

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS



**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN SOLA Y COMBINADA DE
PROBIÓTICOS Y PREBIÓTICOS SOBRE FERMENTACIÓN RUMINAL Y
DIGESTIÓN DE NUTRIENTES EN OVINOS ALIMENTADOS CON DIETAS
DE FINALIZACIÓN**

**TESIS
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**PRESENTA
ADRIANA CERVANTES NORIEGA**

**DIRECTOR
DR. ALBERTO BARRERAS SERRANO**

**CO-DIRECTOR
DR. ALFREDO ESTRADA ANGULO**

MEXICALI, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO.

OCTUBRE DE 2019.

Efecto de la suplementación sola y combinada de probióticos y prebióticos sobre fermentación ruminal y digestión de nutrientes en ovinos alimentados con dietas de finalización. Tesis presentada por Adriana Cervantes Noriega, misma que fue revisada bajo la dirección del consejo particular indicado, la cual ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito para obtener el grado de: Maestro en Ciencias Veterinarias.

Dr. Alberto Barreras Serrano
Director de Tesis

Dr. Alfredo Estrada Angulo
Co-director de Tesis

Dr. Alejandro Plascencia Jorquera
Asesor

Dr. Francisco Javier Monge Navarro
Asesor

Dr. Víctor Manuel González Vizcarra
Asesor

Mexicali, Baja California, a 18 de octubre de 2019.

DEDICATORIA

*Aunque pase el tiempo y no te encuentre entre nosotros,
tu alma sigue conmigo...*

*para ti:
Sofia Artemisa Cervantes Fajardo.*

AGRADECIMIENTOS

Me quedó muy claro que la parte más difícil de escribir es esta, y lo es porque, en mi caso particular hay muchas personas a las cuales agradecer, pero si menciono a cada una de ellas, esta hoja se volvería un pergamino, en fin, trataré de ser lo más breve posible...

Primero que nada, le agradezco a mis padres; Francisca y Jesús Federico, y a mi hermano Mario, porque esto fue un reto tanto para mí como para ellos, porque a pesar de que en un principio fue difícil estar lejos de ustedes, y a pesar de las dificultades que enfrentamos durante estos dos años, en ningún momento dejaron de apoyarme y de creer en mí, y a mi sobrinito José Mario porque su llegada fue un motorcito que me impulsó a seguir, porque su sonrisa me motiva a ser mejor cada día.

A mis asesores, Alejandro Plascencia, Alfredo Estrada, Alberto Barreras, Francisco Monge y Víctor González, por confiar en mí para la realización de este proyecto, por compartirme sus conocimientos, brindarme su tiempo y sobre todo por tener la paciencia de explicarme algo más de dos veces cuando no lograba entenderlo a la primera.

A mis amigos Sergio, Fernanda y Ana porque ustedes disfrutaron y sufrieron conmigo este proceso, por estar siempre ahí para mí cuando los necesité, por aguantar mis dramas y por darme ánimos cuando sentía que ya no podía continuar, a Elsa, Martha, Fernando, Andrés y Mireya por tantas aventuras juntos y por ser mi familia foránea durante este periodo, y a Carlos por enseñarme a equilibrar las cosas académicas con las vagancias de la vida.

A Conacyt por esta gran oportunidad que me brindó para desarrollarme en la investigación, a la coordinadora de la maestría en ciencias veterinarias, Maritza Manríquez por su ayuda y su paciencia, por estar siempre en disposición de ayudar en todos los sentidos.

Y a todos mis familiares y amigos que no mencioné, pero que de alguna u otra manera pusieron su granito de arena y me ayudaron para que yo llegara hasta este momento.

Con todo mi cariño y agradecimiento...

Adriana Cervantes Noriega.

CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	I
ÍNDICE DE CUADROS.....	II
ÍNDICE DE FIGURAS.....	III
RESUMEN.....	IV
ABSTRACT.....	VI
INTRODUCCIÓN.....	8
OBJETIVO.....	10
HIPÓTESIS.....	10
REVISIÓN DE LITERATURA.....	11
Antibióticos como aditivos alimenticios en la producción animal.....	11
Alternativas al uso de antibióticos en la producción animal.....	12
Probióticos.....	14
Clasificación de los probióticos.....	15
Características que deben cumplir los probióticos.....	16
Mecanismo de acción de los probióticos.....	17
Prebióticos.....	18
Características de los prebióticos.....	19
Mecanismo de acción de los prebióticos.....	19
Utilización de prebióticos por microorganismos intestinales.....	21
Probióticos y prebióticos en la nutrición de rumiantes.....	22
Levaduras como probióticos en rumiantes.....	23
Efectos benéficos de las levaduras en animales rumiantes.....	24
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
Efecto de <i>S. cerevisiae</i> sobre digestibilidad de nutrientes.....	25

Efecto de <i>S. cerevisiae</i> sobre fermentación ruminal.....	27
Efecto de <i>S. cerevisiae</i> sobre poblaciones bacterianas.....	28
LITERATURA CITADA	30
The effects of single or combined supplementation of probiotics and prebiotics on ruminal fermentation and total tract digestion in finishing lambs	36
Abstract.....	37
Introduction	38
Material and Methods	39
Animal, diets, and samples analyses	39
Identification and ruminal concentration of bacteria (<i>C. aminophilum</i> and <i>C. sticklandii</i>).....	41
DNA extraction	41
Primers for bacteria	42
Standardization of the RT-PCR for HAB bacteria.....	42
Quantitative RT-PCR for bacteria.....	42
Statistical design and analysis	43
Results and discussion	44
Implications.....	47
Literature Cited	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla

1. Efecto de la suplementación con levadura sobre el pH ruminal y la digestión en novillos Holstein.....	26
2. Efecto de la suplementación de productos de fermentación de <i>S. cerevisiae</i> sobre fermentación ruminal en vaquillas en finalización.....	27
3. Conteo fecal de <i>Escherichia coli</i> en novillos en finalización alimentados con una dieta suplementada con antibióticos (ANT), levadura seca activa (ADY), ADY encapsulada (EDY) o una mezcla de ADY y EDY	29
4. Efecto de células de levadura viva (<i>S. cerevisiae</i>) sobre el número de bacterias ruminales.....	29
5. Composition of basal diet and treatments for trial 1 and 2.....	54
6. Oligonucleotides used to RT-PCR amplification and quantitation of HAB microorganism in ruminal fluid samples from ovine/bovine under probiotic/prebiotic treatment.	55
7. Effect of treatments on total tract digestion.....	55
8. Effect of treatments on ruminal, pH, AGV, methane production, and N-NH ₃	56
9. Quantification of ruminal bacteria by real-time PCR (log ₁₀ copies/mL or per g) in lambs fed a control diet or control diet supplemented with prebiotic, probiotic or its combination.	56

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro

1. Efectos de los antibióticos promotores del crecimiento en la nutrición animal.
..... 12
2. Tipos de aditivos alimenticios estimuladores de la capacidad de defensa de
los animales frente a microorganismos patógenos..... 13
3. Mecanismos de interacción entre probióticos, prebióticos y huésped. 18

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura

1. Mecanismos de interacción entre el microbioma, los probióticos y el huésped 17
2. Esquematización de la inhibición competitiva de la fijación bacteriana del hospedero mediante el bloqueo por afinidad de las lectinas bacterianas por MOS 20
3. Esquema general de la fermentación por los microorganismos del colon humano de proteínas y carbohidratos. 22
4. Mecanismos de acción de los cultivos de levaduras en el rumen 24

RESUMEN

para evaluar los efectos de la suplementación sola y combinada de probióticos y prebióticos sobre fermentación ruminal y digestión en tracto total, se utilizaron cuatro ovinos machos (Pelibuey × Katahdin; 45.1 ± 2.7 kg de peso inicial) con cánulas tipo “T” en rumen bajo un diseño cuadro latino 4×4 . Los tratamientos consistieron en una dieta de finalización, formulada a base de maíz quebrado, suplementada con: 1) sin eubióticos (**Control**); 2) 3 g de *Saccharomyces cerevisiae*/ovino/día (**SC**), 3) 3 g de manano oligosacáridos más β -glucanos y metabolitos de levadura /ovino/día (**MOS**), y 4) combinación de 1.5 g/día SC y 1.5 g/día MOS (**SCMOS**) en una disposición factorial 2×2 . No hubo interacciones SC $\times$ MOS en la digestión, fermentación ruminal ni recuento de bacterias ruminales. La suplementación SC tendió ($P = 0.06$) a aumentar la digestión en tracto total de MS y MO, y aumentó ($P < 0.05$) la digestión en tracto total de FDN, N, almidón y energía digestible (ED). La suplementación de MOS aumentó ($P \leq 0.02$) la FDN en tracto total (10.7%) y la digestión de N (2.0%), y tendió a mejorar la digestión en tracto total de MS ($P = 0.06$), almidón ($P = 0.10$) y ED de la dieta ($P = 0.07$). En comparación con el control, SCMOS aumentó la digestión en tracto total ($P \leq 0.03$) de todas las fracciones evaluadas, incluido un aumento del 4.2% ($P < 0.01$) en la ED de la dieta. Aunque los ovinos alimentados con MOS tenían una digestión de FDN mayor (6.7%, $P = 0.02$) que los alimentados con SC, las diferencias en la digestión en tracto total de MS, MO, N, almidón y ED de la dieta no fueron apreciables ($P \geq 0.24$). En comparación con SC y MOS alimentados por separado, SCMOS mejoró ($P < 0.05$) la digestión en tracto total de N y FDN. MOS aumentó ($P = 0.04$) el pH ruminal y disminuyó ($P < 0.01$) el N-NH₃ en rumen. SC y MOS aumentaron ($P \leq 0.02$) los AGV's totales y disminuyeron la proporción molar de butirato ruminal. MOS tendió ($P = 0.07$) a aumentar la proporción molar de acetato. La suplementación de los eubióticos no afectó la proporción de acetato/propionato ni la producción estimada de metano. Consistente con la disminución de la concentración ruminal de N-NH₃ y butirato, SC y MOS disminuyeron el recuento de *C. aminophilum*. La suplementación de eubióticos en dietas de alta energía para ovinos en finalización mejora la digestión en tracto total de MO, FDN, N y la ED de la dieta. La reducción

de algunas bacterias ruminales hiper-productoras de amoníaco (*C. aminophilum* y *C. Sticklandii*) puede contribuir a mejorar la retención de N de la dieta en rumen. La suplementación de probióticos y prebióticos tienen efectos positivos sobre la digestión de N, FDN y en la disminución del recuento de bacterias ruminales hiper-productoras de amoniaco en ovinos en finalización alimentados con una dieta de alta energía.

Palabras clave: Eubióticos, digestión, fermentación, corderos, finalización.

ABSTRACT

Four male lambs (Pelibuey × Katahdin; 45.1± 2.7 kg initial weight) with “T” cannulas in the rumen were used in a 4 × 4 Latin square experiment to evaluate the effects of single or combined supplementation of probiotics and prebiotics on ruminal fermentation and total tract digestion. Dietary treatments consisted of a cracked corn-based basal finishing diet supplemented with: 1) no eubiotics (**Control**); 2) 3g *saccharomyces cerevisiae* /lamb/day (**SC**) , 3) 3g mannan oligosaccharide plus β -glucans and yeast metabolites/lamb/day (**MOS**), and 4) combination of 1.5 g/day SC and 1.5 g/day MOS (**SCMOS**) in a 2 × 2 factorial arrangement. There were no SC×MOS interactions on digestion, ruminal fermentation, nor ruminal bacteria count. Supplemental SC supplementation tended (P=0.06) to increase total tract digestion of DM and OM, and increased (P<0.05) total tract digestion of NDF, N, starch, and digestible energy (DE). Supplemental MOS increased (P≤0.02) total tract NDF (10.7%) and N digestion (2.0%) and tended to improve total tract digestion of DM (P=0.06), starch (P=0.10) and DE diet (P=0.07). Compared to control, SCMOS increased (P≤ 0.03) total tract digestion of all fractions evaluated, including a 4.2% (P<0.01) increase in diet DE. Although lambs fed MOS had greater (6.7%, P=0.02) NDF digestion than those fed SC, differences in total tract digestion of DM, OM, N, starch and DE diet were not appreciable (P≥ 0.24). Compared with SC and MOS fed separately, SCMOS improved (P<0.05) total tract digestion of N and NDF. Supplemental MOS increased (P=0.04) ruminal pH and decreased (P<0.01) ruminal N-NH₃. SC and MOS increased (P≤ 0.02) total VFA and decreased ruminal molar proportion butyrate. MOS tended (P=0.07) to increase the molar proportion of acetate. Eubiotic supplementation did not affect proportion of acetate/propionate nor estimated methane production. Consistent with decreases on N-NH₃ and butyrate ruminal concentration, SC and MOS decreased *C. aminophilum* count. Eubiotics supplementation of high-energy lamb finishing diets enhances total tract digestion of OM, NDF, N, and digestible energy of diet. The reduction of some hyper-ammonia producing ruminal bacteria (*C. aminophilum* and *C. Sticklandii*) may contribute to improved dietary N economy. The supplementation of probiotics and prebiotics has

positive effects on N, NDF digestion, and on decreases on ruminal hyper-ammonia bacteria count in lambs fed a high-energy diet.

