievert y Shaver, 1993)

Se ha observado que la fermentación de los aminoácidos valina, leucina, isoleucina y prolina producen isobutirato, isovalerato, 2 metil butirato y valertato. La diferencia significativa observada durante las primeras horas puede deberse a la disponibilidad de aminoácidos en BioMos® que fueron utilizados rápidamente después de alimentarse, pasadas 6 horas postpandrial estos aminoácidos parecen haber sido utilizados casi en su totalidad por lo que la diferencia ya no se observa después de este tiempo (Shazly, 1952; Menahan y Shultz, 1964; Zarling y Ruchim, 1987)

Los niveles de butirato fueron anormalmente altos. En experimentos previos se ha observado como en ovinos defaunados del rumen, la proporción de butirato puede aumentar drásticamente (Chamberlain et al., 2009). Una de las razones de estos valores podría ser que la cantidad de muestra que se tomó cada 3 horas pudiera haber defaunado parcialmente el rumen de los animales. Los niveles de butirato más alto se encontraron en el grupo control, tomando en cuenta la capacidad de los mananoligosacáridos de neutralizar bacterias

clostridiales del medio podríamos asumir que la inclusión de BioMos® en la dieta pudo amortiguar el efecto de defaunación, así como evitar la actividad fermentativa productora de butirato de bacterias clostridiales.

Digestibilidad aparente

Los resultados de la influencia de dos fuentes de manana en las características de digestibilidad total en ovinos se presentan en la TABLA 4. No se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en digestibilidad de materia seca (Fig. 21A), materia orgánica (Fig. 21A), fibra detergente neutra (Fig. 21B) y fibra detergente acida (Fig. 21B). Se observaron diferencias significativas en la digestibilidad de tracto total de nitrógeno ($P=0.03$) y una tendencia en la digestibilidad de tracto total de almidón ($P=0.08$). La inclusión de BioMos® en la dieta disminuyó 6.89% la digestibilidad aparente de nitrógeno y tendió a disminuir 0.20 % la digestibilidad aparente de almidón (Fig. 22).

De entre los productos microbianos disponibles, los productos a base de levaduras son los más ampliamente utilizados como modificadores de la actividad ruminal. La suplementación de vacas lecheras con levaduras vivas (*Saccharomyces cerevisiae*) incrementó la digestibilidad de FDN en 12% y la digestibilidad aparente de MO 5% comparado con un grupo control (Marden et al., 2008). Estos incrementos en la digestibilidad fueron atribuidos a una reducción en el potencial redox y una concentración menor de ácido láctico. Se ha observado también que las levaduras aceleran el desarrollo del rumen en animales jóvenes estimulando bacterias celulolíticas y protozoarios (Chaucheyras-Durand and Fonty, 2002). La mejoría en el desempeño de rumiantes con la suplementación de levaduras puede atribuirse al efecto de depleción de oxígeno por las levaduras en el rumen (Jouany, 2006). Este efecto benéfico de las levaduras no se observó en este experimento y concuerda con Bitencourt et al., (2011) que no encontró diferencias en la digestibilidad de la fibra o consumo de materia seca en ganado lechero. Desnoyers et al., (2009) reporta en un metaanálisis del uso de levaduras en producción animal que la

suplementación de levaduras en la dieta no tiene influencia en la relación acetato: propionato, lo cual concuerda con este estudio al igual que Hady et al. (2012) quien probó el efecto de BioMos® en crecimiento y ecología ruminal de corderos Barki y no observó diferencia significativa en el perfil de ácidos grasos volátiles o nitrógeno amoniacal. Sin embargo, en este metaanálisis se observó un incremento en la digestibilidad aparente de materia orgánica y este efecto fue disminuido por la proporción de concentrado en la dieta y aumentado por la proporción de fibra detergente neutra en la dieta. Los estudios donde se ha evaluado BioMos® como fuente de levadura y manana en ovinos son muy escasos. Belal (2017) observó que la adición de *Saccharomyces cerevisiae* y pasta de aceituna disminuyó la digestibilidad de materia seca, proteína cruda, fibra detergente neutra y fibra detergente ácida en corderos Asawi. La variabilidad de los efectos podría deberse a la cepa o niveles de suplementación de la levadura utilizada.

Composición taxonómica de comunidades bacterianas ruminales *in vivo*

Todos los análisis de diversidad fueron realizados a las 24 horas incluyendo el total de todos los puntos de muestreo. El análisis por hora como se realizó en estudio *in vivo* formará parte de un análisis posterior dentro de otro proyecto. El efecto de los tratamientos sobre el microbioma ruminal *in vivo* se pueden observar en la FIGURA 23 (A y B). No se aprecian clústers definidos al agrupar los efectos por tiempo ni por tratamiento. La razón de esta falta de definición en la gráfica de componentes principales puede deberse a la forma del análisis de tiempos totales. El efecto de los tratamientos sobre abundancia relativa se muestra en la FIGURA 24. La abundancia de los géneros *Bacteroidia* y *Actinobacteria* aumentaron con la inclusión de BioMos®. *Clostridia* se mostró igual en los grupos C y BM, pero aumentó alrededor del 16% en el grupo DG. La abundancia de *Spirochaetes* disminuyó en el grupo BM y no parece haber efecto a *Methanobacteria*. Otros géneros identificados fueron *Coriobacteria*, *Fibrobacteria*, *Gammaproteobacteria* y *Erysipelotrichi*.

Composición taxonómica de comunidades bacterianas fecales in vivo

Todos los análisis de diversidad fueron realizados a las 24 horas incluyendo el total de todos los puntos de muestreo. El análisis por hora como se realizó en estudio in vivo formará parte de un análisis posterior dentro de otro proyecto. El efecto de los tratamientos sobre el microbioma intestinal *in vivo* se pueden observar en la FIGURA 25 (C y D). No se aprecian clústers definidos al agrupar los efectos por tiempos, pero se alcanza a apreciar una tendencia cuando los efectos se agrupan por tratamiento. La razón de esta falta de definición en la gráfica de componentes principales puede deberse a la forma del análisis de tiempos totales. El efecto de los tratamientos sobre abundancia relativa se muestra en la FIGURA 27. LA abundancia de los géneros *Clostridia* y *Actinobacteria* aumentaron con la inclusión de BioMos®. *Bacteroidia*, *Methanobacter* y *Coriobacteria* disminuyeron en el grupo BM en comparación con el grupo C. Otros géneros identificados fueron *Plantomycetia*, *Spirochaete*, *Bacilli* y *Methanomicrobia*.

La población bacteriana en dietas altas en concentrado (55%) se compone del phylum *Bacteroidetes* (66.9%) y *Firmicutes* (27.4%) (Zhang et al., 2014). En casos de acidosis subclínica se ha observado que el porcentaje de *Firmicutes* se eleva de 47.23% a 56.85% y el de *Bacteroidetes* desciende de 44.38% a 34.23% comprado con un grupo control. Del phylum *Bacteroidetes* el género más afectado puede ser *Prevotella* en estos casos, sin embargo, este descenso podría deberse al alto contenido de almidón en la dieta.

La falta de efectos observados en el cambio del microbioma puede deberse a la naturaleza del análisis. Se pueden observar muchas tendencias en los cambios de género entre tratamientos muy similares a los observados en el estudio in vitro. Cambios en el pH, el alto contenido de almidón en la dieta que limitaría la diversidad en la población ruminal, el tiempo de pasaje de los sustratos, capacidad redox entre otras condiciones ruminales pudieron ser los causantes de la variación observada en este estudio. Se ha discutido

anteriormente que las bacterias utilizadoras de manana suelen ser aquellas utilizadoras de hemicelulosa, estas bacterias se ven afectadas por dietas altas en concentrado. La razón de utilizar una dieta alta en concentrado en este estudio fue la simulación de una dieta comercial común en un sistema de producción intensivo, así como observar los efectos de estabilización de la flora ruminal que podrían tener los mananoligosacáridos de la dieta.

TABLA 4.- Influencia de dos fuentes diferentes de manana en las características de digestibilidad total en ovinos Arcott x Arcott canadiense (N=6).

	Tratamiento ^a			SEM	<i>P-value</i>
	C	BM	DG		
Consumo (g/d) ^b					
MS	7021	6864	7456		
MO	6877	6725	7302		
FDN	2404	2319	2558		
FDA	864	856	898		
N	179	175	194		
Almidón	2805	2729	2976		
Excreción					
Fecal (g/d)					
MS	1525	1713	1751		
MO	1496	1680	1718		
FDN	892	1008	1002		
FDA	565	613	601		
N	39.9	49.2	52.6		
Almidón	10.9	16.3	14.9		
Digestibilidad					
Aparente %					
MS	78.2	75.3	76.5	0.01	0.32
MO	78.2	75.3	76.5	0.01	0.33
FDN	62.6	57.1	60.6	0.02	0.36
FDA	33.9	29.2	33.6	0.05	0.74
N ^d	78.3 ^a	72.9 ^b	73.4 ^b	0.02	0.03
Almidón	99.6 ^a	99.4 ^b	99.5 ^{ab}	<0.001	0.08

^a Los animales fueron suplementados con dietas suplementadas con Bio-Mos (BM) o granos secos de destilería más solubles de maíz (GD) como fuentes de manana. La dieta control (CON) no fue suplementada con manana

^bMS, materia seca; MO, materia orgánica; FDN, fibra detergente neutra; FDA, fibra detergente acida; N, nitrógeno.

^dNitrógeno corregido por producción endógena.

TABLA 5.- Influencia de dos fuentes diferentes de manana en las características de fermentación ruminal en ovinos Arcott x Arcott canadiense (N=6).

	Tratamiento ^a			SEM	P-value
	C	BM	DG		
Gas total, mL					
0	80.6	78.3	81.3	5.90	0.90
3	111	103	112	13.5	0.64
6	102	107	113	12.5	0.47
9	128	123	134	19.9	0.71
12	131	130	143	16.0	0.63
Acetato %					
0	45.0	47.0	46.9	3.20	0.79
3	45.6	46.7	45.5	3.08	0.89
6	43.4	46.7	44.3	2.70	0.49
9	40.5	46.3	42.6	3.01	0.15
12	38.2	44.5	41.5	0.27	0.28
Propionato %					
0	24.0	24.4	24.2	1.19	0.95
3	24.8	23.5	26.1	2.14	0.59
6	24.2	24.3	27.0	2.11	0.44
9	26.1	24.5	25.7	2.06	0.80
12	24.3	24.7	27.6	2.27	0.39
Butirato %					
0	23.6	20.3	21.5	4.15	0.71
3	23.7	22.5	21.6	4.13	0.86
6	26.6	22.5	22.2	3.57	0.47
9	27.9	23.1	25.3	4.19	0.53
12	31.8	24.4	24.3	4.18	0.27
NH ₃ -N, mM					
0	5.73	5.81	6.62	1.00	0.66
3	3.58	4.98	5.08	1.59	0.55
6	4.05	5.31	4.39	1.49	0.64
9	2.36	6.32	4.99	1.12	0.08
12	3.01	6.49	4.37	1.27	0.46
AC/PR					
0	1.94	1.95	2.00	2.39	0.11
3	1.90	2.06	1.90	2.03	0.13
6	1.82	2.00	1.77	2.00	0.14
9	1.66	2.00	1.69	1.98	0.22
12	1.62	1.91	1.56	1.71	0.41

^a Los animales fueron suplementados con dietas suplementadas con Bio-Mos (BM) o granos secos de destilería más solubles de maíz (GD) como fuentes de manana. La dieta control (CON) no fue suplementada con manana .