Keywords: eubiotics, digestion, fermentation, lambs, feedlot.

INTRODUCCIÓN

La adición de antibióticos en pequeñas dosis a la ración de los animales de producción ha sido una práctica habitual desde los años cincuenta, esto con el objetivo de modificar la cantidad y el metabolismo de ciertos microorganismos con el fin de optimizar tanto la fermentación de nutrientes a nivel ruminal, como la reducción de la incidencia de algunas afecciones que interfieran en los procesos de absorción óptima de nutrientes a nivel post ruminal (Fajt, 2007).

Sin embargo, en aquellos años no se consideró que la administración de antimicrobianos en la dieta pudiera generar resistencia microbiana. La resistencia microbiana a los antibióticos, según lo informado por la Asociación Médica Estadounidense, se considera una de las mayores amenazas para la salud humana (Marquardt y Suzhen, 2018), por lo que a finales de los años sesenta surgieron las primeras preocupaciones sobre el incremento de la resistencia y la posible relación con el consumo de antibióticos como promotores del crecimiento en las raciones de los animales de abasto (Modi et al., 2011).

Actualmente, la principal preocupación de los consumidores está relacionada con la práctica de la industria ganadera con el uso de antibióticos en las formulaciones de alimento para el ganado, lo que ha aumentado la preocupación de instancias gubernamentales y de los consumidores hacia la producción de carne y sus derivados libres de antibióticos.

Como respuesta a estas preocupaciones se plantean nuevas alternativas que promueven una producción más “limpia” sin el uso de aditivos que pongan en riesgo la salud humana y animal. Algunos ejemplos de estas alternativas son el uso de microorganismos benéficos, conocidos como “probióticos”, así como ciertas biomoléculas y compuestos derivados de estos, los llamados “prebióticos”, estas sustancias son ahora suministradas en las raciones a los animales para mejorar su metabolismo, salud y producción, esto, sin dañar la salud de quien consuma sus productos y subproductos (Castro y Rodríguez, 2005). El efecto de los probióticos puede ser potenciado mediante la inclusión adicional de prebióticos, ya que estos

últimos dentro de sus funciones, sirven como sustrato para que los organismos probióticos estimulen su crecimiento, proliferación y exclusión competitiva de patógenos (Castillo, 2016).

En ese sentido, el uso de probióticos y prebióticos específicos para el uso en rumiantes se ha popularizado en la actualidad. La evaluación de la eficacia de estos compuestos naturales se ha realizado a través de pruebas de digestión y fermentación *in vivo* y de pruebas de rendimiento productivo (Uyeno et al., 2015; Goto et al., 2016). Los resultados, aunque alentadores, han sido inconsistentes (Giannenas et. al., 2011; Broz y Paulus, 2016) y su efectividad como agente antimicrobiano no se ha estudiado suficientemente.

Se ha asociado a las bacterias hiper-productoras de amoníaco (*Clostridium sticklandii*, *Clostridium aminophilum* F) como posibles indicadores de afectación en la eficiencia de fermentación ruminal (Eschenlauer et al., 2002; Firkins, 2010) y de la salud intestinal (Nguyen y Sperandio, 2012).

Por lo anterior expuesto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la suplementación sola y combinada de probióticos y prebióticos sobre eficiencia de fermentación ruminal y digestión de nutrientes, y así mismo se realizó una identificación y cuantificación, mediante técnicas moleculares, de bacterias energéticamente ineficientes para coadyuvar al esfuerzo por describir con mayor certidumbre el papel de los probióticos y prebióticos como antimicrobianos alternativos utilizados como aditivos alimenticios en ovinos alimentados con dietas de finalización.

OBJETIVO

Evaluar el efecto de la suplementación sola y combinada de probióticos y prebióticos sobre eficiencia de fermentación ruminal y digestión de nutrientes en ovinos alimentados con dietas de finalización.

HIPÓTESIS

Comparada con la suplementación sola, la suplementación combinada de probióticos y prebióticos es más efectiva en la mejora de la eficiencia de fermentación ruminal y la digestión de nutrientes en ovinos alimentados con dietas de finalización.

REVISIÓN DE LITERATURA

Antibióticos como aditivos alimenticios en la producción animal

Los aditivos en la alimentación animal se utilizan principalmente para mejorar la palatabilidad y otras características de los ingredientes, prevenir ciertas enfermedades y sobre todo mejorar la respuesta productiva de los animales.

Los aditivos utilizados con este propósito son muchos y de diferentes tipos, se utilizan sustancias tan diversas como algunos suplementos (vitaminas, macro y micro minerales, etc.), sustancias auxiliares (antioxidantes, emulsionantes, saborizantes, surfactantes, etc.), agentes para prevenir enfermedades (coccidiostáticos, coccidicidas, etc.) y agentes promotores del crecimiento (antibióticos, probióticos, enzimas, ácidos orgánicos, etc.) (Santra y Karim, 2003; Herrera et. al., 2010).

Desde su descubrimiento, los antibióticos han representado una herramienta importante para el tratamiento de las enfermedades infecciosas en el hombre y los animales. Se han suministrado a los animales de granja como promotores del crecimiento y para prevenir las enfermedades (Rosmini et. al., 2004).

Los antibióticos promotores del crecimiento para animales (APC) son los aditivos más utilizados en la alimentación animal; en el cuadro 1 se presentan los principales efectos de los APC en nutrición animal. Estos provocan modificaciones de los procesos digestivos y metabólicos de los animales que se traducen en aumentos de la eficiencia de utilización de los alimentos y en mejoras significativas en la ganancia de peso corporal. Algunos procesos metabólicos modificados por los APC son el nivel de excreción de nitrógeno, la eficiencia de las reacciones de fosforilación celular y la síntesis proteica. Los APC también producen modificaciones en el tracto digestivo que suelen ir acompañadas de cambios en la composición de la flora digestiva (disminución de agentes patógenos), reducciones en el tránsito de la ingesta, aumentos en la absorción de algunos nutrientes

(vitaminas y minerales) y reducciones en la producción de amoníaco y toxinas (Castro y Rodríguez, 2005).

Sin embargo, el uso indiscriminado de estos productos puede acompañarse de complicaciones tales como reacciones alérgicas y retrasos en la identificación del germen causal, entre otros (Cancho et. al., 2000); quizás, una de las complicaciones más importantes es la aparición de bacterias con resistencia antimicrobiana que a su vez, crea la necesidad de creación de antibióticos nuevos.

Cuadro 1. Efectos de los antibióticos promotores del crecimiento en la nutrición animal (Anderson et. al., 1999).

Efectos	Fisiológicos	Nutricionales	Metabólicos
Aumentan	Absorción de nutrientes Consumo de alimento	Retención de energía y nitrógeno Absorción de glucosa, ácidos grasos, vitaminas y micro minerales Nutrientes en plasma	Síntesis hepática de proteínas Fosfatasa alcalina en intestino
Disminuyen	Tiempo de tránsito intestinal Peso, longitud y diámetro de la pared intestinal Multiplicación de células en la mucosa Humedad en heces	Pérdida de energía en intestino Síntesis de vitaminas	Producción de amoníaco y aminos tóxicos Fenoles aromáticos Oxidación de ácidos grasos Ureasa microbiana intestinal

Alternativas al uso de antibióticos en la producción animal

Para el sector ganadero y la industria de alimentos balanceados, el reto actual es conseguir hacer rentables los sistemas de producción, que no hagan necesario el uso de los antiguos aditivos que pueden suponer un riesgo para la salud del consumidor, el medio ambiente y, a su vez, conseguir efectos semejantes a los observados con el uso de estos aditivos, pero con la utilización de sustancias alternativas (Cuadro 2) que sean amables con la salud del consumidor final y el medio ambiente (Yáñez, 2017).

Cuadro 2. Tipos de aditivos alimenticios estimuladores de la capacidad de defensa de los animales frente a microorganismos patógenos (Santomá, 1999).

Grupo	Aditivos	Mecanismo de acción
Inmunoglobulinas	Anticuerpos obtenidos de suero o yema de huevo	Aportan inmunidad pasiva
Inmunoestimuladores	Preparados de la pared celular de bacterias, hongos, levaduras (animales y sintéticos)	Activan el sistema inmunitario
Nutrientes inmunoestimuladores	Algunos ácidos grasos: ALC, ω -3 Algunas vitaminas y carotenoides Algunos microelementos	Estimulan la respuesta inmunitaria
Prebióticos	Fructooligosacáridos Derivados de la manosa	Estimulan el crecimiento de la microbiota intestinal favorable para el animal Bloquean la adhesión de las bacterias patógenas a la pared intestinal
Flora intestinal favorable	Probióticos Exclusión competitiva	Implantar flora favorable Prevención de colonización
Favorecedores de un ambiente intestinal adecuado	Enzimas, Acidificantes, Extractos plantas y aceites esenciales, Antioxidantes, Fungistáticos Ionóforos, Algunas arcillas	Hidrólisis posibles sustratos Reducción pH digestivo Acción antimicrobiana

El uso de APC en forma indiscriminada produjo la aparición de cepas bacterianas resistentes, proceso que se potencializó por la capacidad de transferir la resistencia entre bacterias, incluso de diferente género y especie (Lozano y Arias, 2008).

Se pueden considerar de manera general dos alternativas al uso de APC; la implantación de nuevas estrategias de manejo y la utilización de otras sustancias que tengan efectos similares sobre los niveles productivos de los animales. Según el “Committee on Drug Use in Food Animals” (1999) las estrategias de manejo deben ir encaminadas a reducir la incidencia de enfermedades en los animales, de forma que se evite la reducción en la productividad ocasionada por las enfermedades, y limitar el uso de antibióticos con fines terapéuticos.

En los últimos años, los esfuerzos en la búsqueda de alternativas que puedan suplantar el uso de antibióticos se han venido intensificando, lo cual nos lleva a la reciente utilización de los tan llamados probióticos, como aditivos en las raciones para animales de producción. Dichas sustancias se han definido como microorganismos vivos que ejercen un efecto benéfico para el tracto intestinal del hospedero, manteniendo y reforzando los mecanismos de defensa ante patógenos sin perturbar las funciones fisiológicas y bioquímicas normales, ya que cada día se está prohibiendo más la utilización de antibióticos, la adición de probióticos a la ración alimenticia es una buena opción para mejorar la respuesta productiva de los animales (Puniya et. al., 2015).

En la producción animal, la importancia de los probióticos en cuanto a su uso en la alimentación de los animales de granja se basa en las propiedades que se les atribuyen para mejorar la eficiencia de conversión alimenticia y como promotores del crecimiento (Rosmini et. al., 2004).

Probióticos

Los estudios y las observaciones iniciales de la función benéfica desarrollada por algunas especies bacterianas son atribuidas a Elie Metchnikoff, quien afirmó que "la dependencia de los microbios intestinales con respecto a los alimentos hace posible adoptar medidas para modificar la flora de nuestro organismo y sustituir los microbios nocivos por microbios útiles" (Guarner et. al., 2017).

En 1965 se utilizó por primera vez el término "prebiótico" que significa "a favor de la vida". Inicialmente, esta palabra definió a los microorganismos que promovían el crecimiento de otros microorganismos; posteriormente se aplicó a extractos de tejidos que estimulan el crecimiento microbiano (Salazar y Montoya, 2003) y, actualmente se utiliza para designar las bacterias que tienen efectos beneficiosos para los seres humanos y los animales. El grupo de trabajo conjunto de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2001 definieron a los probióticos como "microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas

confieren un efecto beneficioso para la salud del huésped", sin embargo, estos microorganismos no necesariamente son habitantes propios del tracto gastrointestinal, pero se pueden encontrar como microbiota natural en productos como leche, carne y algunos vegetales, causado la fermentación natural de ellos.

Clasificación de los probióticos

Hay una serie de microorganismos utilizados como probióticos, que se pueden clasificar de la siguiente manera:

1. Bacterianos y no bacterianos: con la excepción de ciertos probióticos de hongos y levaduras, la mayoría de los microorganismos utilizados son bacterias. Ejemplos de probióticos bacterianos son varias especies de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacillus* y *Enterococcus*. Los probióticos no bacterianos (de levadura o de hongos) incluyen *Aspergillus oryzae*, *Candida pintolopesii*, *Saccharomyces boulardii*, y *Saccharomyces cerevisiae*.