TABLA 6. Influencia de dos fuentes diferentes de manana en las características de fermentación ruminal en ovinos Arcott x Arcott canadiense (N=6).

	Tratamiento ^a			SEM	<i>P-value</i>
	CON	BM	DG		
Iso %					
0	2.74 ^a	2.82 ^a	1.82 ^b	0.25	0.05
3	1.69 ^{ab}	2.02 ^a	1.37 ^b	0.36	0.04
6	1.58 ^{ab}	1.81 ^a	1.21 ^b	0.35	0.06
9	0.21	1.60	1.16	0.36	0.28
12	1.14	1.46	0.97	0.27	0.39
Metano mM					
0	23.2	21.8	22.9	2.23	0.86
3	31.4	29.3	29.4	3.45	0.85
6	29.4	29.7	28.7	2.86	0.95
9	34.9	33.8	35.4	4.86	0.92
12	37.5	35.7	35.6	3.95	0.82

^a Los animales fueron suplementados con dietas suplementadas con Bio-Mos (BM) o granos secos de destilería más solubles de maíz (GD) como fuentes de manana. La dieta control (CON) no fue suplementada con manana.

Medias en la misma hilera con letras distintas difieren ($P < 0.05$).

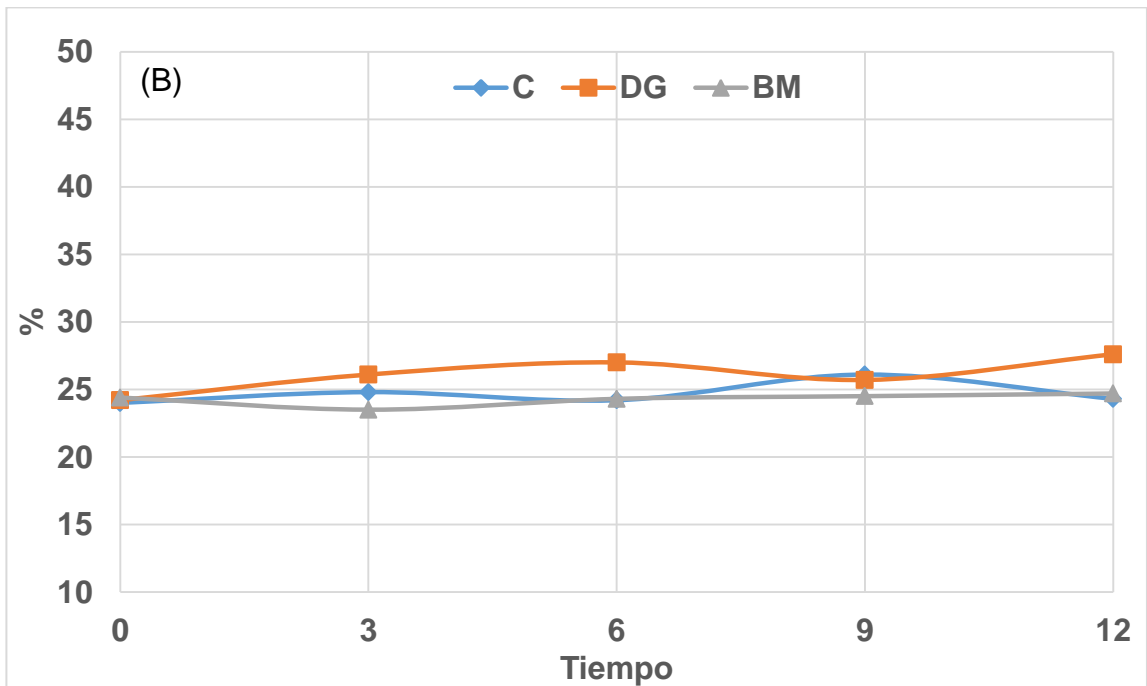
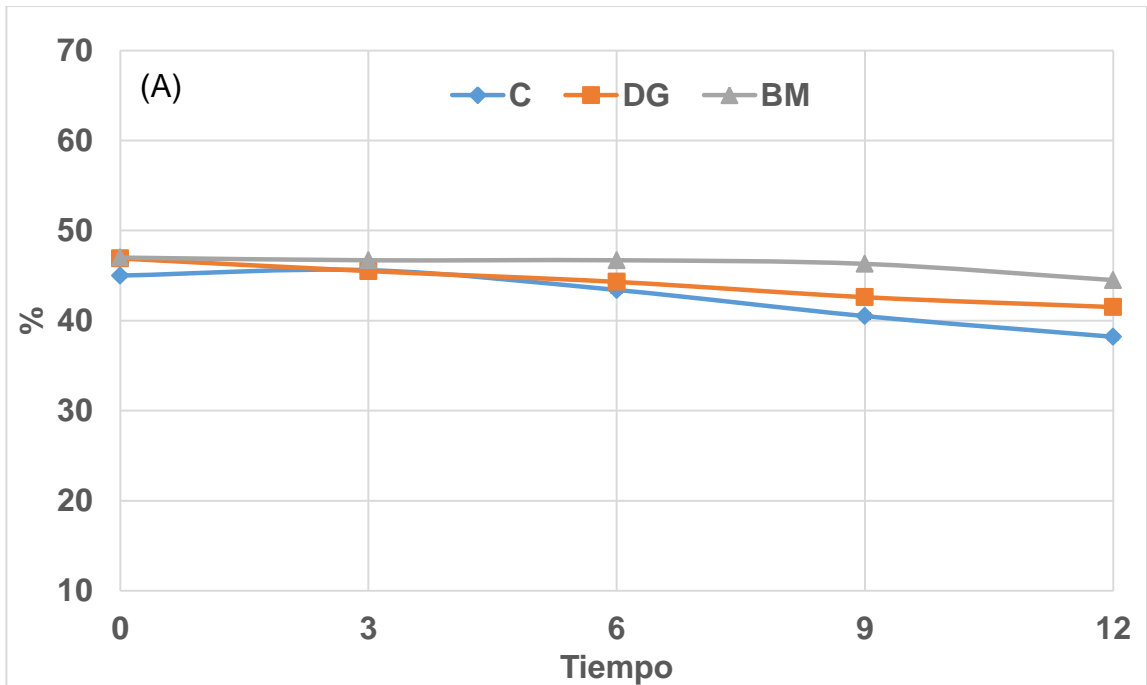


Figura 17.- Efectos de dos diferentes fuentes de manaña sobre la producción de (A) acetato y (B) propionato a las 0, 3, 6, 9 y 12 horas. Los animales fueron suplementados con dietas conteniendo Bio-Mos (BM) o granos secos de destilería más solubles de maíz (GD) como fuentes de manaña. La dieta control (CON) no fue suplementada con manaña.

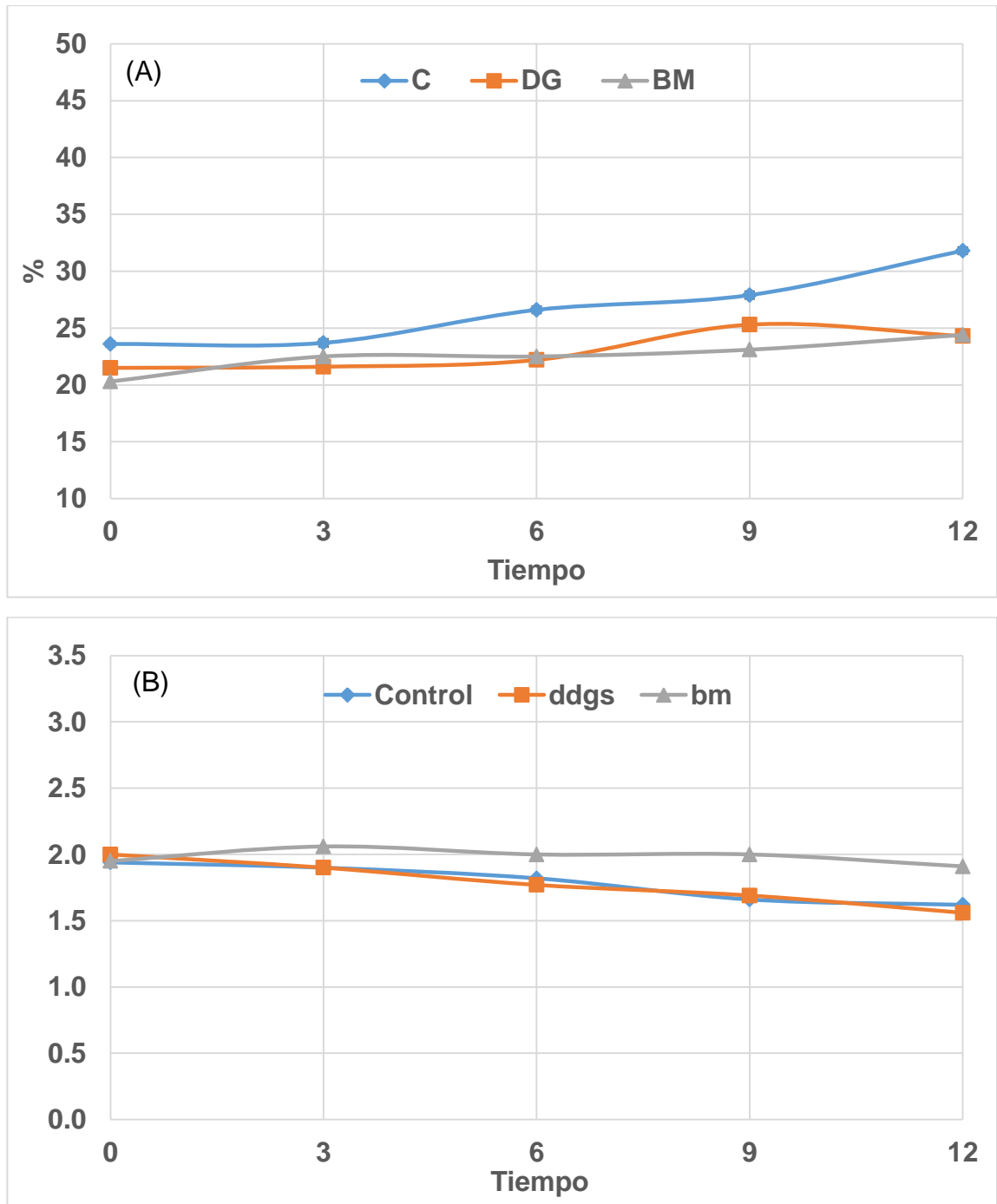


Figura 18.- Efectos de dos diferentes fuentes de manaña sobre la producción de (A) butirato y (B) relación acetato/propionato a las 0, 3, 6, 9 y 12 horas. Los animales fueron suplementados con dietas suplementadas con Bio-Mos (BM) o granos secos de destilería más solubles de maíz (GD) como fuentes de manaña. La dieta control (CON) no fue suplementada con manaña.

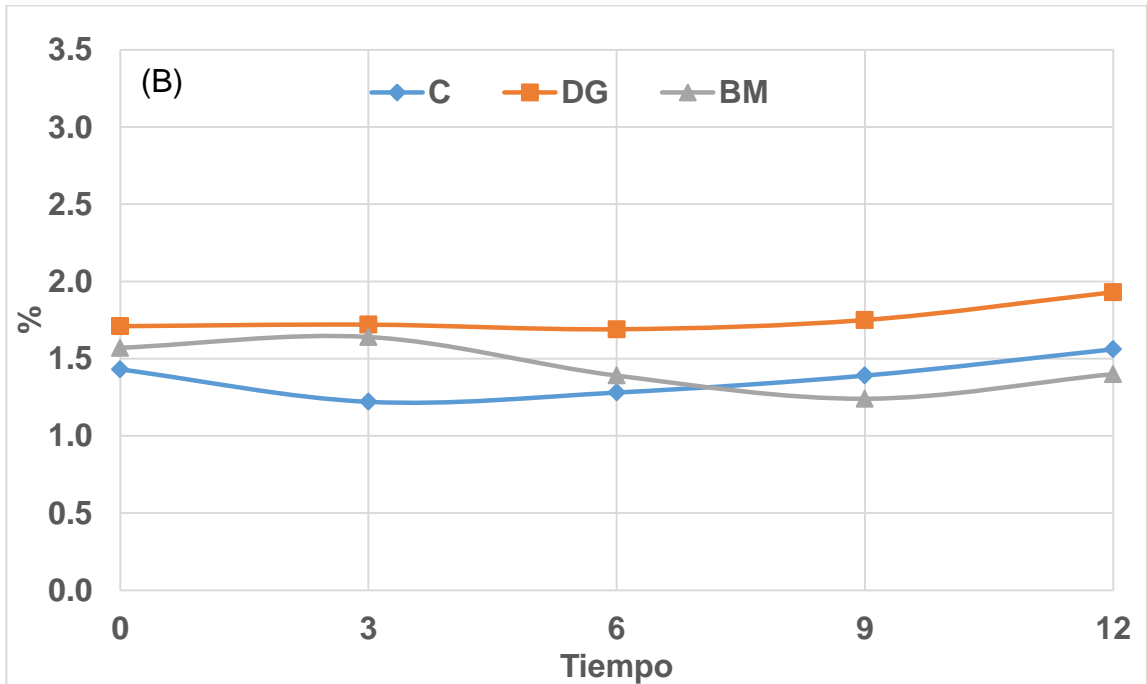
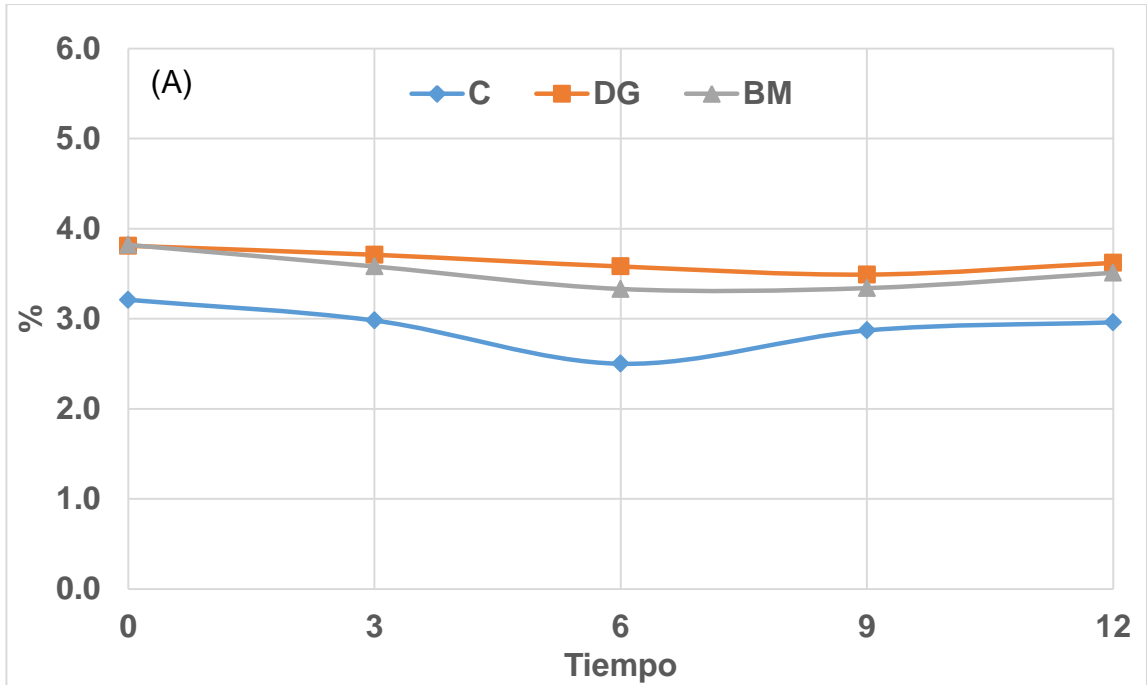


Figura 19.- Efectos de dos diferentes fuentes de manaña sobre la producción de (A) ácido valérico y (B) ácido caproico a las 0, 3, 6, 9 y 12 horas. Los animales fueron suplementados con dietas suplementadas con Bio-Mos (BM) o granos secos de destilería más solubles de maíz (GD) como fuentes de manaña. La dieta control (CON) no fue suplementada con manaña.

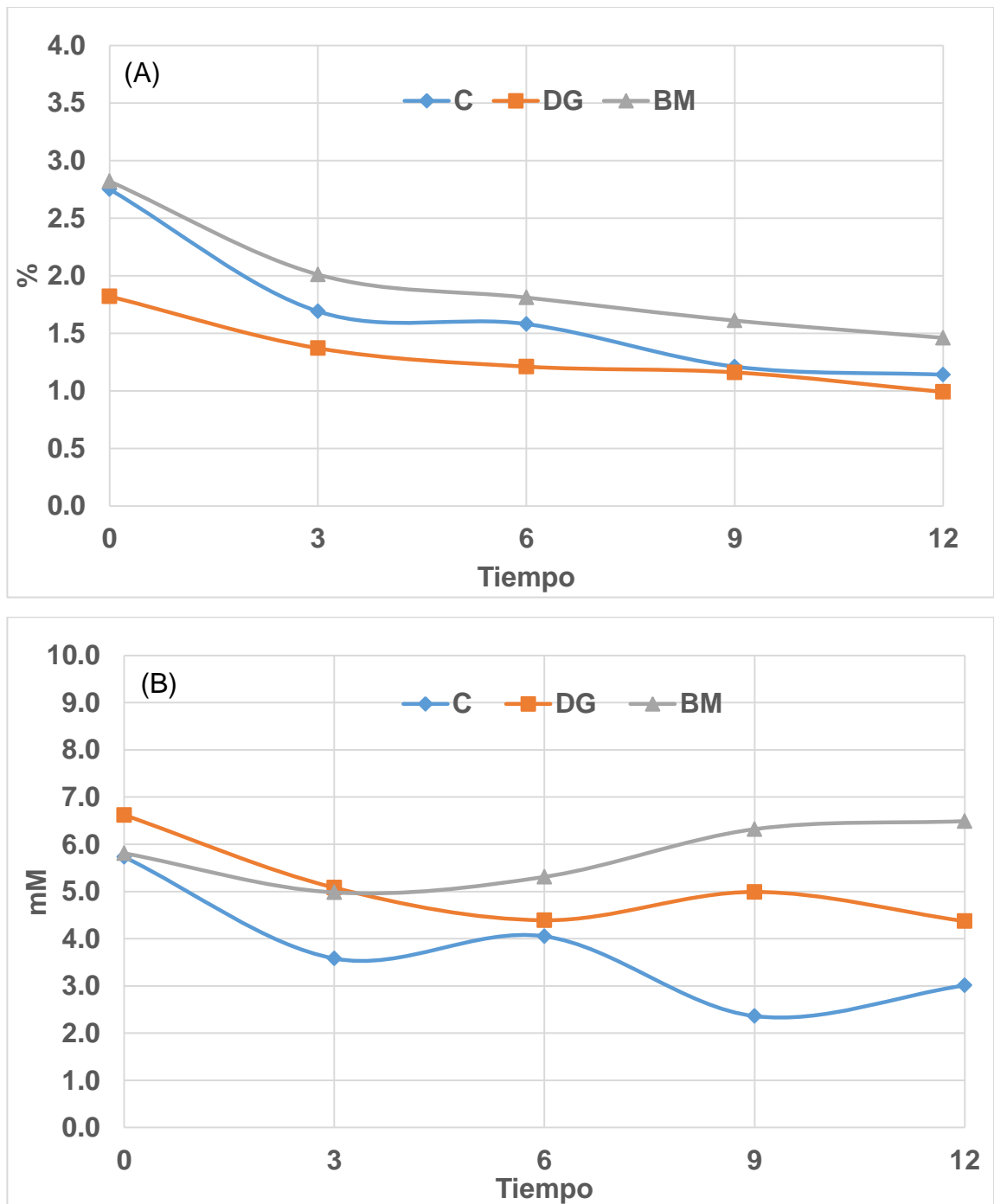


Figura 20.- Efectos de dos diferentes fuentes de manaña sobre la producción de (A) gases Iso y (B) nitrógeno amoniacal a las 0,3,6,9 y 12 horas. Los animales fueron suplementados con dietas suplementadas con Bio-Mos (BM) o granos secos de destilería más solubles de maíz (GD) como fuentes de manaña. La dieta control (CON) no fue suplementada con manaña.

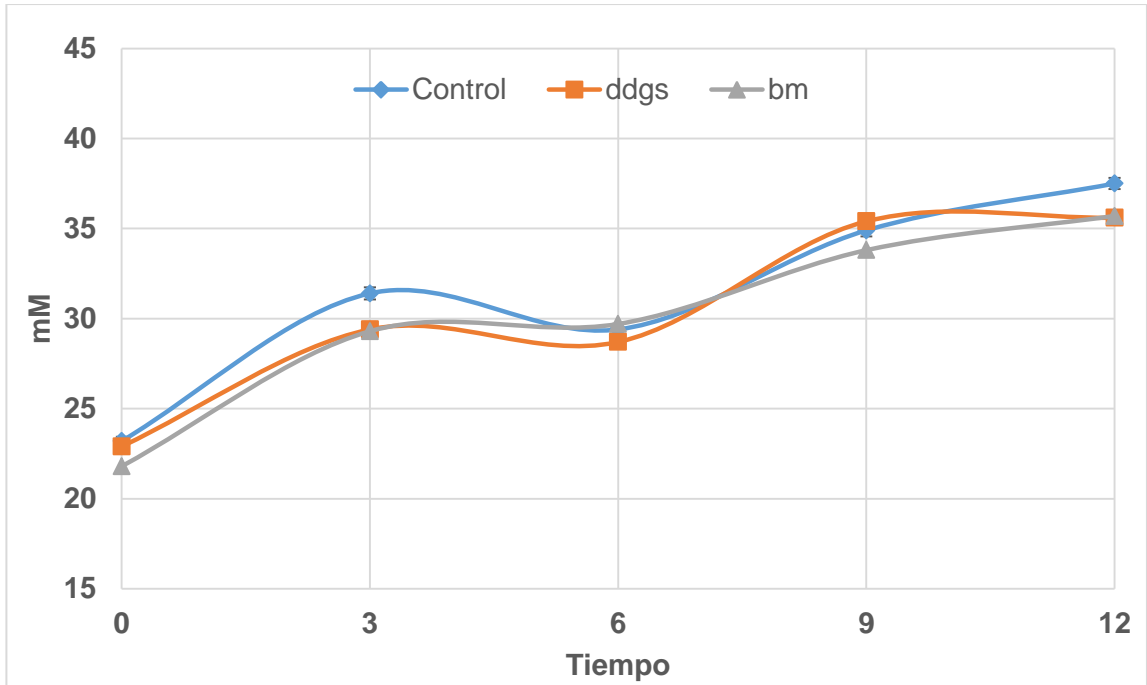


Figura 21.- Efecto de dos diferentes fuentes de manana sobre producción de metano a las 0, 3, 6, 9 y 12 horas. Los animales fueron suplementados con dietas suplementadas con Bio-Mos (BM) o granos secos de destilería más solubles de maíz (GD) como fuentes de manana. La dieta control (CON) no fue suplementada con manana.