2. Formadores de esporas y no formadores de esporas: aunque las cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* que no forman esporas predominaron inicialmente, ahora se usan bacterias que forman esporas; *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens*.

3. Multiespecíficos (o cepas múltiples) y de una sola especie: la composición microbiana de los productos probióticos varía desde una sola cepa hasta composiciones de múltiples cepas o especies.

4. Alóctonos y Autóctonos: los microorganismos utilizados como probióticos que normalmente no están presentes en el tracto gastrointestinal de los animales se denominan alóctonos (por ejemplo, levaduras), mientras que los microorganismos que son habitantes normales del tracto gastrointestinal se conocen como autóctonos (por ejemplo, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*) (FAO, 2016).

Características que deben cumplir los probióticos

Las metodologías de selección utilizadas para las diferentes cepas de bacterias candidatas a ser seleccionadas como probióticos deben evaluar ciertos criterios para asegurar las características funcionales de las mismas una vez en el interior del organismo.

Para que un microorganismo pueda ser catalogado como probiótico debe ser estable a su paso por el estómago, para ello el microorganismo debe ser sometido a pruebas de resistencia a ácidos. Dichas pruebas son de suma importancia ya que la resistencia varía de una especie de microorganismo a otra. El pH del estómago es de 1.5 y el tiempo medio que el alimento tarda en el estómago desde que es ingerido hasta que sale, es de 90 minutos, por lo tanto, para que un microorganismo sea clasificado como probiótico, debe ser capaz de resistir ese pH y ese tiempo sin perder su viabilidad.

Otra barrera importante en el intestino delgado son las sales biliares, para que un microorganismo clasificado como probiótico pueda ejercer su efecto beneficioso en el tracto gastrointestinal, debe resistir la acción bactericida de estas sales (Castro y De Rovetto, 2006).

También se debe tomar en cuenta la capacidad de adhesión a las células epiteliales del intestino ya que sólo las cepas que se puedan adherir correctamente podrán llevar a cabo una colonización del tracto gastrointestinal efectiva y de esta manera beneficiar la salud del huésped.

Por último, los probióticos tienen que ser microorganismos que además de cumplir con los requisitos anteriormente mencionados deben ser capaces de soportar las condiciones de la producción industrial y mantener su viabilidad durante el almacenamiento en refrigeración o congelación, de no ser así, de nada servirá que un alimento contenga microorganismos promotores de la salud del consumidor (González y González, 2006).

La selección de la cepa probiótica dependerá de los requerimientos del animal al que se le va a suministrar, debe garantizar la diversidad de la biota en el intestino y proporcionar estabilidad a su ecología, que puede ser trastornada por cambios en la dieta, estrés y ejercicio vigoroso (Pérez, 2008).

Mecanismo de acción de los probióticos

Se han propuesto varios mecanismos de acción en la efectividad de los probióticos para mejorar la salud del huésped, entre los cuales se destaca que los probióticos modifican el ecosistema intestinal y con ello mejoran los mecanismos inmunológicos de la mucosa, esto lo logran interactuando con todo tipo de microorganismos, tanto comensales como potencialmente patógenos, generando así productos metabólicos finales, como lo son los ácidos grasos de cadena corta, y comunicándose con las células del huésped utilizando señales químicas (Figura 1; Cuadro 3).

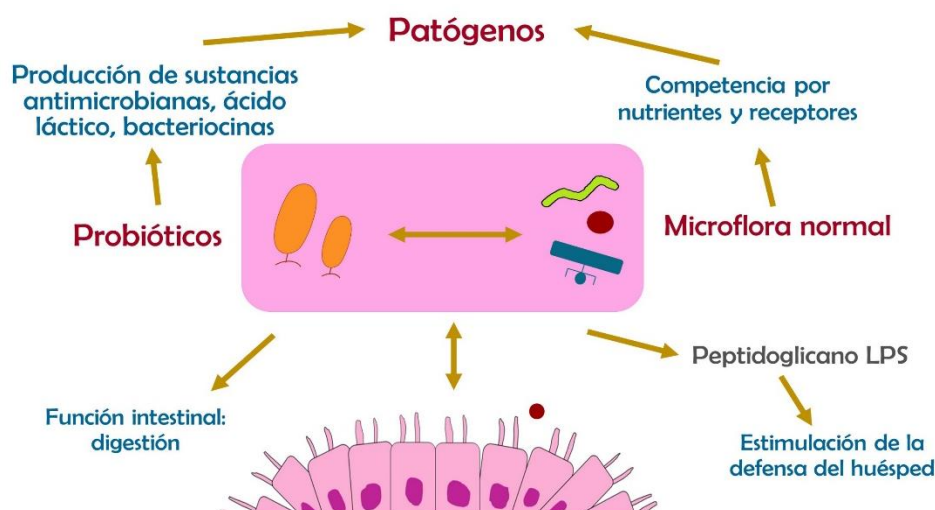


Figura 1 Mecanismos de interacción entre el microbioma, los probióticos y el huésped. El microbioma normal y los probióticos interactúan con el huésped en actividades metabólicas y en la función inmunitaria y evitan la colonización por microorganismos oportunistas y patógenos (Guarner et. al., 2017).

En general, estos mecanismos producen una respuesta favorable por parte del organismo ante la presencia de patógenos, un mejoramiento del ambiente intestinal, un reforzamiento de la barrera intestinal, la regulación de la inflamación y una mejorada respuesta inmunitaria frente a provocaciones antigénicas.

Se cree que estos fenómenos median la mayoría de los efectos beneficiosos, como reducir la incidencia y gravedad de la diarrea, lo que constituye la base de uno de los usos más ampliamente reconocidos de los probióticos (Guarner et. al., 2017).

Cuadro 3. Mecanismos de interacción entre probióticos, prebióticos y huésped.

La simbiosis entre microbiota y huésped puede optimizarse mediante intervenciones farmacológicas o nutricionales en el ecosistema microbiano intestinal utilizando probióticos o prebióticos (Guarner et. al., 2017).	
Probióticos	
Beneficios inmunológicos	Activan a los macrófagos locales para que aumenten la presentación de antígenos a los linfocitos B y que aumenten la secreción de inmunoglobulina A (IgA) tanto a nivel local como sistémico. Modulan el perfil de citoquinas. Inducen tolerancia a antígenos alimentarios
Beneficios inmunológicos no	Digieren el alimento y compiten con los patógenos por nutrientes. Alteran el pH local para crear un ambiente local desfavorable para los patógenos. Producen bacteriocinas que inhiben los patógenos. Eliminan los radicales superóxidos Estimulan la producción de mucina por parte del epitelio Mejoran la función de la barrera intestinal Compiten por la adherencia de los patógenos Modifican las toxinas de los patógenos
Prebióticos	
Efectos metabólicos: producción de ácidos grasos de cadena corta, absorción de iones (Ca, Fe, Mg). Mejoran la inmunidad del huésped (producción de IgA, modulación de las citoquinas, etc.)	

Prebióticos

El término prebiótico es más reciente que el de probiótico, se han propuesto diferentes definiciones para prebiótico, persistiendo todavía hoy el debate de si estas definiciones reflejan todas las propiedades que pueden presentar los prebióticos.

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura también definió a los prebióticos como “ingredientes no digeribles de la dieta, que producen efectos beneficiosos estimulando selectivamente el crecimiento y/o actividad de uno o más tipos de bacterias en el colon, las que tienen a su vez la propiedad de elevar el potencial de salud del hospedero” (Corzo et. al., 2015). Son fundamentalmente fructo y galacto oligosacáridos, los cuales incluyen a una serie de compuestos indigestibles por el animal, que mejoran su estado sanitario impidiendo la adhesión de microorganismos patógenos a la mucosa intestinal (Carro y Ranilla, 2002).

Características de los prebióticos

Para que un ingrediente alimentario o un alimento pueda considerarse como prebiótico debe cumplir una serie de requisitos tales como: 1) no ser hidrolizado o absorbido en el tracto gastrointestinal superior (esófago, estómago y duodeno) y, por lo tanto, ser resistente a la acidez gástrica, a la hidrólisis por enzimas digestivas y no absorberse en el intestino delgado; 2) ser fermentado selectivamente por bacterias beneficiosas de la microbiota intestinal y 3) ser capaz de producir efectos fisiológicos beneficiosos para la salud de quien lo consuma (Corzo et al., 2014).

Mecanismo de acción de los prebióticos

Manano oligosacáridos

El primer paso en el proceso de colonización del tracto digestivo por microorganismos potencialmente patógenos es la fijación de estos microorganismos a las células epiteliales del intestino, dicho proceso se lleva a cabo gracias al empleo de un grupo de proteínas y glicoproteínas bacterianas de superficie denominadas lectinas. Las lectinas son glicoproteínas que se caracterizan por tener la capacidad de enlazarse de forma específica y reversible a carbohidratos de forma libre o que constituyen estructuras más complejas, de tal forma, microorganismos como *Salmonella*, *Escherichia coli* o *Vibrio cholerae* que presentan fimbrias tipo 1, utilizan lectinas con afinidad por la manosa con el fin de unirse a ciertos carbohidratos de

superficie localizados en las células epiteliales del intestino, para fijarse y colonizar la mucosa digestiva (Vergara y Hernández, 2016).

Una vez que se llevó a cabo la fijación, el siguiente paso en el proceso de colonización es la entrada de la célula patógena en la célula hospedera y posteriormente su difusión sistémica. Esto sustenta a la prevención de la fijación como objetivo para el desarrollo de nuevas estrategias, preventivas de patologías intestinales causadas por bacterias. El empleo de manano oligosacáridos (MOS) como sustratos que previenen la colonización de bacterias patógenas, parte del proceso antes descrito, ya que ciertos azúcares como la manosa, pueden utilizarse como inhibidores de la fijación de patógenos mediada por lectinas presentes en las fimbrias (figura 2), la principal consecuencia de evitar esta fijación es una reducción de la colonización del tracto digestivo por patógenos, que son excretados en las heces, lo cual mejora la integridad y funcionalidad de la barrera epitelial intestinal. De esta forma, los MOS previenen infecciones bacterianas mediante mecanismos diferentes a los utilizados por los antibióticos, evitando la capacidad de los microorganismos de desarrollar resistencia (Gainza y Romero, 2017).

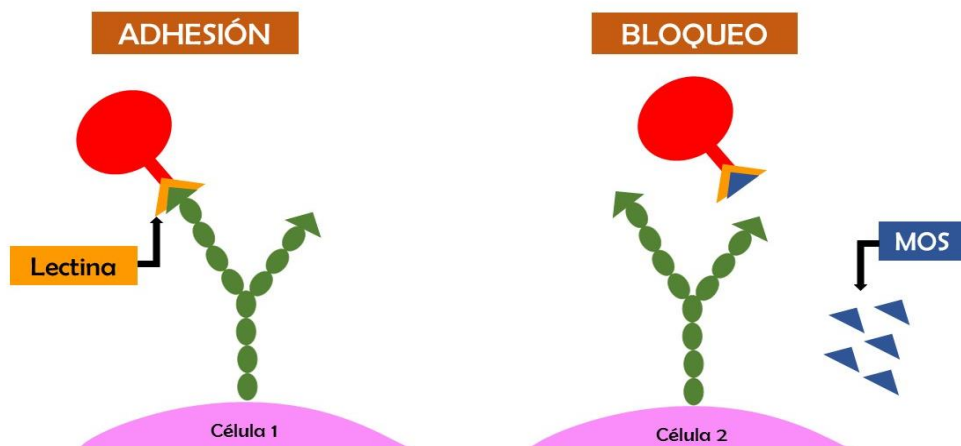


Figura 2 Esquemización de la inhibición competitiva de la fijación bacteriana del hospedero mediante el bloqueo por afinidad de las lectinas bacterianas por MOS. Célula 1 adhesión de las lectinas bacterianas a las unidades de manosa constituyentes de las glicoproteínas del epitelio intestinal. Célula 2 adhesión bloqueada por ocupación competitiva de las lectinas bacterianas por MOS (Gainza y Romero, 2017).

β-Glucanos

El mecanismo de acción propuesto para los β-glucanos es la estimulación de la inmunidad innata, específicamente a nivel de monocitos y macrófagos, células que presentan receptores para β-glucanos, y que al ser estimulados inducen la producción del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) e interleuquina 1 (IL-1), factor activador de plaquetas y metabolismo de los eicosanoides, conduciendo a un estado de alerta inmunológico. En humanos, el consumo de levaduras resultó en una serie de cambios a escala celular y humoral en los perfiles sanguíneos. Esta serie de cambios incluyeron incrementos en las células de tipo eritrocitos, leucocitos, células polimorfonucleares, neutrófilos y componentes del sistema de proteínas del complemento (Taylor et al., 2002; Brown y Gordon, 2003).