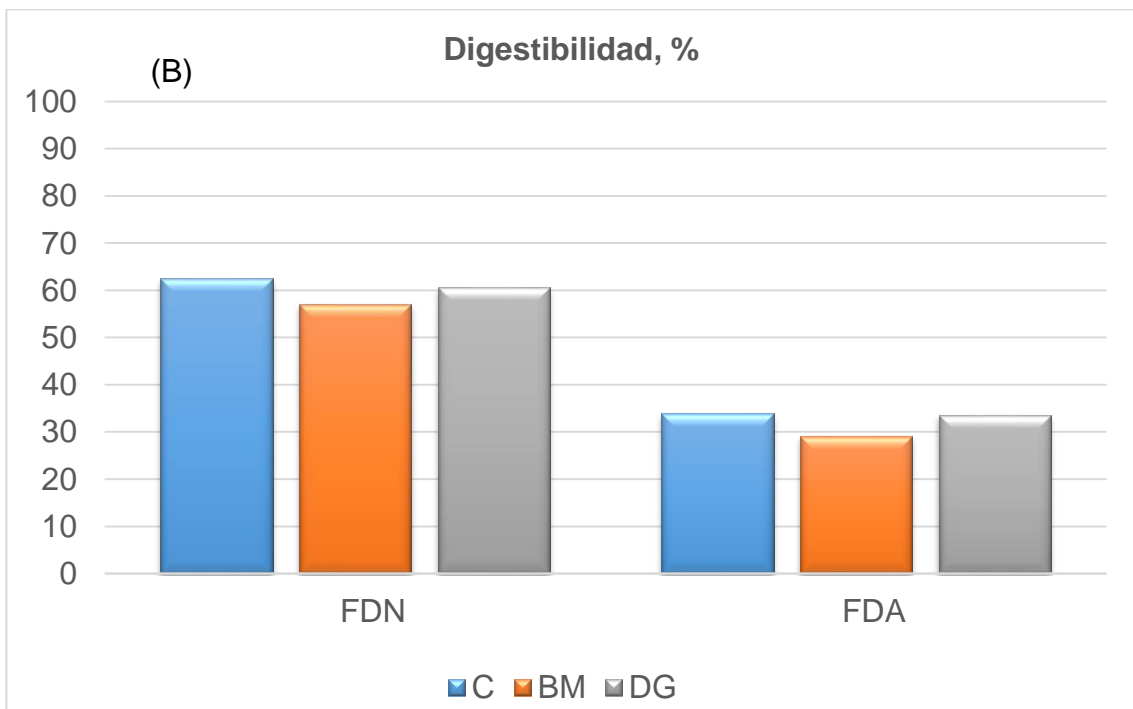
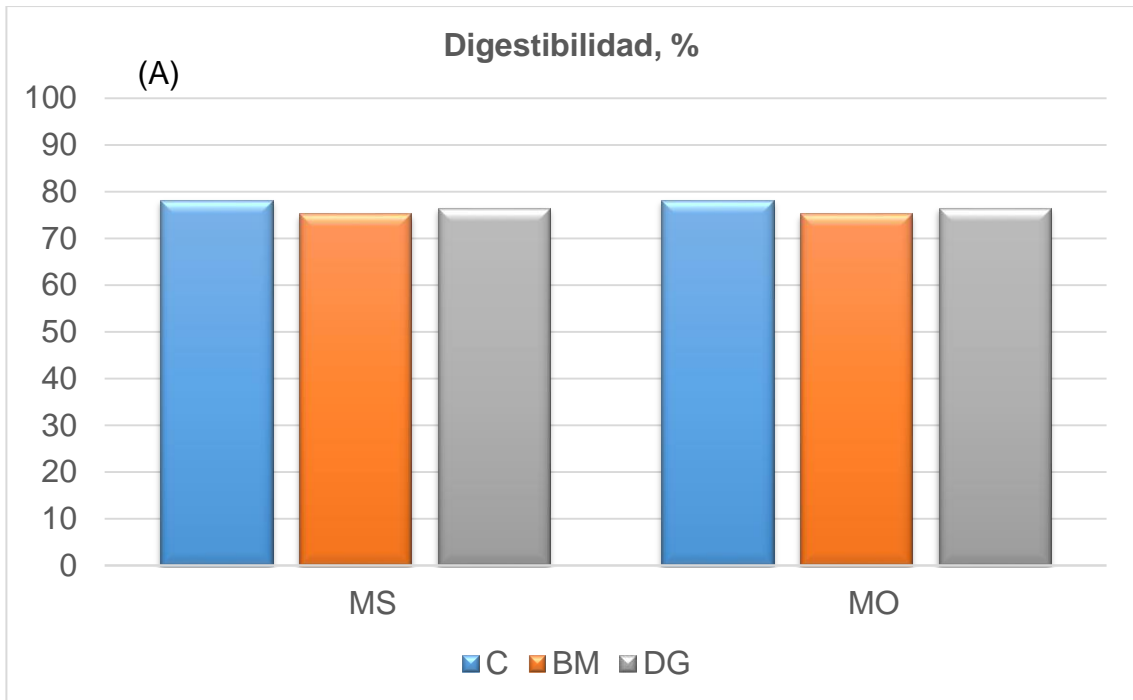


Figura 22.- Efecto de dos diferentes fuentes de manana sobre la digestibilidad de materia seca (A), materia orgánica (A), fibra detergente neutra (B) y fibra detergente acida (B). Los animales fueron suplementados con dietas conteniendo Bio-Mos (BM) o granos secos de destilería más solubles de maíz (GD) como fuentes de manana. La dieta control (CON) no fue suplementada con manana.

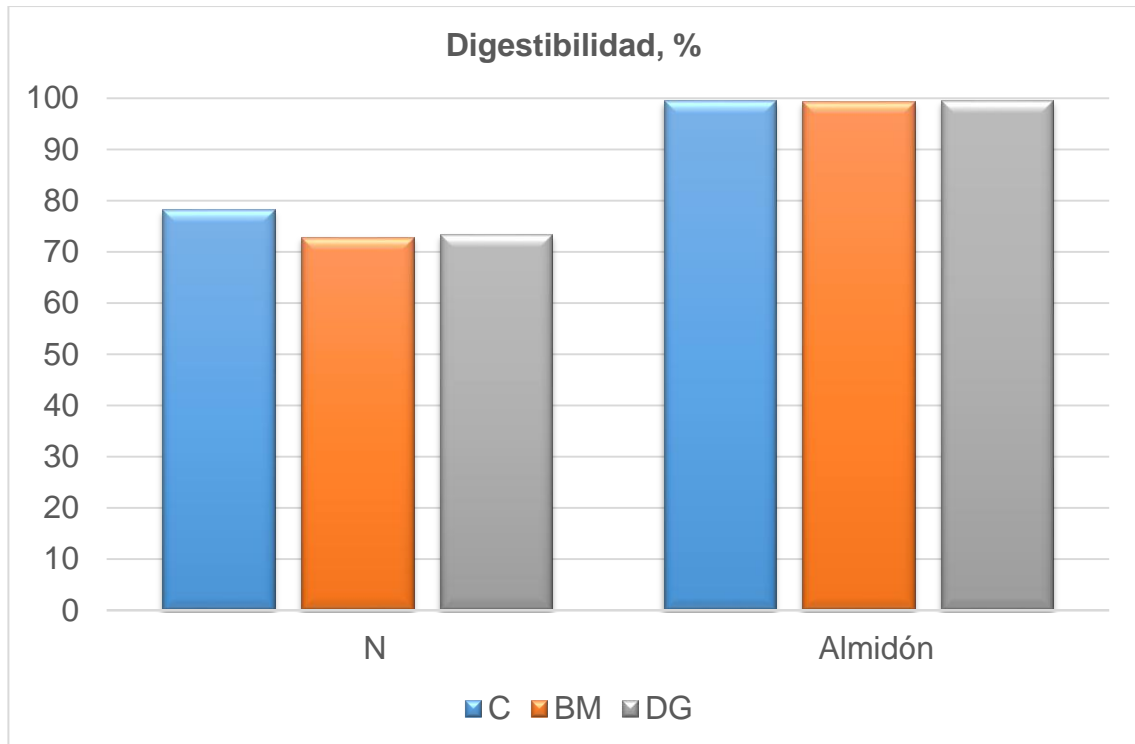


Figura 23.- Efecto de dos diferentes fuentes de manana sobre digestibilidad de nitrógeno (N) y almidón. Los animales fueron suplementados con dietas conteniendo Bio-Mos (BM) o granos secos de destilería más solubles de maíz (GD) como fuentes de manana. La dieta control (CON) no fue suplementada con manana.