Utilización de prebióticos por microorganismos intestinales

Dado que algunos microorganismos pueden producir compuestos beneficiosos para la salud del huésped, actualmente existe un gran interés en usar dietas que promuevan el crecimiento de estos grupos bacterianos. En la figura 3 pueden apreciarse los principales metabolitos generados a partir de la utilización de los carbohidratos prebióticos por los microorganismos (fermentación sacarolítica), en el intestino grueso. Tras la ingestión de un alimento se origina una serie de gases tales como hidrogeno (H_2), dióxido de carbono (CO_2), metano (CH_4) y ácidos grasos de cadena corta (SCFA) (principalmente acetato, butirato y propionato), además de lactato, que son beneficiosos tanto para los microorganismos intestinales (disminuyendo ligeramente el pH), como para las células intestinales (que necesitan estos SCFA para obtener energía) (Corzo et. al., 2015).

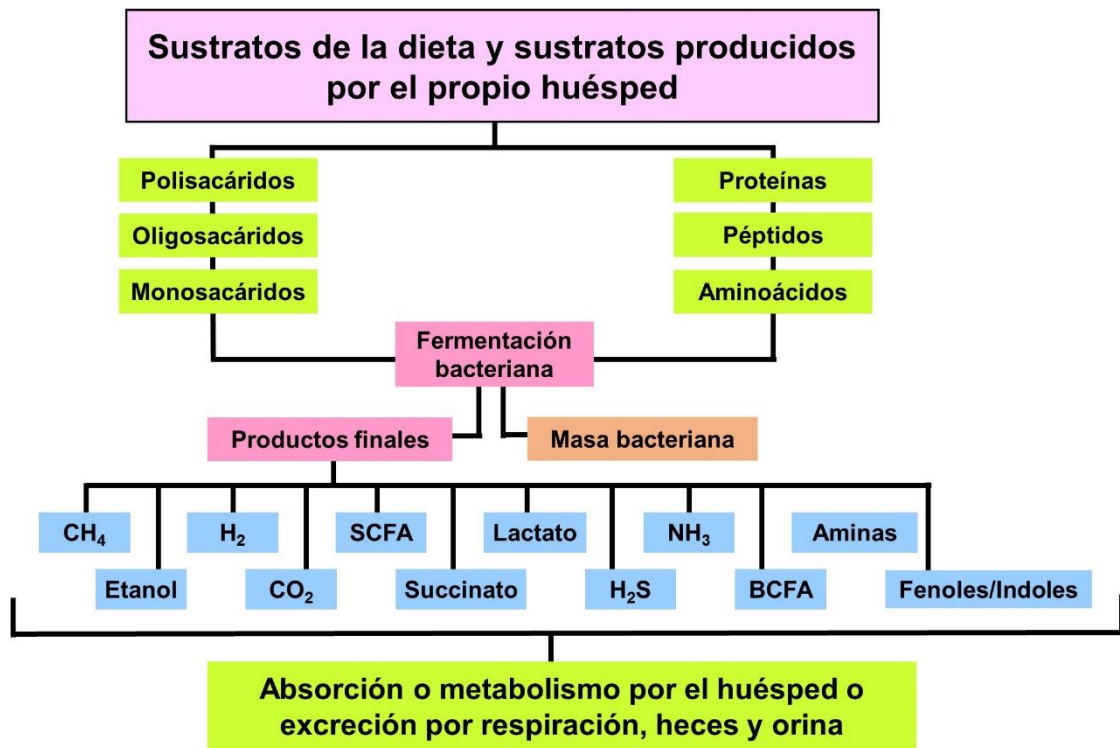


Figura 3. Esquema general de la fermentación por los microorganismos del colon humano de proteínas y carbohidratos. SCFA = Ácidos Grasos de Cadena Corta, BCFA= Ácidos Grasos Ramificados (Corzo et. al., 2015).

Probióticos y prebióticos en la nutrición de rumiantes

En la actualidad existe un creciente interés internacional en la manipulación del ecosistema ruminal, esto con el propósito de aumentar la eficiencia en los procesos de fermentación y así mejorar la respuesta productiva de los animales y, a la vez, reducir la emisión de gases de efecto invernadero al ambiente.

Los microorganismos que constituyen los probióticos son principalmente bacterias capaces de producir ácido láctico, pero también se incluyen bacterias no lácticas, levaduras y hongos (Alvarado, 2011). Es importante destacar que ésta es una primera e importante diferencia entre monogástricos y rumiantes, en lo que se refiere a las posibilidades de utilización de los probióticos. Esto es debido a que los rumiantes son capaces de producir importantes cantidades de lactato y lactobacilos en el retículo-rumen en condiciones naturales de acidez (dietas con elevada concentración de almidón).

Uno de los puntos de mayor interés del empleo de los probióticos en rumiantes es controlar la acumulación de lactato a nivel de rumen, el cual se intenta conseguir por medio de la estimulación de los microorganismos utilizadores de lactato y así mismo estimular la síntesis de propionato. Para este objetivo, son pocos los probióticos que han sido estudiados en el caso específico de los rumiantes (Caja et. al., 2003).

Levaduras como probióticos en rumiantes

Las levaduras han sido usadas durante muchos años como una fuente de proteína de alta calidad en las dietas para animales. Su alto contenido en vitaminas, enzimas y otros importantes cofactores también las hacen atractivas como una ayuda digestiva con efectos positivos en animales rumiantes y monogástricos (Castro y Rodríguez, 2005).

Las levaduras necesitan azúcares y almidón para su metabolismo y los captan del medio ruminal, evitando así que estos sustratos sean empleados por microorganismos ruminales productores de ácido láctico. A través de este mecanismo se reducen las concentraciones de ácido láctico en el rumen, disminuyendo el riesgo de acidosis, y se estabiliza el pH ruminal en valores adecuados para la celulólisis. Como consecuencia se produce un aumento de la degradación de la fibra y la producción de ácidos grasos volátiles, lo cual se traduce en una mejora de la eficiencia de utilización del alimento. Además, al aumentar la degradación de la fracción fibrosa del alimento, se puede estimular su ingestión por los animales (Castro y Rodríguez, 2005).

Otro mecanismo implicado en la estimulación de la población microbiana ruminal es la liberación al medio de sustancias que puedan favorecer el crecimiento microbiano, los denominados “factores de crecimiento”, entre los que destacan el ácido málico, vitaminas y péptidos. Al estimular el crecimiento de las bacterias ruminales, las levaduras pueden provocar un aumento del flujo duodenal de proteína microbiana y con ello una mayor disponibilidad de aminoácidos para el animal hospedador. También se ha observado que las levaduras pueden utilizar hidrógeno

y reducir así su disponibilidad para la formación de metano por las arqueas metanogénicas (figura 4) (Carro et. al., 2014).

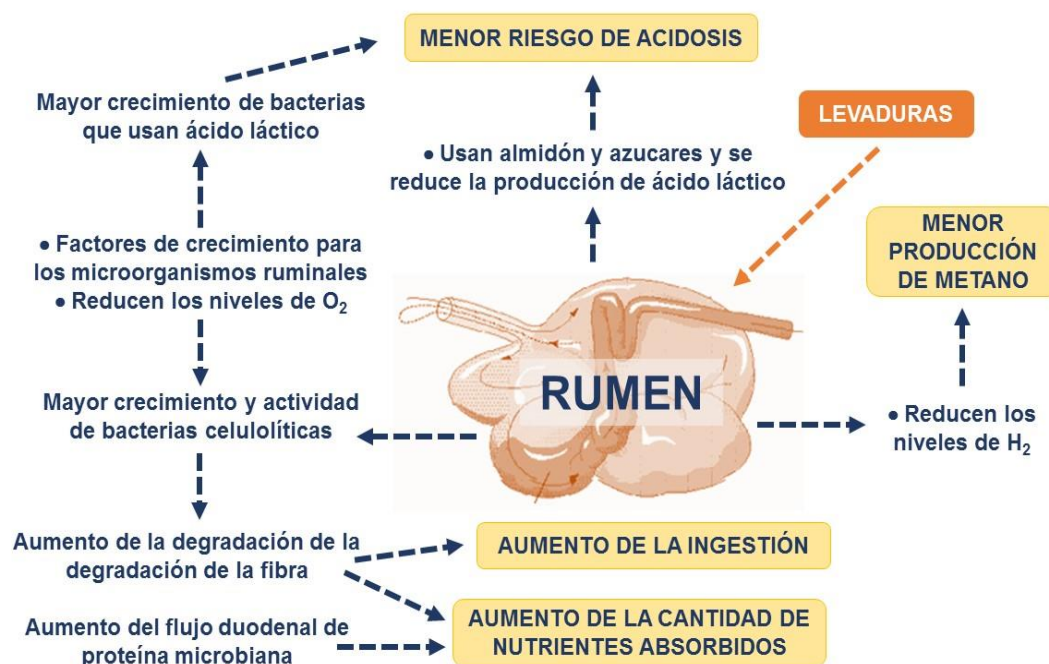


Figura 4 Mecanismos de acción de los cultivos de levaduras en el rumen (Carro et. al., 2014).

Efectos benéficos de las levaduras en animales rumiantes

La utilización de levaduras vivas, en animales rumiantes, está asociada a mejoras en la expresión productiva, algunos efectos de esta mejora son:

- Estabiliza el pH en el rumen, logrando eficiencia en el proceso digestivo.
- Aumenta el consumo de materia seca y la degradación de la fibra, que permite al animal consumir más alimento.
- Aumenta la producción de energía y proteína microbiana en el rumen.
- Mejora la ganancia media diaria de peso vivo y la condición corporal.
- Aumenta la producción láctea y reduce el conteo de células somáticas en la leche, mejorando su calidad.
- Estimula la respuesta inmune no específica de los animales (Suárez y Guevara, 2018).

Saccharomyces cerevisiae

Las levaduras son una fuente importante para obtener productos con actividad probiótica, ya sea como cepas vivas o utilizando derivados de sus paredes celulares. Estas preparaciones han demostrado una actividad inmunoestimulante demostrada en animales de granja, así como mejoras en los procesos de la fisiología digestiva, lo que contribuye a mejores resultados de producción (Casas, 2018).

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) es uno de los suplementos probióticos más utilizados en la nutrición de vacas lactantes para mejorar la fermentación del rumen y, por consiguiente, el rendimiento de la leche, desde hace años se ha observado que la administración continuada de cultivos de *S. cerevisiae* provoca un aumento en el número y actividad de bacterias anaerobias y bacterias celulolíticas en el rumen (Carro y Ranilla, 2002). La incorporación de las técnicas moleculares al estudio de la microbiología ruminal en los últimos años ha permitido confirmar estos efectos e identificar los microorganismos ruminales que se ven afectados por estos cultivos.

En un estudio realizado por Pinloche et al. (2013) se observó que la administración de un cultivo de levaduras a vacas lecheras provocó un aumento de las poblaciones de *Megasphaera*, *Selenomonas*, *Fibrobacter* y *Ruminococcus*. Los dos primeros géneros incluyen bacterias que utilizan ácido láctico en su metabolismo, mientras que a los dos últimos géneros pertenecen las principales bacterias celulolíticas del rumen. Lo cual nos indica que el mecanismo de acción de las levaduras como agentes probióticos puede basarse en una estimulación del crecimiento de las bacterias celulolíticas ruminales.

Efecto de *S. cerevisiae* sobre digestibilidad de nutrientes

La mejora en el rendimiento de los rumiantes a menudo se asocia (al menos parcialmente) con una mejora en la digestibilidad de los nutrientes. López et al. (2013) evaluaron la influencia de la adición de diferentes niveles de *S. cerevisiae* en la dieta de novillos Holstein, sobre la síntesis de proteína microbiana y

características en la digestión. Estos autores reportan un claro aumento en la digestión de Fibra Detergente Neutro (FDN), con forme se amentó el nivel de levadura viva en la dieta (Tabla 1), lo cual, indirectamente nos indica que dicho microorganismo ayudó a la digestión de la fibra y propició el desarrollo de bacterias fibrolíticas.

Tabla 1. Efecto de la suplementación con levadura sobre el pH ruminal y la digestión en novillos Holstein (López et. al., 2013).

Variable	Control	Tratamientos		
		10	20	30
pH ruminal ^b	6.19	6.25	6.08	6.38
Consumo (g/d)				
Digestión ruminal (%)				
Materia orgánica	57.3	57.8	59.1	59.3
FDN	32.2	41.3	41.1	43.8
Digestión en tracto total (%)				
Materia seca	79.80	80.12	81.31	81.95
Materia orgánica	80.78	80.89	82.45	82.94
FDN	45.3	45.7	49.8	49.8
N	70.64	71.55	71.68	71.56
ED (%)	78.84	79.16	80.96	81.0
ED (MJ/kg)	14.27	14.31	14.68	14.69

^a La fuente de cultivo de levadura viva utilizada fue: *Saccharomyces cerevisiae* N. cepa 7907, Biotecap®, Guadalajara, México, que contenía 5.5×10^9 UFC/g (base aire-seco).