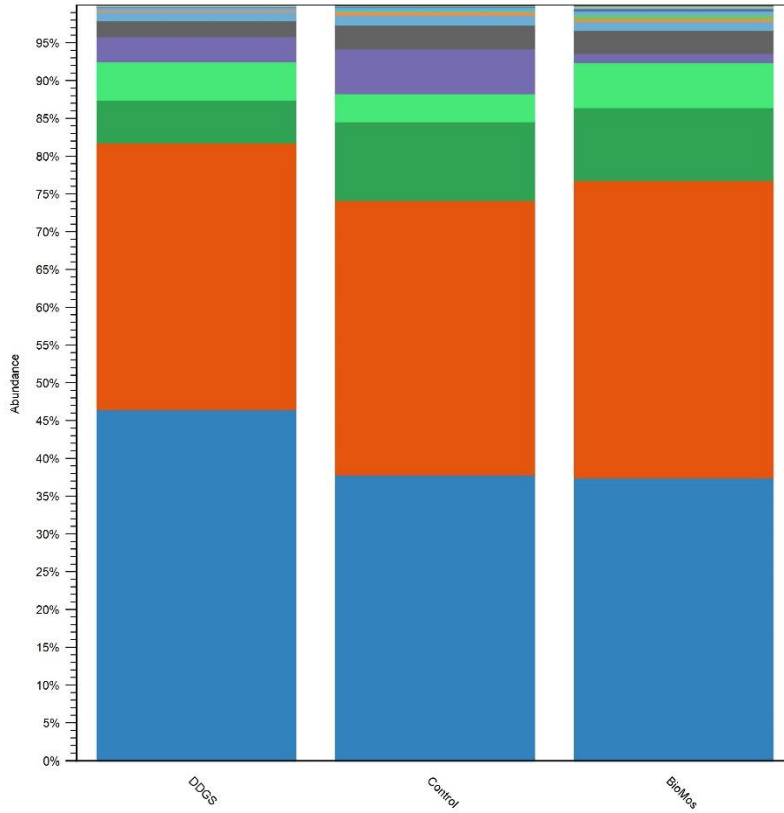
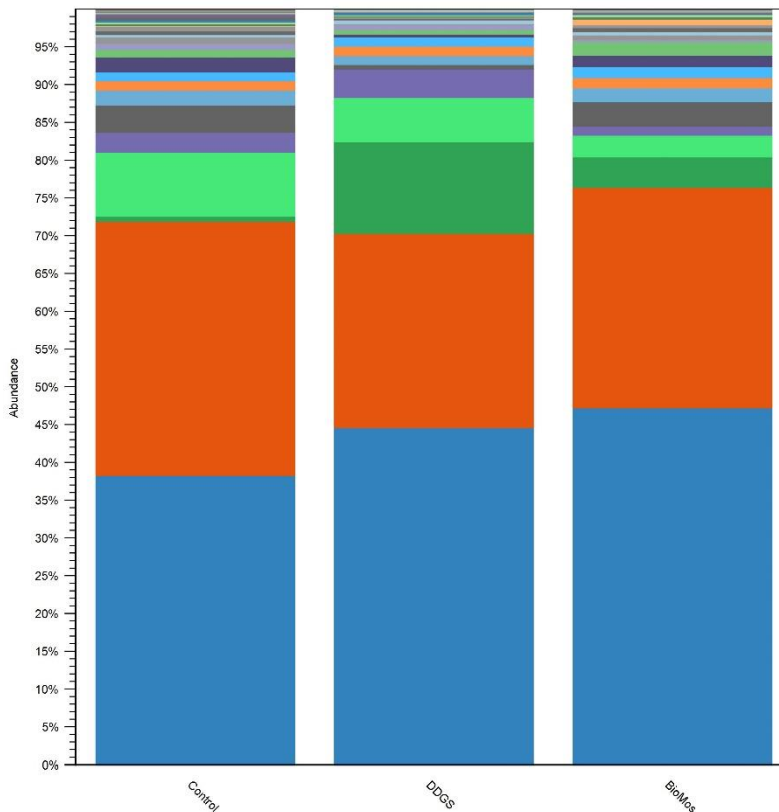


Figura 25.- Efecto de 2

diferentes fuentes de manana sobre abundancia del género de bacterias ruminales. Muestra obtenida de corderos canulados del rumen a las 0, 3, 6, 9 y 12 horas durante dos días. Los animales fueron alimentados con C) Control (animales alimentados con la dieta basal sin la adición de manoligosacáridos. BM) Bio-Mos® (animales alimentados con dieta basal con la adición de 4.5 gr/kg MS de Bio-Mos®) y DG) granos secos de destilería más

solubles como control positivo (animales alimentados con dieta basal con la adición de 31.4 g/kg MS de DDGs).



- k__Archaea, p__Euryarchaeota, c__Methanomicrobia
- k__Bacteria, p__Firmicutes, c__Bacilli
- N/A
- k__Bacteria, p__Spirochaetes, c__Spirochaetes
- k__Bacteria, p__Planctomycetes, c__Planctomycetia
- k__Archaea, p__Euryarchaeota, c__Methanobacteria
- k__Bacteria, p__Actinobacteria, c__Coriobacteria
- k__Bacteria, p__Actinobacteria, c__Actinobacteria
- k__Bacteria, p__Bacteroidetes, c__Bacteroidia
- k__Bacteria, p__Firmicutes, c__Clostridia

Figura 26.- Efecto de 2 diferentes fuentes de manana sobre abundancia del género de bacterias intestinales. Muestra obtenida de corderos de forma directa a las 0, 3, 6, 9 y 12 horas durante dos días. Los animales fueron alimentados con C) Control (animales alimentados con la dieta basal sin la adición de manoligosacáridos. BM) Bio-Mos® (animales alimentados con dieta basal con la adición de 4.5 gr/kg MS de Bio-Mos®) y DG) granos secos de destilería más solubles como control positivo (animales alimentados con dieta basal con la adición de 31.4 g/kg MS de DDGs).

CONCLUSIÓN

Referente a la prueba *in vitro*, algunas de las propuestas planteadas acerca de la utilización de manana podrían ser correctas. El *phylum Bacteroidetes* especialmente el género *Prevotella* parece ser capaz de producir mananasas y manosidasas después de 4 horas de actividad. Este tiempo podría estar relacionado con el tiempo que requiere para la la expresión de genes para la producción de estas enzimas, el tiempo para aumentar su abundancia y provocar un efecto marcado y/o el tiempo en el que otros carbohidratos solubles fueron utilizados del medio primero que manana. Estas bacterias parecen utilizar nitrógeno amoniacal del medio como fuente de nitrógeno al mismo tiempo que provocan un cambio en el microbioma ruminal que favorecería la producción de propionato y reduciría la producción de acetato. La dieta parece ser un factor importante que afecta los efectos de manana sobre la población bacteriana. Dietas altas en hemicelulosas podrían favorecer los efectos de manana o el efecto podría ser confundido por una abundancia normal de bacterias hemicelulolíticas. Dietas altas en concentrado limitan la presencia de bacterias utilizadoras de hemicelulosas y los beneficios de la utilización de manana para efectos de digestibilidad y fermentación ruminal se ven afectados. Los resultados no observados en el estudio *in vivo* dan una idea de la complejidad del equilibrio de la reacciones químicas que se dan en el rumen. A pesar de observar algunos cambios en el microbioma que podría favorecer la producción de ácidos grasos volátiles benéficos, como butirato o propionato, la actividad no fue suficiente para lograr este efecto. Dentro de las razones involucradas en esta falta de efecto podrían estar, pH ruminal, inter-conversión de productos metabólicos, predación de bacterias y autorregulación de poblaciones microbianas, mayor disponibilidad de sustratos más preferibles por las diferentes bacterias que pudieran utilizar manana. La forma de medición de los resultados *in vivo* también podría estar causando una confusión en los resultados y será de interés ver los cambios en el microbioma ruminal por hora y tratamiento.

El comportamiento de BioMos® y manana puro fue similar en tiempo y respuesta mas no en intensidad. La reacción acelerada y con mayor potencia

de manana sugiere que manana podría ser uno de los componentes principales de las levaduras que les confiere sus propiedades probióticas y prebióticas. Lamentablemente, en este estudio no pudimos incluir manana puro para el estudio *in vivo*.

Más estudios son necesarios sobre la actividad enzimática bacteriana específica sobre las levaduras para desarrollar una nueva alternativa de simbiótico que pueda ayudar a la eliminación de los antibióticos en animales engordados en corral.

LITERATURA CITADA

- Angelakis, E., D. Bastelica, A. Ben, A. El, A. Dutour, J. Mege, M. Alessi, and D. Raoult. 2012. Microbial Pathogenesis An evaluation of the effects of *Lactobacillus ingluviei* on body weight , the intestinal microbiome and metabolism in mice. *Microb. Pathog.* 52:61–68.
- Arcand, N., D. Kluepfel, F. W. Paradis, R. Morosoli, and F. Shareck. 1993. Beta-mannanase of *Streptomyces lividans* 66: cloning and DNA sequence of the *manA* gene and characterization of the enzyme. *Biochem. J.* 290:857–863.
- Bacmap.whisartlab.com/organisms/1076
- Belal S.O. 2017. The effects of feeding olive cake and *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on performance, nutrient digestibility and blood metabolites of Awassi lambs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 231:131–137 .
- Bitencourt, L.L., Silva, J.R.M., Oliveira, B.M.L., Junior, G.S.D., Lopes, F., Junior, S.S., Zacaroini, O.F., and Pereira, M.V. 2011. Diet digestibility and performance of dairy cows supplemented with live yeast. *Sci. Agric.* 68:301-307.
- Brown, A.J., Goldsworthy, S.M., Barnes, A.A., Eilert, M.M., Tcheang, L., Daniels, D., Muir, A.I., Wigglesworth, M.J., Kinghorn, I., Fraser, N.J., et al. (2003). The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J. Biol. Chem.* 278:11312-11319.
- Callaway, E.S., and Martin, S.A.. 1997. Nutrition , feeding , and calves effects of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose. *J. Dairy Sci.* 80:2035–2044.
- Cani, P.D., Hoste, S., Guiot, Y., and Delzenne, N.M. (2007). Dietary nondigestible carbohydrates promote L-cell differentiation in the proximal colon of rats. *Br. J. Nutr.* 98:32–37.

- Chaucheyras-Durand, F., and Durand, H. 2010. Probiotics in animal nutrition and health. *Benefic. Microbes*. 1:3– 9.
- Chaucheyras-Durand, F., Fonty, G., Bertin, G., Salmon, J.M., Gouet, P., 1996. Effects of a strain of *Saccharomyces cerevisiae* (Levucell S.C.) a microbial additive for ruminants, on lactate metabolism in vitro. *Can. J. Microbiol.* 42:927-933.
- Chen, X., Y. Cao, Y. Ding, W. Lu, and D. Li. 2007. Cloning, functional expression and characterization of *Aspergillus sulphureus* β -mannanase in *Pichia pastoris*. *J. Biotechnol.* 128:452–461.
- Correidora, J., Rabuñal, R. and Alonso, M.P. 2017. *Streptococcus bovis*: 100 years of an Intriguing Pathogen. *Clin. Microbiol. Newsl.* 39:1–9.
- Cotter, P. D., C. Hill, and R.P. Ross. 2005. Bacteriocins : developing innate immunity for food. *Nature Rev. Microbiol.* 3:777–788.
- Cummings, J.H., and Bingham, S.A. (1987). Dietary fiber, fermentation and large bowel cancer. *Cancer Surv.* 6:601–621.
- Cuskin, F., E. C. Lowe, M. J. Temple, Y. Zhu, N. A. Pudlo, N.T. Porter, K. Urs, A.J. Thompson, A. Rogowski, B. S. Hamilton, R. Chen, T. J. Tolbert, D. Bracke, W. Vervecken, Z. Hakki, G. Speciale, L. Jose, A. Day, M. J. Peña, R. Mclean, M. D. Suits, B. Boraston, T. Atherly, C.J. Ziemer, S. J. Williams, and G.J. Davies. 2016. *NATURE*. Human gut *Bacteroidetes* can utilize yeast mannan through a selfish mechanism. 517:165–169.
- Desnoyers M., Ginger-Reverdin, S., Berin, G., Duvaux-Ponter, C. and Sauvart, D. Meta-analysis of the influence of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on ruminal parameters and milk production of ruminants. *J. Dairy Sci.* 92:1620–1632.
- Duffaud, G.D., C.M. McCutchen, P. Leduc, K. N. Parker, and Kelly, R.M.. 1997. Purification and characterization of extremely thermostable β - mannanase, β -mannosidase, and α -galactosidase from the hyperthermophilic eubacterium *Thermotoga neapolitana* 5068. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:169–177.

- Duncan, S. H., P. Louis, Thomson, J.M., and Flint, H.J. 2009. The role of pH in determining the species composition of the human colonic microbiota. 11:2112–2122.
- Erasmus, L.J., Botha, P.M. and Kistner, A., 1992. Effect of yeast culture supplement on production, rumen fermentation, and nitrogen flow in dairy cows, J. Dairy Sci., 75:3056-3065.
- Faciola, A. P., and Broderick, G.A. 2013. Effects of feeding lauric acid on ruminal protozoa numbers , fermentation , and digestion and on milk production in dairy cows 1. J. Anim. Sci.:2243–2253.
- Ferreira,H.M.,and E.X.F. Filho. 2004. Purification and characterization of a β -mannanase from *Trichoderma harzianum* strain T4. Carbohydr. Polym. 57:23–29.
- Filho EXF (1998) Hemicellulases and biotechnology. In: Pandalai SG (ed) Recent research developments in microbiology. Research Signpost, Trivandrum.165–176.
- Gorazd A., Wallace, R.J. and Flint, H.J.. 1997. Phenotypic Diversity among Ruminal Isolates of *Prevotella ruminicola* : Proposal of *Prevotella brevis* sp. nov., *Prevotella byantii* sp. nov., and *Prevotella albensis* sp. nov. and redefinition of *Prevotella ruminicola*. Int. J. Syst. Bacteriol. 47:284-288.
- Griswold K.E. and Mackie, R.I.. 1997. Degradation of protein and utilization of the hydrolytic products by a predominant ruminal bacterium, *Prevotella ruminicola* B14. J. Dairy Sci. 80:167–175
- Guedes, C.M., Gonçalves, D., Rodrigues, M.A.M., Dias-Da-Silva, A., 2008. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* yeast on ruminal fermentation and fibre degradation of maize silages in cows. Anim. Feed Sci. Technol. 145, 27–40.
- Hady, M.M., and H.M. Teheb. 2012. Evaluation of mananaoligosaccharide (Bio-Mos®) and esterified glucomanana (MTB-100®) dietary supplementation on growth performance, serum parameters and rumen ecology of Barki lambs under Egyptian environment . 4:158–162.

- Hang Su-qin y Wei-yun Zhu. 2012. Gut bacterial and lactobacilli communities of weaning piglets in response to manana oligosaccharide and sugar beet pulp in vitro fermentation. *Journal of Integrative Agriculture*. 11:122-133.
- Jiang, Z., Y. Wei, D. Li, L. Li, P. Chai, and I. Kusakabe. 2006. High-level production, purification and characterization of a thermostable β -mannanase from the newly isolated *Bacillus subtilis* WY34. *Carbohydr. Polym.* 66:88–96.
- Johnson, K. G., N. W. Ross, and H. Schneider. 1990. Purification and some properties of β -mannanase from *Polyporus versicolor*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 6:245–254.
- Jouany, J.P., 2006. Optimizing rumen functions in the close-up transition period and early lactation to drive dry matter intake and energy balance in cows. *Anim. Reprod. Sci.* 96:250-264.
- Kaji, I., and S. K. Ryo. 2011. Density distribution of free fatty acid receptor 2(FFA2)-expressing and GLP-1-producing enteroendocrine L cells in human and rat lower intestine , and increased cell numbers after ingestion of fructo-oligosaccharide. 2:27–38.
- Kempers, A. J., and A. Zweers. 1986. Ammonium determination in soil extracts by the salicylate method. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 17:715–723.
- Klaenhammer, T. R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie.* 70:337–349.
- Klebaniuk, R. 2016. Effectiveness of BIO-MOS in sheep nutrition. *Annals of Animal Science.* 4:369–380.
- Koniarova I. 1993. Some biochemical and physiological characteristics of *Propionibacterium acnes* strains isolated from the rumen of calves and lambs. *Veterinarni Medicina.* 38:43-52.
- Krehbiel, C.R., Rust, S.R., Zhang, G., Gilliland, S.E., 2003. Bacterial direct-fed microbials in ruminant diets: performance response

and mode of action. *J. Anim. Sci.* 81, E120–E132.

Latham M.J. y M.J. Wolin. 1977. Fermentation of Cellulose by *Ruminococcus flavefaciens* in the Presence and Absence of *Methanobacterium ruminantium*. *Applied and Environmental Microbiology.* 34:297-301.

Layden, B. T., A. R. Angueira, M. Brodsky, V. Durai, and W. L. L. Jr. 2012. Short chain fatty acids and their receptors: new metabolic targets. *Transl. Res.* 161:131–140.

Lesmeister, K.E., Heinrichs, A.J., Gabler, M.T., 2004. Effects of supplemental yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) culture on rumen development, growth characteristics, and blood parameters in neonatal dairy calves. *J. Dairy Sci.* 87:1832–1839.

Li, Y., Y. Wang, G. Zhang, X. Zhang, and C. Lin. 2017. Effects of *Acremonium terricola* culture supplementation on apparent digestibility, rumen fermentation, and blood parameters in dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 230:13–22.

Luo, J., C. S. Ranadheera, S. King, C. Evans, and S. Baines. 2017. In vitro investigation of the effect of dairy propionibacteria on rumen pH, lactic acid and volatile fatty acids. *J. Integr. Agric.* 16:1566–1575.

Masami M., F. Nagai y Y. Watanabe. 2012. Description of *Christensenella minuta* gen. nov., sp. nov., isolated from human faeces, which forms a distinct branch in the order Clostridiales, and proposal of Christensenellaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 62:144-149

Marden, J.P., Julien, C., Monteils, V., Auclair, E., Moncoulon, R., Bayourthe, C., 2008. How does live yeast differ from sodium bicarbonate to stabilize ruminal pH in high-Yielding Dairy Cows? *Journal of Dairy Science.* 91:3528-3535

Martinez-gutierrez, F., S. Ratering, B. Ju, C. Godinez-hernandez, R. Geissler-plaum, F. Prell, H. Zorn, P. Czermak, and S. Schnell.

2017. LWT - Food Science and Technology Potential use of Agave salmiana as a prebiotic that stimulates the growth of probiotic bacteria. LWT - Food Sci. Technol. 84:151–159.
- Mccann, J. C., and J. J. Loo. 2017. Rumen Microbiome , Probiotics, and Fermentation Additives. Vet. Clin. NA Food Anim. In Press.
- Mills, J. A. N., L. A. Crompton, J. L. Ellis, J. Dijkstra, A. Bannink, S. Hook, and C. Benchaar. 2014. A dynamic mechanistic model of lactic acid metabolism in the rumen. J. Dairy Sci. 97:2398–2414.
- Miranda R.L.A., Mendoza, G.G.D., Barcena-Gama, J.R., Gonzalez, M.S.S., Ferrera, R., Ortega, C.E.M. and Cobos, P.M.A.. 1996. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* or *Aspergillus oryzae* cultures and NDF level on parameters of ruminal fermentation. Anim. Feed Sci. Technol. 63:289-296.
- Moreira, L.R.S., and Filho, E.X.F. 2008. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. 1:165–178.
- Mosoni, P., Chaucheyras-Durand, F., Béra-Maillet, C., Forano, E., 2007. Quantification by real-time PCR of cellulolytic bacteria in the rumen of sheep after supplementation of a forage diet with readily fermentable carbohydrates: effect of a yeast additive. J. Appl. Microbiol. 103:2676–2685.
- Mudau, M.M., and Setati, M.E. 2006. Screening and identification of endomannanase-producing microfungi from hypersaline environments. Curr. Microbiol. 52:477–481.
- Nilsson, N.E., Kotarsky, K., and Owman C. 2003. Identification of a free fatty acid receptor, FFA2R, expressed on leukocytes and activated by short-chain fatty acids . [Biochem. Biophys. Res. Commun.](#) 303:1047–1052.
- Newbold, C.J., Wallace, R.J., McIntosh, F.M., 1996. Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. Br. J. Nutr. 76:249–261.

- Nocek, J. E., and W. P. Kautz. 2006. Direct-Fed Microbial Supplementation on Ruminal Digestion, Health, and Performance of Pre- and Postpartum Dairy Cattle. *J. Dairy Sci.* 89:260–266.
- Olsson, L., T. M. I. E. Christensen, K. P. Hansen, and E. A. Palmqvist. 2003. Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* RutC-30. *Enzyme Microb. Technol.* 33:612–619.
- Opsi, F., R. Fortina, S. Tassone, and R. Bodas. 2012. Effects of inactivated and live cells of *Saccharomyces cerevisiae* on in vitro ruminal fermentation of diets with different forage : concentrate ratio. 5:271–283.
- Oso, A. O., O. M. O. Idowu, A. S. Haastrup, A. J. Ajibade, K. O. Olowonefa, A. O. Aluko, I. M. Ogunade, S. O. Osho, and A. M. Bamgbose. 2013. Growth performance, apparent nutrient digestibility , caecal fermentation , ileal morphology and caecal microflora of growing rabbits fed diets containing probiotics and prebiotics. *Livest. Sci.* 157:184–190.
- Pascal P. 1999. Metabolism of lactate and sugars by dairy propionibacteria: A review. *Lait.* 79:23-41.
- Peters J P, Shen R Y, Robinson J A, Chester S T. 1990. Disappearance and passage of propionic acid from the rumen of the beef steer. *Journal of Animal Science.* 68:3337–3349.
- Pinloche, E., N. Mcewan, J. Marden, C. Bayourthe, E. Auclair, and J. Newbold. 2013. The Effects of a Probiotic Yeast on the Bacterial Diversity and Population Structure in the Rumen of Cattle. 8.
- Poul, E. Le, S. Struyf, J. Springael, V. Lannoy, M. Decobecq, V. Dupriez, G. Vassart, J. Van Damme, M. Parmentier, and M.

- Detheux. 2003. Functional Characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *J. Biol. Chem.* 278:25481–25489.
- Qin, C., Gong, L., Zhang, X., Wang, Y., Wang, Y., Wang, B., Li, Y., and Li, W. 2018. Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus subtilis* B10 on gut microbiota modulation in broilers. *Anim. Nutr.*:1–9. In Press
- Rastall, R.A. 2004. WALTHAM International Science Symposium : Nature , Nurture , and the Case for Nutrition Bacteria in the Gut : Friends and Foes and How to Alter the Balance 1:2022–2026.
- Riley, M. A. 1998. Molecular mechanisms of bacterocin evolution. *Annu. Rev. Genet.* 32:255–78
- Rossi, M., C. Corradini, A. Amaretti, M. Nicolini, A. Pompei, S. Zanoni, and D. Matteuzzi. 2005. Fermentation of Fructooligosaccharides and Inulin by Bifidobacteria: a Comparative Study of Pure and Fecal Cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:6150–6158.
- Santini, V., Gozzini, A., and Ferrari, G. (2007). Histone deacetylase inhibitors: molecular and biological activity as clinical application. *Curr. Drug Metab.* 8:383–394.
- Seo, J. K., Kim, S., Kim, M.H., Upadhaya, S.D., Kam D.K., and Ha, J.K.. 2010. Direct-fed microbials for ruminant animals. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 23:1657–1667.
- Setati, M. E., P. Ademark, W. H. Van Zyl, B. Hahn-Hägerdal, and H. Stålbrand. 2001. Expression of the *Aspergillus aculeatus* endo- β -1,4-mannanase encoding gene (*man 1*) in *Saccharomyces cerevisiae* and characterization of the recombinant enzyme. *Protein Expr. Purif.* 21:105–114.
- Shazly, K. 1952. Degradation of protein in the rumen of the sheep. *Degradation of proein in the rumen.* 51:647-652.
- Shurson, G. C. 2018. Yeast and yeast derivatives in feed additives and ingredients : Sources , characteristics , animal responses ,

and quantification methods. 235:60–76.