^b El pH ruminal se midió a las 4 h postprandial (comida de la mañana).

^c La eficiencia microbiana se expresó como: N microbiana duodenal, g / kg de MO fermentada en el rumen.

^d La eficacia de la proteína se estimó como: N duodenal no amoniacal, g/g N consumido.

Así mismo, Shen et al. (2018) realizaron un estudio en vaquillas en finalización habilitadas con cánula ruminal y duodenal, ellos evaluaron 5 tratamientos; 1) dieta control sin suplementos, 2) dieta control suplementada con antibióticos (330 mg de monensina y 110 mg de tilosina cabeza/día), 3) administración ruminal de productos de fermentación de *S. cerevisiae* (rSCFP) (18 g), 4) administración duodenal de productos de fermentación de *S. cerevisiae* (dSCFP) (18 g), y 5) una combinación de rSCFP y dSCFP (18 g respectivamente), reportando una mayor ingesta de MS en las vaquillas alimentadas con la combinación de rSCFP y dSCFP (rdSCFP), mayor cantidad de materia orgánica fermentada (MO) así como un mayor recuento de protozoos y mayor proporción

de acetato para el tratamiento de rSCFP, además la digestibilidad en tracto total de MO y FDN fue mayor con rSCFP y rdSCFP (Tabla 2). Estos resultados demuestran que la alimentación de SCFP mejoró la digestibilidad de MO y FDN. Este estudio nos muestra que los productos de fermentación de *S. cerevisiae* se desempeñaron mejor o igual a los antibióticos utilizados actualmente en las raciones para el ganado, y podrían ser una alternativa natural para la producción de carne de ganado vacuno.

Tabla 2. Efecto de la suplementación de productos de fermentación de *S. cerevisiae* (SCFP) sobre fermentación ruminal en vaquillas en finalización (Shen et. al., 2018).

Variable	Tratamientos				
	Control	Antibióticos	rSCFP	dSCFP	rdSCFP
Ácidos grasos volátiles (AGV)					
Total, m M	141.9	136.6	132.6	141.6	134.5
Acetato (A), mol/100 mol	47.2	47.2	51.8	47.3	45.1
Propionato (P), mol/100 mol	28.5	31.4	29.4	30.0	26.8
Butirato, mol/100 mol	18.6 ^{ab}	15.4 ^{bc}	13.4 ^c	16.8 ^{bc}	22.3 ^a
Proporción A:P	1.86	1.74	2.10	1.76	1.88
Ácido láctico, m M	0.19	0.11	0.12	0.08	0.08
NH ₃ -N, m M	9.35	9.40	11.80	7.46	9.19
Protozoarios, x10 ⁵ /mL	3.53 ^b	2.83 ^b	9.93 ^a	2.78 ^b	4.35 ^b

^{a-c} Diferentes superíndices dentro de una fila indican una diferencia significativa ($P < 0.05$).

Efecto de *S. cerevisiae* sobre fermentación ruminal

Desnoyers et al. (2009), realizaron un meta-análisis cuantitativo de 110 documentos, 157 experimentos y 376 tratamientos, estudiando los efectos de los probióticos de levadura (*S. cerevisiae*) en rumiantes (bovinos, caprinos, ovinos y búfalos) en el consumo de alimento, producción de leche y fermentación ruminal, ellos encontraron que la levadura viva aumentó significativamente las concentraciones de ácidos grasos de cadena corta y aumentó el pH del rumen, pero también observaron mucha variación en los resultados. Aunque la suplementación con levadura disminuyó moderadamente la concentración de ácido láctico en rumen, no hubo ningún efecto en la proporción acetato-propionato. Sin embargo, el efecto de la suplementación con levadura en la fermentación ruminal varió con la

proporción forraje-concentrado de la dieta. En general, el efecto positivo de la suplementación de levadura sobre el pH del rumen aumentó con el porcentaje de concentrado en la dieta y con el nivel de consumo de MS.

En los últimos años se ha postulado que los probióticos y prebióticos basados en levadura aumentan el número de bacterias celulolíticas en rumiantes, afectando la fermentación microbiana, lo que se traduce en una mayor degradación de celulosa y una mayor producción de proteína microbiana. Usando PCR cuantitativa en tiempo real, Ding et al. (2014) demostraron que *S. cerevisiae* aumentó el número total de bacterias en el rumen de novillos cruzados alimentados con diferentes proporciones de forraje:concentrado, sin afectar el número de hongos y protozoos. El porcentaje de *Selenomonas ruminantium*, una bacteria utilizadora de lactato, aumentó, mientras que el porcentaje de *Ruminobacter amylophilus*, una bacteria degradadora de almidón, disminuyó.

Efecto de *S. cerevisiae* sobre poblaciones bacterianas.

Ran et al. (2018) realizaron un estudio con novillos en finalización alimentados con una dieta base suplementada con antibióticos, levadura activa seca y levadura activa seca encapsulada. Los tratamientos utilizados fueron los siguientes: 1) control (sin suplementación de antibióticos o levadura), 2) antibiótico (ANT; 330 mg de monensina + 110 mg de tilosina novillo/día), 3) levadura activa seca (ADY; 1,5 g novillo/día), 4) ADY encapsulado (EDY; 3 g novillo/día), y 5) una mezcla de ADY y EDY (MDY; 1.5 g ADY + 3 g EDY novillo/día). Ellos reportan que los conteos fecales de *E. coli* tendieron a ser diferentes entre los tratamientos en el día 0 y 56, con mayores recuentos para el control y ANT en el día 0, y para ANT y EDY en el día 56. No hubo diferencia estadística en los conteos fecales de *E. coli* entre el control y ANT, mientras que los novillos suplementados con ADY, EDY o MDY tendieron a tener menores conteos de *E. coli* que los novillos con el tratamiento control y ANT para el día 112. Aunque los conteos de *E. coli* disminuyeron desde el día 0 hasta el día 56 para todos los tratamientos, en los novillos suplementados con EDY y MDY se observó una reducción en el conteo bacteriano de un poco más del

50% desde el día 56 hasta el día 112 (Tabla 3). Estos resultados claramente nos señalan los efectos beneficiosos de la levadura sobre el ecosistema intestinal.

Tabla 3. Conteo fecal de *Escherichia coli* en novillos en finalización alimentados con una dieta suplementada con antibióticos (ANT), levadura seca activa (ADY), ADY encapsulada (EDY) o una mezcla de ADY y EDY (MDY) (Ran et. al., 2018).

Item	Tratamientos ¹				
	Control	ANT	ADY	EDY	MDY
<i>E. Coli</i> , x10 ⁷					
Día 0	17.34	14.75	6.35	8.24	11.56
Día 56	5.8	7.92	4.04	7.21	5.83
Día 112	8.47	10.08	3.99	3.27	2.47

¹Control = sin levadura y sin antibióticos; ANT (monensina 330 mg + tilosina 110 mg, cabeza/día); ADY (1.5 g cabeza/día); EDY (3 g cabeza/día); y MDY (ADY 1.5 g + EDY 3 g cabeza/día).

Sin embargo, Mikulec et al. (2010) realizaron un ensayo de alimentación para evaluar el efecto de levadura viva (*Saccharomyces cerevisiae*) sobre el número de bacterias ruminales de corderos alimentados con una dieta basal suplementada con dos tratamientos; YC0.5 que contenía 0.5 g/día de células de levadura viva y YC1 que contenía 1 g/día de células de levadura viva, no encontrando así efecto significativo de la suplementación de levadura viva en el número de bacterias aerobias y anaerobias del rumen (Tabla 4).

Tabla 4. Efecto de células de levadura viva (*S. cerevisiae*) sobre el número de bacterias ruminales¹ (Mikulec et. al., 2010).

Parámetro	Tratamientos		
	CD ²	YC0.5	YC1
Bacterias anaeróbicas	8.30 x10 ⁹	8.74 x10 ⁹	1.42 x10 ¹⁰
Bacterias aeróbicas	3.4 x10 ⁶	3.8 x10 ⁶	2.9 x10 ⁶

¹Los valores representan las medias $\pm$ SD; ²CD = control; YC0.5 = 0.5 g de células de levadura vivas/día; YC1 = 1 g de células de levadura vivas/día.

LITERATURA CITADA

- Alvarado, U., E. 2011. Beneficios del uso de levaduras en rumiantes, ¿Mito o realidad? Art. Tec. Nutrición Engormix. Disponible en: <https://www.engormix.com/ganaderia-carne/articulos/levaduras-en-rumiantes-t29062.htm>
- Anderson, D., B., McCracken, J., J., Aminov, R., I., Simpson, J., M., Mackie, R., I., Verstegen, M., W., A. and H., R., Gaskins. 1999. Gut microbiology and growth-promoting antibiotics in swine. Pig News & Information. 20:115-122.
- Brown, G., D. and S., Gordon. 2003. Fungal β -Glucans and mammalian immunity. Immunity. 19: 311-315.
- Broz, J. and C. Paulus, 2016. Eubiotics: Definitions and different concepts. DMS-Brighter Living. Paper Rpt.
- Caja, G., González, E., Flores, C., Carro, M., D. y E., Albanell. 2003. Alternativas a los antibióticos de uso alimentario en rumiantes: probióticos, enzimas y ácidos orgánicos. Trabajo presentado en el XIX Curso de Especialización FEDNA, Madrid, España. 10-13.
- Cancho, G., B., García, F., S. y J., S., Gándara. 2000. El uso de los antibióticos en la alimentación animal: perspectiva actual. Ciencia y tecnología alimentaria. 1: 39-47.
- Carro, M., D. y M., J., Ranilla. 2002. Los aditivos antibióticos promotores del crecimiento de los animales: situación actual y posibles alternativas. Departamento de producción animal, Universidad de León, España: 1-4.
- Carro, M., Saro, C., Mateos, I., Díaz, A. y Ranilla, M., J. 2014. Empleo de probióticos en la alimentación de rumiantes. Ganadería; Alimentación Animal. 42-49.

- Casas, R., S. 2018. *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus oryzae*: estimuladores y modificadores de la fermentación y crecimiento microbiano ruminal. *Rev. Prod. Anim.* 30:1-9.
- Castillo, B., V. 2016. Probióticos y prebióticos como alimentos funcionales en nutrición animal. *Rev. Zoocien.* 3: 15-21.
- Castro, L., A., y C., De Rovetto. 2006. Probióticos: utilidad clínica. *Col. Med.* 37: 308-314.
- Castro, M. y F., Rodríguez. 2005. Levaduras: probióticos y prebióticos que mejoran la producción animal. *Rev. Corp.* 6: 26-38.
- Committee on Drug Use in Food Animals. 1999. *The Use of Drugs in Food Animals: Benefits and Risks.* National Research Council. Ed. National Academy Press, Washington, USA.
- Corzo, N., Alonso, J., L., Azpiroz, F., Calvo, M., A., Cirici, M., Leis, R., Lombó, F., Mateos, I., M., Plou, F., J., Ruas, M., P., Rúperez, P., Redondo, A., C., Sanz, M., L. y A., Clemente. 2014. Consenso científico sobre prebióticos. Sociedad española de probióticos y prebióticos. Madrid, España.
- Corzo, N., Alonso, J., L., Azpiroz, F., Calvo, M., A., Cirici, M., Leis, R., Lombó, F., Mateos, I., M., Plou, F., J., Ruas, M., P., Rúperez, P., Redondo, A., C., Sanz, M., L. y A., Clemente. 2015. Prebióticos; concepto, propiedades y efectos beneficiosos. *Nutrición Hospitalaria.* 31: 99-118.
- Desnoyers, M., Giger, S., Bertin, G., Duvaux, C. and D., Sauvant. 2009. Meta-analysis of the influence of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on ruminal parameters and milk production of ruminants. *J. Dairy Sci.* 92: 1620–1632.
- Ding, G., Chang, Y., Zhou, Z., Ren, L. and Q., Meng. 2014. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* on Rumen Fermentation Characteristics, Nutrient Degradation and

Cellulase Activity of Steers Fed Diets with Different Concentrate to Forage Ratios. *J. Agri. Res.* 2: 303-308.

Eschenlauer, S. C. P., N. McKain, N. D. Walker, N. R. McEwan, C. J. Newbold, and R. J. Wallace. 2002. Ammonia production by ruminal microorganisms and enumeration, isolation, and characterization of bacteria capable of growth on peptides and amino acids from the sheep rumen. *Appl Environ Microbiol.* 68: 25-31.