Sievert, S.J., Shaver, R.D., 1993. Carbohydrate and *Aspergillus oryzae* effects on intake, digestion, and milk production by dairy cows, *J. Dairy Sci.*, 76: 245-254.

Song, M.K. and Kemtelly, J.J., 1990. Ruminal fermentation pattern, bacterial population and ruminal degradation of feed ingredients as influenced by ruminal ammonia concentration, *J. Anim. Sci.*, 68: 1110-1120.

Taheri, A., P. Yarahmadi, S. Hossein, D. Tahmasebi, N. Gheisvandi, and A. Ghaedi. 2018. Fish and Shellfish Immunology The effects singular or combined administration of fermentable fiber and probiotic on mucosal immune parameters, digestive enzyme activity, gut microbiota and growth performance of Caspian white fish (*Rutilus frisii*). *Fish Shellfish Immunol.* 77:194–199.

Turrone, F., C. Milani, S. Duranti, J. Mahony, D. Van Sinderen, and M. Ventura. 2018. Glycan Utilization and Cross-Feeding Activities by Bifidobacteria. *Trends Microbiol.* 26:339–350.

Venema K. y A.P. Carmo. 2015. Prebiotics and Probiotics: Current Research and Future Trends.

Viladomiu, M., R. Hontecillas, L. Yuan, P. Lu, and J. Bassaganyariera. 2013. Nutritional protective mechanisms against gut inflammation. *J. Nutr. Biochem.* 1–11.

Weatherburn, M.W. 1967. Phenol-Hypochlorite Reaction for Determination of Ammonia. *Anal. Chem.* 39:971–974.

Wohlt, J.E., Finkelstein, A.D. and Chung, C.H., 1991. Yeast culture to improve intake, nutrient digestibility, and performance by dairy cattle during early lactation. *J. Dairy Sci.* 74:1395-1400.

Xie, F., Yuan, S., Pan, H., Wang, R., Cao, J., and Jiang, W. 2017. Effect of yeast mannan treatments on ripening progress and modification of cell wall polysaccharides in tomato fruit. *Food Chem.* 218:509–517.

- Xu, B., Hägglund, P., Stålbrand, H., and Janson, J.C. 2002. endo- β -1,4-Mannanases from blue mussel, *Mytilus edulis*: purification, characterization, and mode of action. J. Biotechnol. 92:267–277.
- Xu, H., W. Huang, Q. Hou, L. Kwok, Z. Sun, H. Ma, F. Zhao, Y. Lee, and H. Zhang. 2017. the effects of probiotics administration on the milk production, milk components and fecal bacteria microbiota of dairy cows. Sci. Bull. In Press
- Zarling E.J. y M.A. Ruchim. 1987. Protein origin of the volatile fatty acids isobutyrate and isovalerate in human stool. J. Lab. Clin. Med.
- Zhang, R., W. Zhu, W. Zhu, J. Liu, and S. Mao. 2014. Effect of dietary forage sources on rumen microbiota, rumen fermentation and biogenic amines in dairy cows. J. Sci. Food Agric. 94:1886-1895.

ANEXO

1. Confidencialidad y propiedad intelectual.

“La información y datos obtenidos de estos experimentos son confidenciales y todos los derechos a la misma permanecerán como propiedad del Divulgador. El Receptor no obtendrá derecho alguno, de ningún tipo, sobre la información, ni tampoco ningún derecho de utilizarla. La divulgación de la Información confidencial no implica el licenciamiento de derecho de patentes o derecho de autor o ningún otro derecho por parte del Divulgador. El contenido intelectual del presente documento pertenece al Lethbridge Research and Development Centre perteneciente a la secretaria de agricultura de Canadá (Agrifood CANADA).

2. University Research Participant Agreement

3. Artículo 1

4. Artículo 2

UNIVERSITY RESEARCH PARTICIPANT AGREEMENT
(the "Agreement")

BETWEEN: HER MAJESTY THE QUEEN IN RIGHT OF CANADA,
as represented by the Minister of Agriculture and Agri-Food
("AAFC")

AND: M.C. José de Jesús Ortiz Guluarte, 316-3 Gonzales Ortega ST. Mexicali, Baja
California, México 21260
("Research Participant")

AND: Autonomous University of Baja California, Research Institute in Veterinary Science,
San Felipe HWY Km, 3.5 Mexicali, B.C. Mexico 21386
("University")

(Individually or collectively referred to as the "Party" or "Parties", as the case may be)

WHEREAS:

- a. M.C. José de Jesús Ortiz Guluarte is a registered student at the **University** or is employed directly under the supervision of a **University** professor-researcher and is pursuing research in PhD in Agronomic Science. (the "**Research Participant**");
- b. The **University** has requested that the **Research Participant** be granted permission by **AAFC** to visit and work at **AAFC's** Lethbridge Research and Development Centre, 5403 1st Avenue South, Lethbridge, Alberta, T1J 4B1 (the "**AAFC Facility**") in order to learn and obtain advice and counsel from **AAFC** to complete his or her training on culture probiotic bacteria, perform chemical analysis of feed and rumen/fecal samples (e.g. DM, ADF, NDR analysis), feed cattle, collect samples (rumen, fecal), extract DNA from animal samples, summarize and analyze data, or utilize the **AAFC Facility** as part of a PhD degree in Agronomic Science, project of the **University**;
- c. **AAFC** acknowledges that the **Research Participant**, under direct scientific supervision of the **University**, operates under a university-designed research theme;
- d. The **Research Participant** and the **University** recognize that **AAFC** possesses exclusive, protected, **Confidential Information** belonging to **AAFC** or to third parties, which information must be protected when a **Research Participant** works and visits at one of its research facilities;
- e. The **Research Participant** may be provided with or become aware of **Confidential Information** while at the **AAFC Facility**;
- f. **AAFC** agrees to provide under this **Agreement** access to its facilities and research infrastructure to the **Research Participant**, but not direct scientific supervision of the **Research Participant** by **AAFC** scientists who will limit themselves to providing orientation, advice and guidance as a training complement for the **Research Participant**.
- g. The **Research Participant** will not participate jointly in the creation of new **Intellectual Property** with **AAFC**.

NOW THEREFORE IN CONSIDERATION of the mutual terms and conditions, and other good and valuable consideration, the adequacy and receipt of which is acknowledged by the **Parties**, the **Parties** agree as follows:

THE PROJECT

1. **AAFC** grants permission to the **Research Participant**, with the agreement of the **University** representative supervising the **Research Participant**, to participate in targeted research activities (the "**Project**") as described in Appendix "A" (Description of Work) at the **AAFC Facility** on the terms and conditions set out in this **Agreement**. The term of the **Project** and the permission granted extends from the period commencing the 19th day of June, 2017 and concluding on the 19th day of December, 2017. The term of the **Agreement** may be concluded by any **Party** immediately upon delivering of written notice to the other **Party** by hand, courier or registered mail, as designated in paragraph 35.
2. During the term of the **Project**, the **Research Participant** shall perform the research work at the **AAFC Facility** under the direct scientific supervision of the **University**. The **Research Participant** will be involved in research as described in Appendix "A" (Description of Work).
3. The **University** and the **Research Participant** agree that the **Research Participant's** work in the **AAFC Facility** does not create an employer-employee relationship between the **Research Participant** and **AAFC**. The **Research Participant** shall not be paid any form of remuneration or benefit by **AAFC**.
4. The **Research Participant** will only use such facilities of the **AAFC Facility** as authorized by the **AAFC** representative who, for the purposes of this agreement is Dr. Trevor Alexander as authorized in writing by **AAFC**.
5. Subject to applicable laws and Treasury Board policies, the **Research Participant** agrees to abide by any measures which **AAFC** may require of its staff for health, safety, security, ethical research procedures, quality control in research techniques and management of information, and all instructions relating to the above that are given by Dr. Trevor Alexander and **AAFC's** Dr. Yves Plante, Associate Director, Research, Development and Technology.
6. The **Research Participant** and the **University** acknowledge their awareness of the following conditions at the **AAFC Facility**: Laboratory chemicals including carcinogens, working with large and/or small animals, and working with bacteria. Acknowledging these conditions and recognizing that it is impossible to list all conditions and perils, the **University** and the **Research Participant** assume all risks associated with the **Research Participant's** presence at the **AAFC Facility**, including injury, illness, death and damage to property.
7. The **University** and the **Research Participant** assume full responsibility for the **Research Participant's** actions while at the **AAFC Facility**. The **Research Participant**

shall act in a reasonable and prudent manner at all times with due consideration of the circumstances, including the conditions listed in paragraph 5.

8. During the term of the **Project**, **AAFC**, on the part of **AAFC**, its agents or employees, or anyone else, shall not be liable for any damages or claims, arising from any act, omission, or delay, excluding **AAFC's** own negligence, causing any personal injury, disease, illness, disability or death of the **Research Participant**, any loss or damage to property; or any costs or expenses to the **Research Participant**.
9. The **Research Participant** will rely on private insurance, or Workers' Compensation or other insurance obtained through the **University**, as the case may be, for compensation for injuries.
10. The **University** indemnifies and saves harmless **AAFC** from and against all claims, demands, actions, suits or other proceedings arising out of the **Research Participant's** presence or work performed at the **AAFC Facility** or work there performed excluding those claims arising from the negligence of **AAFC**. The **University** is either self-insured or shall keep in force for the period of this **Agreement** a policy of Comprehensive General Liability (also referred to as General Liability) insurance, in an amount of not less than CDN \$1,000,000 (one million dollars) per occurrence, in order to provide the indemnity required under the present clause. The **University** shall maintain such other insurance as it deems necessary to meet the requirements of this **Agreement**.