Fajt, R.V. 2007. Regulation of drugs used in feedlot diets. In: *Veterinary Clinics of North America.* (Ed. L.C. Hollis and K.C. Olson). Elsevier Saunders, New York, NY. 299-308.

FAO and OMS. 2001. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

FAO. 2016. Probiotics in animal nutrition; Production, impact and regulation. FAO animal production and health paper 179. Rome.

Firkins, J. L. 2010. Reconsidering rumen microbial consortia to enhance feed efficiency and reduce environmental impact of ruminant livestock production systems. *R. Bras. Zootec.* 39:445-457.

Gainza, O., y J., Romero. 2017. Manano oligosacáridos como prebióticos en acuicultura de crustáceos. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 45:246-260.

Giannenas, I., J. Skoufus, C. Giannakopoulos, M. Wiemann, O. Gortzi, O. Lalas, and S. Kyruzakis. 2011. Effects of essential oils on milk production, milk composition, and rumen microbiota in Chios dairy ewes. *Skoufus J. Dairy Sci.* 94:5569-5577.

González, R., F. y M., B., González. 2006. Criterios de calidad de los microorganismos probióticos y evidencias sobre efectos hipocolesterolémicos. *Rev. Sal. Pub. Nutr.* 7: 1-8.

- Goto, H., A. Q. Qadis, Y. Kim, K. Ikuta, T. Ichijo, and S. Sato. 2016. Effects of a bacterial probiotic on ruminal pH and volatile fatty acids during subacute ruminal acidosis (SARA) in cattle. *J. Vet. Med. Sci.* 78:1595-1600.
- Guarner, F., Sanders, M., E., Eliakim, R., Fedorak, R., Gangl, A., Garisch, J., Kaufmann, P., Karakan, T., Khan, A., G., Kim, N., De Paula, J., A., Ramakrishna, B., Shanahan, F., Szajewska, H., Thomson, A. y A., Le Mair. 2017. Probióticos y prebióticos. Guías Mundiales de la Organización Mundial de Gastroenterología.
- Herrera, L., O., Coto, R., S. y A., E., Medina. 2010. Uso de probióticos y prebióticos en la producción animal (Tesis pregrado). Universidad de Costa Rica. San Pedro, Costa Rica.
- López, S., M., Valdés, G., Y., Plascencia, A., Barreras, A., Castro, P., B., Estrada, A., Ríos, R., F., Gómez, V., Corona, L. and A., R., Zinn. 2013. Influence of feeding live yeast on microbial protein synthesis and nutrient digestibility in steers fed a steam-flaked corn-based diet. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A.* 63:39-46.
- Lozano, A., M. y D., C., Arias. 2008. Residuos de fármacos en alimentos de origen animal. *Rev Colomb Cienc Pecu.* 21:121-135.
- Marquardt, R., R. and L., Suzhen. 2018. Antimicrobial resistance in livestock: advances and alternatives to antibiotics. *Ani. Front.* 8: 30–37.
- Mikulec, Z., Mašek, T., Habrun, B. and H., Valpotić. 2010. Influence of live yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*) supplementation to the diet of fattening lambs on growth performance and rumen bacterial number. *Vet. Arch.* 80: 695-703
- Modi, C. M., S. K. Mody, H. B. Patel, G. B. Dudhatra, A. Kumar, and T. J. Sheikh. 2011. Growth promoting use of antimicrobial agents in animals. *J. Appli. Pharma. Sci.* 8:33-36.

- Nguyen, Y., and V. Sperandio. 2012. Enterohemorrhagic E. Coli (EHEC) pathogenesis. *Frontiers Cell. Inf. Microbiol.* 2: 1-7.
- Pérez, L., H. 2008. Criterios de selección y mecanismos de acción de cepas de levadura para uso como aditivo probiótico en animales. Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA). 1: 38-45.
- Pinloche, E., McEwan, N., Marden, J., P., Bayourthe, C. and E., Auclair. 2013. The Effects of a Probiotic Yeast on the Bacterial Diversity and Population Structure in the Rumen of Cattle. *Plos One.* 8: 1-10.
- Puniya, A., Salem, S., Kumar, S., Dagar, G., Griffith, M., Puniya, A. Y R., Kumar. 2015. Role of live microbial feed supplements with reference to anaerobic fungi in ruminant productivity. *J. Int. Agric.* 14: 550-560.
- Ran, T., Shen, Z., Y., Saleem, M., A., AlZahal, O., Beauchemin, A., K. and W., Z., Yang. 2018. Using ruminally protected and nonprotected active dried yeast as alternatives to antibiotics in finishing beef steers: growth performance, carcass traits, blood metabolites, and fecal *Escherichia coli*. *J. Anim. Sci.* 96: 4385–4397.
- Rosmini, M., R., Sequeira, G., J., Guerrero, L., I., Martí, L., E., Dalla, S., R., Frizzo, L. y J., C., Bonazza. 2004. Producción de probióticos para animales de abasto: importancia del uso de la microbiota intestinal indígena. *Rev. Mex. Ing. Qui.* 3: 181-191.
- Salazar, A., B. y O., I., Montoya. 2003. Importancia de los probióticos y prebióticos en la salud humana. *Rev. Vitae.* 10: 20-26.
- Santomá, G. 1999. Aditivos alternativos a los antibióticos y promotores de crecimiento. Memoria XXXVI Symp. Avicultura, Sec. Esp. WPSA, Valladolid. 95-132.
- Santra, A. and Karim, S. 2003. Rumen Manipulation to Improve Animal Productivity. *J. Anim. Sci.* 16: 748-763.

- Shen, Y., Wang, H., Ran, T., Yoon, I., Mohamed S., A. and W., Yang. 2018. Influence of yeast culture and feed antibiotics on ruminal fermentation and site and extent of digestion in beef heifers fed high grain rations. *J. Anim. Sci.* 96: 3916-3927.
- Suárez, M., C. and R., C., Guevara. 2018. Probiotic use of yeast *Saccharomyces cerevisiae* in animal feed. *Res J Zool.* 1: 1-6.
- Taylor, P., R., Brown, D., G., Reid, D., M., Willment, J., A., Martínez, P., L., Gordon, S., and S., Y., Wong. 2002. The beta-glucan receptor, Dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J. Immunol.* 169: 3876-3882.
- Uyeno, Y., S. Shigemori, and T. Shimosato. 2015. Effects of prebiotics/prebiotics in cattle health and productivity: Minireview. *Microb. Environ.* 30:126-132.
- Vergara, V., A. y R., J., Hernández. 2016. Efectos de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* sobre pollos de engorda suplementados con alimento contaminado con aflatoxina b1 y b2. *Memoria IX Congreso Aviespecialistas de México.* Querétaro. 88-101.
- Yáñez, F., K. 2017. Evaluación del efecto de levaduras comerciales sobre la fermentación ruminal y digestibilidad de los nutrientes mediante un sistema de medición de gas in vitro (Tesis licenciatura). Escuela superior politécnica de Chimborazo. Riobamba, Ecuador.

Heading title: probiotics and prebiotics in finishing lambs

**THE EFFECTS OF SINGLE OR COMBINED SUPPLEMENTATION OF
PROBIOTICS AND PREBIOTICS ON RUMINAL FERMENTATION AND TOTAL
TRACT DIGESTION IN FINISHING LAMBS**

**O. Zapata¹, A. Cervantes², A. Barreras², O.M. Manriquez-Núñez², F. Monge-Navarro²,
V.M. González-Vizcarra², K. Moreno-Torres², O. Chirino, A. Estrada-Angulo¹, J.D.
Urías-Estrada¹, L. Corona-Gochi³, R.A. Zinn⁴, and A. Plascencia^{2*}**

*¹Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Sinaloa.
Culiacán 1084, Sinaloa, México.*

*²Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma de Baja
California, Mexicali 21100, Baja California, México.*

*³Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de México, Cd. De
México, México.*

⁴Animal Science Department, University of California, Davis, CA, USA.

*Corresponding author: (A. Plascencia) email: alejandro.plascencia@uabc.edu.mx

ABSTRACT

Four male lambs (Pelibuey×Katahdin; 45.1± 2.7 kg initial weight) with “T” cannulas in the rumen were used in a 4 × 4 Latin square experiment to evaluate the effects of single or combined supplementation of probiotics and prebiotics on ruminal fermentation and total tract digestion. Dietary treatments consisted of a cracked corn-based basal finishing diet supplemented with: 1) no eubiotics (**Control**); 2) 3g *saccharomyces cerevisiae* /lamb/day (**SC**) , 3) 3g mannan oligosaccharide plus b-glucans and yeast metabolites/lamb/day (**MOS**), and 4) combination of 1.5 g/day SC and 1.5 g/day MOS (**SCMOS**) in a 2 x 2 factorial arrangement. There were no SC×MOS interactions on digestion, ruminal fermentation, nor ruminal bacteria count. Supplemental SC supplementation tended (P=0.06) to increase total tract digestion of DM and OM, and increased (P<0.05) total tract digestion of NDF, N, starch, and digestible energy (DE). Supplemental MOS increased (P≤0.02) total tract NDF (10.7%) and N digestion (2.0%), and tended to improve total tract digestion of DM (P=0.06), starch (P=0.10) and DE diet (P=0.07). Compared to control, SCMOS increased (P≤ 0.03) total tract digestion of all fractions evaluated, including a 4.2% (P<0.01) increase in diet DE. Although lambs fed MOS had greater (6.7%, P=0.02) NDF digestion than those fed SC, differences in total tract digestion of DM, OM, N, starch and DE diet were not appreciable (P≥ 0.24). Compared with SC and MOS fed separately, SCMOS improved (P<0.05) total tract digestion of N and NDF. Supplemental MOS increased (P=0.04) ruminal pH and decreased (P<0.01) ruminal N-NH₃. SC and MOS increased (P≤ 0.02) total VFA and decreased ruminal molar proportion butyrate. MOS tended (P=0.07) to increase the molar proportion of acetate. Eubiotic supplementation did not affect proportion of acetate/propionate nor estimated methane production. Consistent with decreases on N-NH₃ and butyrate ruminal concentration, SC and MOS decreased *C. aminophilum* count. Eubiotics supplementation of high-energy lamb finishing diets enhances total tract digestion of OM, NDF, N, and digestible energy of diet. The reduction of some hyper-ammonia producing ruminal bacteria (*C. aminophilum* and *C. Sticklandii*) may contribute to improved dietary N economy. The supplementation of probiotics and prebiotics has positive effects on N, NDF digestion, and on decreases on ruminal hyper-ammonia bacteria count in lambs fed a high-energy diet.

Keywords: eubiotics, digestion, fermentation, lambs, feedlot

Introduction

Antibiotic feed additives have benefited cattle fed with high-grain rations. Increases on ruminal efficiency fermentation, decreases on ruminal degradation of feed nitrogen and reductions on lactic acid production in rumen it's a common effect of antibiotics in finishing cattle (Modi et al., 2011). On another hand, subtherapeutic levels of antibiotics have been shown that helping to maintain a healthy ruminal epithelium through selective effects on microbial populations (Abdel-Samee, 1995) and might also enhance postruminal nutrient uptake. Newbold (2007) indicate that the effects of dietary supplementation with subtherapeutic levels of antibiotics may be mediated through anti-inflammatory mechanisms. However, there is mounting concern regarding this practice and the development of antibiotic resistance and public health (Landers et al., 2012). Thus, considerable effort has been directed toward advancing the use of more “organic” alternatives. Among these, probiotics and prebiotics have shown promise as feed additives in livestock. Probiotics and prebiotics (eubiotics), in general as reported by different authors, have the ability to enhance intestinal health by stimulating the development of a healthy microbial ecosystem (Uyeno et al., 2015), increase digestive capacity and their bio-availability (Oyetayo and Oyetayo, 2005), prevent enteric pathogens from colonizing the intestine (Casas and Dobrogosz, 2000), restore the gut microflora (Musa et al., 2009), lower pH, and improve mucosal immunity and nutrient absorption (Timmerman et al., 2005; Uyeno et al., 2015). As a result, they are supposed to improve the productivity and the general health of ruminants. However, probiotics and prebiotics have a different mechanism of action and under certain circumstances could be complementary. The combinations of probiotics and prebiotics have been positive effects in dairy cattle and calves by increase the beneficial health effects compared with individual supplementation (Radzikowski, 2017). However, very limited information is available regard to the effects of combined dietary supplementation of probiotics and prebiotics on digestion, ruminal fermentation, and account of some hyper-ammonia ruminal bacteria in finishing cattle. For the above, the objective was to evaluate the effects of single or combined dietary supplementation of probiotics and prebiotics on digestion, ruminal fermentation, account of hyper-ammonia ruminal bacteria, growth performance, dietary energetics and carcass characteristics in finishing lambs.