CONFIDENTIALITY

11. "**Confidential Information**" means without limitation all scientific, technical, business, financial, legal, marketing or strategic information that is non-public, protected, confidential, privileged or proprietary in nature, or any part thereof, which may have actual or potential economic value, in part, from not being known, however fixed, stored, expressed or embodied (and includes, without limitation, samples, prototypes, specimens and derivatives) during discussions, telephone calls, meetings, tests, demonstrations, correspondence or otherwise or any part or portion thereof, irrespective of whether or not such information is specifically marked confidential or identified as confidential at the time of disclosure, whether it originates from **AAFC** or is information provided by a third party to **AAFC** or is information that arises during the course of activities under this **Agreement**.
12. The **Parties** acknowledge that any information defined as **Confidential Information** which the **Research Participant** obtains from **AAFC** or while the **Research Participant** is working at the **AAFC Facility**; is **Confidential Information** regardless of whether:
 - 12.1 it was in documents with or without indication of confidentiality;
 - 12.2 anything was said about confidentiality at the time of disclosure;
 - 12.3 it was disclosed intentionally or inadvertently; or
 - 12.4 it was produced as part of the **Research Participant's** work at the **AAFC Facility**.
13. Paragraph 11 does not apply to information which, although it may be marked "confidential" is not really confidential in that:

- 13.1 it was already in the possession of the **Research Participant** prior to it being given to the **Research Participant** by **AAFC**;
 - 13.2 it is or becomes part of public knowledge or literature through a source other than **AAFC** and not in violation of this **Agreement**;
 - 13.3 it becomes available from an outside source without limitation as to its disclosure; or
 - 13.4 it is identical to information which was developed by the **Research Participant** independently of any **Confidential Information** provided by **AAFC** and independently of the **Research Participant's** work at the **AAFC Facility**.
14. The disclosure of **AAFC's Confidential Information** to the **Research Participant** shall in no way be deemed to be a grant of license (express or implied); usufructuary right, proprietary right of any sort; or commitment to a license agreement.
 15. If in doubt about the confidentiality of any information, the **Research Participant** may make a written inquiry to **AAFC**, and must assume that the information is confidential unless a written response indicates otherwise.
 16. The **Research Participant** should not have access to **Confidential Information**, but if he/she has written authorization to use **Confidential Information**, he/she must use it solely for the purposes of this **Agreement** and for the research performed during the term of the **Project**. The **Research Participant** acknowledges that he/she is a fiduciary of **AAFC** concerning the **Confidential Information**, and the **Research Participant** holds in trust for **AAFC** the **Confidential Information** and any benefits arising from the **Research Participant's** improper or unauthorized use of the **Confidential Information**.
 17. The **Research Participant** must not, directly or indirectly, without written permission from **AAFC**:
 - 17.1 use any **Confidential Information** for an unauthorized purpose; or
 - 17.2 publish or disclose any **Confidential Information**, in whole or in part, to any person or entity.
 18. Notwithstanding any expiry or termination of this **Agreement**, the obligations of confidentiality and non-use in this **Agreement** shall remain in force for 2 years after the last day of the term of the **Project**.
 19. Unless otherwise indicated in writing, the **Confidential Information** is and remains the sole property of **AAFC**. At the end of the term of the **Project**, the **Research Participant** shall return to **AAFC** all documents and material containing and concerning the **Confidential Information**, including all copies thereof.

INTELLECTUAL PROPERTY

20. The **Research Participant** may, during the term of the **Agreement** either develop or make use of technical information, inventions, designs, methods, products, improvements, processes, discoveries, varieties, germplasm, cultivars, genetic material, genetic constructs, mutants, micro organisms, specimens and progeny, whether or not

legally protectable, including all know-how, show-how, trade secrets, research plans and priorities, computer models and related reports, market interests and product ideas, as well as all patents, patent applications, copyrights and **Confidential Information** (collectively the **Intellectual Property**) which is owned by **AAFC**, the **University** or other parties.

21. The **University** and **Research Participant** shall, if the circumstances are such, promptly, fully and candidly disclose to **AAFC** all **Intellectual Property** conceived, developed, discovered or uncovered in the conduct of research at the **AAFC Facility** under this **Agreement**. These disclosures shall be deemed **Confidential Information** of **AAFC** and shall be subject to the requirements of the confidentiality requirements of this **Agreement**.
22. The **Research Participant** and the **University** acknowledge and accept that they have no rights to the **Intellectual Property** of **AAFC** or of other parties, except to the extent of any use expressly permitted by **AAFC** in writing during the term of the **Project** and that they will not interfere with or violate the rights of **AAFC** or of other parties regarding such **Intellectual Property**. The obligations under this clause will survive the expiry or termination of this **Agreement**.
23. The **Research Participant** shall irrevocably assign its rights to the **University** for any **Intellectual Property** conceived, developed, discovered or uncovered in the conduct of research under this **Agreement**.
24. **AAFC** hereby irrevocably transfers and assigns to the **University** all rights it may have to any **Intellectual Property** conceived, developed, discovered or uncovered by the **Research Participant** at the **AAFC Facility** in the conduct of research under this **Agreement** in consideration for a share of the proceeds arising from the commercialization of the **Intellectual Property** created at the **AAFC Facility** as described under paragraph 26.
25. The **University** hereby grants to **AAFC** a perpetual, personal world-wide irrevocable royalty-free non-exclusive license to the date at which the rights expire, without right to sub-license, to use any **Intellectual Property** conceived, developed, discovered or uncovered in the conduct of research under this **Agreement** for further research and development and for no other purposes. Any commercialization agreement or license that the **University** may enter into with a third party with respect to the above-described **Intellectual Property** must acknowledge and permit the license granted by this provision, unless waived in writing by **AAFC**.
26. In the event that the **University** generates or receives proceeds derived from the commercialization of **Intellectual Property** conceived, developed, discovered or uncovered in the conduct of research under this **Agreement**, the net proceeds shall be distributed between **AAFC** and the **University** in the proportion that **AAFC** and the **Research Participant** contributed to the development of that **Intellectual Property**. The **Parties** agree to negotiate in good faith the proportion of the contribution made by the **Parties** to the development of **Intellectual Property**.

27. The proceeds to be distributed under paragraph 26 will be net proceeds, with the direct costs of commercializing the **Intellectual Property** deducted and paid to the **University** before the distribution of the net proceeds. The direct costs include: (a) out of pocket costs and expenses directly relating to the protection of the **Intellectual Property**, including patent registration fees, patent agent fees, legal and other professional fees; (b) out of pocket costs and expenses directly relating to the negotiation and completion of an appropriate commercialization agreement, including travel costs and professional fees; (c) costs of market assessments conducted for the purpose of commercializing the **Intellectual Property**; and (d) such other direct costs that are incurred specifically for the purpose of commercializing the **Intellectual Property**, but not including administrative, overhead and employment costs borne by the **University**.

PUBLICATION

28. The **Research Participant** is encouraged to publish the results of her/his research in academic and scientific publications provided that **AAFC's** contribution is appropriately recognized in such publications and that they comply with the policies of the **University** and with the confidentiality provisions of this **Agreement**.
29. **AAFC** acknowledges that the **University** or the **Research Participant** may need to disclose information in a thesis, report or seminar for the purpose of obtaining a university degree. The **University** and the **Research Participant** agree that **AAFC's Confidential Information** will be protected for the purposes of completing a degree program requirement such as a thesis, report or seminar produced by the **University** or **Research Participant**, and that any of **AAFC's Confidential Information** shall only be disclosed to the members of the thesis defense committee, who will be required to sign a confidentiality agreement concerning **AAFC's Confidential Information**. **AAFC's Confidential Information** can only be released in such thesis, report or seminar if such information is necessary for completion of the **Research Participant's** degree program requirements.
30. In all academic publications, press releases and commercial advertising associated with the results of the **Project**, the **Research Participant** and the **University** shall ensure that:
- 30.1 the wording does not imply endorsement of any product, process or practice by **AAFC**;
 - 30.2 the **Research Participant** prominently and candidly acknowledges the development of the results of the **Project** by **AAFC** and the **University**; and
 - 30.3 advance notice and copies of such articles, thesis or other academic publications, press releases, and commercial advertising (including mockups, composites, draft media advertisements, displays, transmissions, publications, in any known or yet unknown medium) is given to **AAFC** in sufficient time to allow **AAFC** to require deletions of **Confidential Information** or any implied endorsement by **AAFC** of any product, process or practice. **AAFC** shall ensure that such delays will not exceed 90 (ninety) business days.

GENERAL

31. The **Parties** acknowledge the truth and accuracy of the recitals.
32. Any breach of this **Agreement** by the **University** or the **Research Participant** is grounds for **AAFC** to immediately terminate the permission to work in the **AAFC Facility**, as well as seek other legal remedies, restraints, and compensation. **AAFC** shall terminate the **Agreement** by giving written notice to the **Research Participant** and the **University** by hand, by courier or by registered mail.
33. This **Agreement** may be terminated by **AAFC** or the **University** at any time upon written notice to the other **Parties**, subject to the survival provisions contained herein.
34. This **Agreement** is to be interpreted in accordance first by applicable Canadian federal laws and secondly by the laws in force in the province of Alberta.

NOTICES

35. Unless otherwise notified, the representatives of the **Parties** for the purpose of the **Agreement** shall be:

For **AAFC**: 5403 1st Avenue South, Lethbridge, Alberta, T1J 4B1
Telephone: (403) 317-3390
Facsimile: (403) 382-3156
Internet: sheila.elliott@agr.gc.ca

For the **Research Participant**: 316-3 Gonzales Ortega ST. Mexicali, B.C. México 21260
Telephone: +52 686 185-1859
Facsimile:
Internet: a166851@uabc.edu.mx

For the **University**: San Felipe HWY Km. 3.5 Mexicali, B.C. México 21386
Telephone: +52 686 563-6671
Facsimile: +52 686 563-6671
Internet: omaritza@uabc.edu.mx

EXECUTION


IN WITNESS WHEREOF this **Agreement** has been executed by duly authorized representatives of the **Parties**.

Executed in triplicate this day of , 20_.

FOR HER MAJESTY THE QUEEN IN RIGHT OF CANADA:



(Witness)

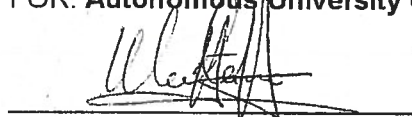


Dr. Yves Plante
Associate Director RDT
Lethbridge Research and Development Centre

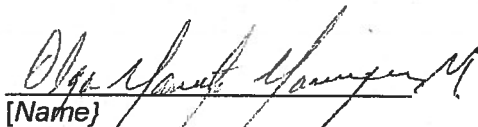
APR 04 2017

Date: _____

FOR: Autonomous University of Baja California



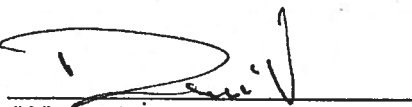
(Witness)



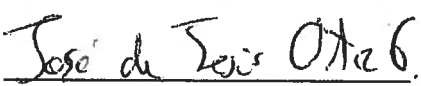
[Name]
[Title]

Date: march - 30 - 2017

FOR THE RESEARCH PARTICIPANT:



(Witness)



José de Jesús Ortiz Guluarte
PhD Student

Date: March - 30 - 2017

APPENDIX “A” - Description of work for Research Participant at AAFC’s facilities

Six feed enzymes of different classes (beta glucanase, xylanase, feruloyl esterase, phytase, amylase, and multifunctional glucosidase/xylosidase/arabinosidase) will be tested alone and in combination for the efficiency of absorption to *Bacillus* spores and retained activity after adsorption. The spore-bound enzymes will then be analyzed for their effects on in vitro ruminal and fecal digestion using two doses of the enzymes. Finally, the best enzyme and dose combination will be examined for ability to enhance ruminal and total tract digestion in cannulated cattle.

Project-related work plan including timeframes:

Description of work	AAFC laboratory	Time period	AAFC Research Contact
Participate in Digestibility study, including preparation of feed, feeding cattle, collecting samples from cattle (Rumen, fecal, gas)	Lethbridge Research and Development Centre	June 19/17 to August 31/17	Dr. Trevor Alexander
Analyze feed and cattle samples (nutrient analysis), extract DNA from samples, perform PCR, and summarize data.	Lethbridge Research and Development Centre	September 1/17 to December 19/17	Dr. Trevor Alexander