Material and Methods

All procedures involving live animals were conducted within the guidelines of approved local official techniques of animal care. (NOM-051-ZOO-1995: Humanitarian care of animals during mobilization of animals; NOM-062-ZOO-1995. Technical specifications for the care and use of laboratory animals. Livestock farms, farms, centers of production, reproduction and breeding, zoos and exhibition hall, must meet the basic principles of animal welfare; NOM-024-ZOO-1995: Animal health stipulations and characteristics during transportation of animals. These regulations are in accordance with the specific principles and guidelines presented in IACUC-290-30 and by the Guidelines for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching (Federation of Animal Science Societies [FASS] 2010).

This trial was conducted at the Ruminant Metabolism Experimental Unit of the Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias of the Universidad Autónoma de Baja California located 10 km south of Mexicali City in northwestern México (32° 40' 7" N and 115° 28' 6" W). The area is about 10 m above sea level, and has Sonoran Desert conditions (BWh classification according Köppen).

Animal, diets, and samples analyses

Four male lambs (Pelibuey × Katahdin; 45.1 ± 2.7 kg initial weight) with “T” type cannulas in the rumen were used in a 4 × 4 Latin square experiment to evaluate the effects of treatments on total tract digestion, ruminal fermentation and on ruminal concentration of *C. aminophilum* and *C. sticklandii* (hyper-ammonia-producing bacteria). Lambs were treated for internal parasites (Ivermectin, Vetoquinol, México), received injections of vitamins A, D, E (Synt-ADE, Fort Dodge, Animal Health, México) and were housed in individual metabolism crates (1.5 × 1.8 × 0.7 m) in an indoor facility with access to water at all times. Four dietary treatments were compared using a finishing corn-based diet as basal diet (Table 5) supplemented with eubiotics as follows: 1) No eubiotics (**Control**); 2) basal diet supplemented with live *saccharomyces cerevisiae* at dose of 3g /lamb/day (**SC**; ActiveFlora, ICC, São Paulo, Brazil), 3) basal diet supplemented with mannan oligosaccharide, b-glucans and yeast metabolites at dose of 3g /lamb/day (**MOS**, B-Glucans and Yeast Metabolites; Rumen Yeast,

ICC, São Paulo, Brazil), and 4) basal diet supplemented with 1.5 g/lamb/day SC plus 1.5 g/lamb/day MOS (**SCMOS**) in a 2 x 2 factorial arrangement. The doses of eubiotics were hand-weighed using a precision balance (Ohaus, mod AS612, Pine Brook, NJ, USA) and was added in equal proportions to the basal diet at the time of feeding. Chromic oxide (3.0 g/kg diet, air-dry basis) was used as an indigestible marker to estimate nutrient flow and digestibility. Chromic oxide was mixed in a 2.5-m³ capacity concrete mixer (model 30910-7, León Weill, SA, Coyoacán, México) for 5 min with minor ingredients (mineral supplement composed of limestone and trace mineral salt) before being mixed with the rest of the ingredients (with the exception of supplemental eubiotics which was offered as a dressing at feeding time). All lambs were adapted to the basal diet for 21 days before the initiation of the trial. To avoid refusals during experimental phase, daily feed intake (as feed basis) was restricted to 1.275 kg (equivalent to the 90% of *ad libitum* intake of lambs during the 21-d preliminary period). Diets were fed in two equal proportions at 08:00 and 20:00 hours daily. The experiment lasted 84 days divided in four experimental periods. The experimental period was 21 days long with 7 days of eubiotics withdrawal, 14 days of dietary treatment adjustment in which the last 3 days was for sample collection. During the collection period, fecal and ruminal samples were taken from each lamb. Samples from each lamb and within each collection period were composited for analysis. Fecal samples (approximately 50 g) were collected at 0750, 1150 and 1550 h during three consecutive days. Fecal samples were weighed, identified and frozen at -20°C for posterior analysis. To determine ruminal pH, VFA and concentration of *C. aminophilum* and *C. sticklandii*, the final day of each collection period, a sample of ruminal content (approximately 100 mL) was obtained from each lamb 4 hours after feeding via the ruminal cannula. Ruminal sample was taken by vacuum pump (Cole Parmer Instrument, Vernon Hill, IL) using a tygon tube (3/4"; USP Lima, Ohio). Ruminal pH was immediately determined on fresh samples (Orion 261S, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA.). Followed to pH determination, sample was vigorously mixed and 10 mL was obtained and stored at -20C for molecular analyses. The surplus of the ruminal sample was strained it through 4 layers of cheese cloth. Two mL of freshly prepared 25% (w/v) meta-phosphoric acid was added to 8 mL of strained ruminal fluid. Samples were centrifuge (17,000 × g for 10 min) and supernatant fluid was stored at -20 °C for VFA analysis. For ammonia N analysis, 10 mL of strained ruminal fluid (taken at 2 and 4-h post-feeding) was acidified with 0.5 mL of 6 N

HCL and was stored at -20°C .

Feed and fecal samples were subjected to the following analyses: DM (oven drying at 105°C until no further weight loss; method 930.15; AOAC, 2000); CP ($\text{N} \times 6.25$, method 984.13; AOAC, 2000); ash (method 942.05; AOAC, 2000); aNDFom [Van Soest et al., 1991, corrected for NDF-ash, incorporating heat stable α -amylase (Ankom Technology, Macedon, NY) at 1mL per 100mL of NDF solution (Midland Scientific, Omaha, NE)]; starch (Zinn, 1990), chromic oxide (Hill and Anderson, 1958), gross energy (using the adiabatic bomb model 1271; Parr Instrument Co., Moline, IL, USA) was determined for feed and faecal samples.

Ruminal VFA concentrations were assessed by gas chromatography (Zinn, 1988), methane production was calculated based on the theoretical fermentation balance for the observed molar distribution of VFA (Wolin, 1960), and ammonia N (N-NH_3) in ruminal fluid was determined by procedures adapted from Fawcett and Scott (1960).

The digestion coefficients were indirectly estimated using the Cr_2O_3 as external marker. Total DM excretion in faeces was estimated by the relationship of Cr intake (g) versus concentration of Cr in faecal samples as follows: total DM output, g/day = g Cr_2O_3 intake daily/(g Cr_2O_3 /g of faeces). Organic matter (OM) content of feed and digesta samples were estimated as DM concentration minus ash content.

Identification and ruminal concentration of bacteria (*C. aminophilum* and *C. sticklandii*)

DNA extraction

Total genomic DNA was extracted from ruminal digesta fluid samples. Briefly, 100 mL of ruminal digesta fluid were strained through two layers of muslin cloth and a 1.0 mL aliquot washed 3 times with phosphate buffered saline pH 7.4 (PBS). Briefly, using 15 mL conical centrifuge tubes, 1.0 mL of strained ruminal digesta fluid were added to 9.0 mL of PBS, mixed in vortex for 30 seconds and centrifuged at $650 \times g$ for 10 minutes at room temperature (RT). In wash steps 1 and 2, supernatants were discarded and the pellet resuspended in 10.0 mL of PBS. In step 3, the supernatant was discarded and the pellet

resuspended in 1 mL of PBS. Then, 300 μ L of washed ruminal digesta were subject to bead-beating disruption 3 times for 30 seconds with two minutes of incubation on ice between steps. Disrupted ruminal digesta was centrifuged at $5000 \times g$ for five minutes at (RT) and genomic DNA extracted from 200 μ L of the supernatant using the PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), following the manufacturer's instructions.

Primers for bacteria

The primers for HAB microorganisms were designed and evaluated using the Primer3 Plus web tool (<https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>), the Gene Runner software (<http://www.generunner.net/>) and the Oligonucleotide Properties Calculator (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>). Primers for *Clostridium sticklandii* (GenBank NR_102880.1) were designed to amplify a 122 bp fragment of the 16S ribosomal RNA; primers for *Clostridium aminophilum* strain F (GenBank NR_118651.1) were designed to amplify a 144 bp fragment of the 16S ribosomal RNA (Table 6.).

Standardization of the RT-PCR for HAB bacteria

To establish the optimal volumes and concentrations of reagents for the RT-PCR, the oligonucleotides of each HAB microorganism were tested in triplicate at a concentration of 200 nM, 400 nM and 800 nM with 1 μ L, 2 μ L and 3 μ L of template DNA, respectively, in a total reaction volume of 20 μ L using a master mix containing the EvaGreen fluorophore (Biotium, Hayward, CA, USA), a high-affinity fluorescent stain for double-stranded DNA, no toxic or mutagenic.

Quantitative RT-PCR for bacteria

The extracted DNA from ruminal fluid samples was RT-PCR amplified using the specific primers for each HAB microorganism. The amplified PCR product of each separate HAB was mixed and homogenized in a single aliquot and titrated using a Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) to obtain the DNA copy number per micro liter of PCR amplified product for each HAB microorganism. The titrated DNA was used as to construct a standard curve for the quantitative RT-PCR for HAB microorganisms. Briefly, serial $10\times$ dilutions were generated

from this standardized cDNA sample from 10^{10} , 10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 and 10^2 ; tested in quadruplicate using the RT-PCR platform and the threshold cycle plotted in a graph versus the dilution factor and fit the data to a straight line. A real-time PCR test with 90% to 110% efficiency with an accuracy based on an $R^2 > 0.99$ and amplification curves with T_m within the estimated range for a particular amplicon are considered accurate and efficient (Schlachter et al., 2017).

The results of the amplification of the standard curve calculated by the BioRad CFX96 software showed that the optimal combination of reagents to obtain maximum amplification in the samples is achieved by mixing the oligonucleotides at a concentration of 800 nM with 2 μ L of DNA template, applying an initial denaturation cycle of 95 °C for 3 minutes, followed by 40 cycles of 10 seconds of denaturation at 95 °C, 20 seconds of hybridization at 59.0 °C and a final extension cycle at 72 °C of 15 seconds.

Statistical design and analysis

Treatment effects on characteristics of digestion were analyzed as a balanced 4×4 Latin square design in a 2×2 factorial arrangement using the MIXED procedure according to SAS (2004). The fixed effect consisted of treatment, and random effects consisted of steer and period. The statistical model for the trial was as follows:

$$Y_{ijk} = \mu + S_i + P_j + T_k + E_{ijk},$$

where: Y_{ijk} is the response variable, μ is the common experimental effect, S_i is the steer effect, P_j is the period effect, T_k is the treatment effect and E_{ijk} is the residual error. If no interaction was detected, main effects was exposed. In addition, treatments were compared using a multiple comparisons using the Student's t-test. Contrasts are considered significant when the P value was ≤ 0.05 .

The calculation of the EqG in samples amplified by RT-PCR was performed using a Nano-Drop spectrophotometer whose reading was entered into the equation based on Avogadro's number from the following formula *: Number of copies = (quantity * 6.022×10^{23}) / (length * 1×10^9 * 500) and expressed as $\log_{10}$.

Results and discussion

There were no interactions ($P>0.05$) between treatments. Thus, no P value of interaction are presented in Tables.

The effects of treatments on total tract digestion are shown in table 7. Supplemental SC supplementation tended ($P=0.06$) to increase total tract digestion of DM and OM, and increased ($P<0.05$) total tract digestion of NDF, N, starch, and digestible energy (DE). Supplemental MOS increased ($P\leq 0.02$) total tract NDF (10.7%) and N digestion (2.0%), and tended to improve total tract digestion of DM ($P=0.06$), starch ($P=0.10$) and DE diet ($P=0.07$). Compared to control, SCMOS increased ($P\leq 0.03$) total tract digestion of all fractions evaluated, including a 4.2% ($P<0.01$) increase in diet DE. Although lambs fed MOS had greater (6.7%, $P=0.02$) NDF digestion than those fed SC, differences in total tract digestion of DM, OM, N, starch and DE diet were not appreciable ($P\geq 0.24$). Compared with SC and MOS fed separately, SCMOS improved ($P<0.05$) total tract digestion of N and NDF.

Compared to controls, increases on OM digestion and DE of diet by supplemental prebiotics or probiotics tested here was mainly by increases OM as result of increases on NDF and N digestibility. In several studies (Chaucheyras-Durand et al., 2008, Di Francia et al., 2008), digestibility of fiber significantly increased in probiotic supplemented animals than in controls. Significant improvement in the fiber digestibility in supplemented animals with probiotics or prebiotics might be due to stimulated growth of cellulolytic bacteria (Yoon and Stern, 1996; Bomba et al., 2002), which might have contributed to increased rumen fermentation activity. Fermentation activities of bacteria, especially of cellulolytic strains, have been reported to increase by probiotic supplementation leading to improvement in fiber digestibility (El-Waziry and Ibrahim, 2007). Generally, prebiotic and probiotics supplementation increases total tract NDF by improves on ruminal NDF digestion (López-Soto et al., 2013).

The increase on total tract N digestion in lambs fed eubiotics could be by lower ruminal degradation of dietary N (as exposed below, lower ruminal N-NH₃ concentration was detected in lambs supplemented with eubiotics), promoting greater flows of dietary N to the small intestine, and (or) by increases on duodenal flow of microbial N which was not measured here; however, previous report (Williams et al., 1990) indicates increases on

protein flow to the duodenum in lambs that were supplemented with the probiotic *Saccharomyces cerevisiae*. Furthermore, Plascencia et al. (2017) reported that, in steers, the consumption of a standardized combination of eubiotics increased the flow to the non-ammoniacal N duodenum as a result of the increase of the flow to the duodenum of microbial N, this effect promoted a greater ruminal microbial efficiency and nitrogen efficiency. Those researchers found that steers that were fed with eubiotics showed an increase on postruminal digestion of N, this could be due in part, to the greater flow of NNA to duodenum.

Even though, that lambs received MOS shown greater (6.7%, $P=0.02$) NDF digestion than those received SC, the total tract digestion of DM, OM, N, starch, and DE of diet were similar ($P \geq 0.24$) between SC and MOS. Comparing only with lambs fed with SC or MOS, the combination SCMOS, resulted in greater ($P < 0.05$) total tract digestion of N (an average of 2.4%) and NDF (13 and 7% greater than SC and MOS, respectively). The rest of fractions evaluated were similar digested between lambs that were fed with eubiotics. Probiotics are viable microorganisms and, when administered in sufficient numbers, can modify the microflora of the digestive tract of the host (Rook and Brunet, 2005) in a way resulting in improved health and production. Several microbial species, mainly bacteria (lactic acid and non-lactic acid bacteria), yeasts (dairy strains) or fungi are considered as probiotics (Tripathi et al., 2008). These organisms are genetically stable, able to produce antimicrobial substances and to modify the colonic flora in favour of a healthier composition and hence induce luminal or systemic effect that is beneficial to the host health (Kaur et al., 2002, Paravez et al., 2006). On the other hand, prebiotics may involve other substances besides carbohydrates (such as polyphenols and polyunsaturated fatty acids transformed into corresponding conjugated fatty acids), and may act not only in the alimentary tract. Prebiotics should not be extensively metabolized, but should induce targeted metabolic processes, thus bringing health benefits to the host's ecosystem. The best documented benefits are associated with the use of indigestible oligosaccharides, such as fructans and galactans. Therefore, is expected that combination of life cells (probiotics) and prebiotics (carbohydrates of cell walls) act synergistically. According to our results, their combination had better response than eubiotics alone. Our results are in agreement with previous reports in which the combinations of probiotics and prebiotics have been positive effects in dairy cattle and calves by increase the beneficial health effects compared with individual supplementation (Radzikowski, 2017).

The effects of treatments on ruminal fermentation are shown in Table 8. There were no interactions SC×MOS on ruminal pH measured 4 h post-feeding averaging 5.79 ± 0.26 . The observed ruminal pH in the present study was in close agreement than predicted based on the diet formulation (5.78; NRC, 2000, Level 1). However, MOS supplementation shown greater ($P=0.04$) ruminal pH than controls (5.64 vs 5.94). Effects of probiotic supplementation of small ruminants have not been clearly defined. Some researchers have found no effect in rumen pH of small ruminants (Doreau et al., 1998, Tripathi et al., 2008, López-Soto et al., 2013), whilst others have recorded an increase in rumen pH (Radev, 1999, Khadem et al., 2007). In contrast, Kowalik et al. (2011) and Tripathi and Karim (2011) have reported a reduction in rumen pH in lambs after supplementation with a mixture of diverse species of *saccharomyces*. Other researchers have indicated that the dietary feeding of probiotics stabilized rumen pH (Chaucheyras-Durand et al., 2012) leading to efficient rumen functioning, hence preventing risk of sub-acute ruminal acidosis (Lettat et al., 2012).

Total ruminal VFA tended ($P=0.08$) to increase by MOS, and was increased ($P<0.05$) by SC and by SCMOS combination. Increases on total ruminal VFA concentration is a consistent effect with improves on ruminal OM digestion (Aguilar-Hernandez et al., 2016). Considering that 80% of OM digestible consumed is fermented in rumen (Plascencia and Zinn, 2017); thus, is not aberrant assuming that the increases on total tract OM digestion noted in the present experiment could be explained by increases on ruminal digestion of OM.

Supplemental MOS increased ($P=0.04$) ruminal pH and decreased ($P<0.01$) ruminal N-NH₃. SC and MOS increased ($P \leq 0.02$) total VFA and decreased ruminal molar proportion butyrate. MOS tended ($P=0.07$) to increase the molar proportion of acetate. Eubiotic supplementation did not affect proportion of acetate/propionate nor estimated methane production. Ruminal N-NH₃ concentration was decreased ($P \leq 0.01$) by eubiotics supplementation, this effect is attributable to decreased proteolysis and deamination of amino acids. In general, feeding of yeast increases total volatile fatty acids (VFAs) and reduces ammonia concentration (Abd El-Tawab et al., 2016, Bakr et al., 2015). Nevertheless, some researchers have found no effect of probiotic feed additives in total VFA concentrations in the rumen (Tripathi et al., 2008; Soren et al., 2013).

Consistent with decreases on N-NH₃ and butyrate ruminal concentration, SC and

MOS decreased *C. aminophilum* count (Table 9). An addition of probiotic microorganisms to animal feed plays a significant role in the fight against pathogens, including clostridium (Dalloul and Lillehoj, 2005). Additionally, declines in butyrate production in some studies may reflect reductions in clostridium populations as well (Van den Abbeele et al., 2013), this effect could partially explain both, the decreases on ruminal molar proportion of butyrate, and the decreases on ruminal N-NH₃ concentration (since some clostridiums are hyper-ammonia producing bacteria) observed in the present experiment to lambs received supplemental eubiotics. The mode of action of probiotics and prebiotics as antimicrobial additives is not fully understood. By adhering to the alimentary tract offer stability and protection of the intestinal ecosystem, also influence the course of digestive and metabolic process, and promote conditions to facilitate growth of beneficial bacteria but affect some pathogens microorganisms and toxins (Markoviak and Slizewska, 2017). In supporting to the above, López-Valencia et al. (2017) reported that supporting antibiotic protocol with a mixture of probiotics and prebiotics to infectious diarrheic calves reduced 43% calf mortality and increased 59% weight gain of the surviving calves. Furthermore, supplemented calves with the mixture showed greater levels of glucose, and lower levels of NEFAS and cortisol than un-supplemented calves. They conclude that calves receive the mixture had better energy balance and lesser stress than un-supplemented calves.

Implications

Eubiotics supplementation of high-energy lamb finishing diets enhances total tract digestion of OM, NDF, N, and digestible energy of diet. The reduction of some hyper-ammonia producing ruminal bacteria (*C. aminophilum* and *C. Sticklandii*) may contribute to improved dietary N economy. The combination of probiotics with prebiotics potentiate their positive effects on N, NDF digestion, and on decreases on ruminal hyper-ammonia bacteria count in lambs fed a high-energy diets.

Literature Cited

- Abd El-Tawa, M.M., I.M.I. Youssef, H.A. Bakr, G.C. Fthenakis, N.D. Giadinis. 2016. Role of probiotics in nutrition and health of small ruminants. *Polish J. Vet. Sci.* 19: 893–906.
- Abdel-Samee, M. M. 1995. Using some antibiotics and probiotics for alleviating heat stress on growing and doe rabbits in Egypt. *World Rabbit Sci.*3:107-111.
- Aguilar-Hernández, J. A., J. D. Urías-Estrada, M. A. López-Soto, A. Barreras, A. Plascencia, M. Montaña, V. M. González-Vizcarra, A. Estrada-Angulo, B. I. Castro-Pérez, R. Barajas, H. I. Rogge, and R. A. Zinn. 2016. Evaluation of isoquinoline alkaloids supplementation levels on ruminal fermentation, characteristics of digestion and microbial protein synthesis in steers fed a high-energy diet. *J. Anim. Sci.* 94:267-274
- AOAC. 2000. Official methods of analysis (17th ed.). Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD
- Bakr, H.A., M.S. Hassan, N.D. Giadinis, N. Panousis, D. Ostojic, M.M. Abd El-Tawab, and J. Bojkovski. 2015. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on health and performance of dairy cows during transition and early lactation period. *Biotechnol. Anim. Husb.* 31:349–364.
- Bomba, A., R. Nemcova, D. Mudronova, P. Guba. 2002. The possibilities of potentiating the efficacy of probiotics. *Trends Food Sci. Technol.*13: 121–126.
- Chaucheyras-Durand, F., N.D. Walker, and A. Bach. 2008. Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: Past, present and future. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145:5-26.
- Chaucheyras-Durand, F., E. Chevaux, C. Martin, and E. Forano. 2012. Use of yeast probiotics in ruminants: Effects and mechanisms of action on rumen pH, fibre degradation, and microbiota according to the diet. In: E.C. Rigobelo (Ed.) *Probiotic in Animals*. InTech, Rijeka, Croatia. Pages 119–162.

- Casas, I.A., and W.J. Dobrogosz .2000. Validation of the probiotic concept: *Lactobacillus reuteri* confers broad spectrum protection against disease in humans and animals. Microb. Ecol. Health Dis. 12:247-285.
- Dalloul, R.A., and H.S. Lillehoj. 2005. Recent advances in immunomodulation and vaccination strategies against coccidiosis. Avian Dis. 49:1–8.
- Di Francia A., F. Masucci, G. De Rosa, M.L. Varricchio, V. Proto. 2008. Effects of *Aspergillus oryzae* extract and a *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on intake, body weight gain and digestibility in buffalo calves. Anim. Feed Sci. Technol. 140: 67-77.
- Doreau, M., J.P. Jouany. 1998. Effect of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on nutrient digestion in lactating dairy cows. J Dairy Sci. 81:3214–21.
- El-Waziry, A.M., and H.R. Ibrahim. 2007. Effect of *saccharomyces cerevisiae* of yeast on fiber digestion sheep fed berseem (*trifolium alexandrinum*) hay and cellulose activity. Aust. J. Basic Appl. Sci. 1:379-385.
- FASS. 2010. Federation of Animal Science Societies (FASS). Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching. 3rd ed. Champaign, IL, Federation of Animal Science Societies.
- Fawcett, J. K., and J. E. Scott. 1960. A rapid and precise method for the determination of urea. J. Clin. Pathol.13:156-159.
- Hill, F. N., and D. L. Anderson. 1958. Comparison of metabolizable energy and productive determinations with growing chicks. J. Nutr. 64:587-603.
- Khadem. A.A., M. Pahlavan, A. Afzalzadeh, and M. Rezaeian. 2007. Effect of live yeast *Saccharomyces cerevisiae* on fermentation parameters and microbial populations of rumen, total tract digestibility of diet nutrients and on the “in situ” degradability of alfalfa in Iranian Chall sheep. Pakistan J. Biol. Sci. 10:590-597.
- Kaur, I.P., K. Chopra, and A. Saini. 2002. Probiotics: potential pharmaceutical applications.

Eur. J. Pharm. Sci. 15: 1-9.

Kowalik, B., T. Michałowski, J.J. Pająk, M. Taciak, and M. Zalewska. 2011. The effect of live yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, and their metabolites on ciliate fauna, fibrolytic and amylolytic activity, carbohydrate digestion and fermentation in the rumen of goats. *J. Anim. Feed Sci.* 20: 526-536.

Landers, T., Cohen, B., T.E. Wittum, and E.L. Larson. 2012. A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential. *Pub. Health Rpt.* 127:4-22.

Lettat, A., P. Noziere, M. Silbergberg, D.P. Morgavi, C. Berger, and C. Martin. 2012. Rumen microbial and fermentation characteristics are affected differently by bacterial probiotic supplementation during induced lactic and subacute acidosis in sheep. *B.M.C. Microbiology.* 12: 142-156.

López-Soto, M.A., Y.S. Valdés-García, A. Plascencia, A. Barreras, B.I. Castro-Pérez, A. Estrada-Angulo, F.G. Ríos, A. Gómez-Vázquez, L. Corona, and R.A. Zinn. 2013. Influence of feeding live yeast on microbial protein synthesis and nutrient digestibility in steers fed a steam-flaked corn-based diet. *Acta Agric. Scand. Section A.* 63:39-46.

López-Valencia, G., O. Zapata-Ramírez, L. Núñez-González, V. Núñez-Benítez, H. Landeros-López, M.A. López-Soto, A. Barreras, V. González, A. Estrada-Angulo, R.A. Zinn, R.A., and A. Plascencia. 2017. Effective use of probiotic-glyconutrient combination as an adjuvant to antibiotic therapy for diarrhea in rearing dairy calves. *Turkish J. Vet. Anim. Sci.* 41:578-581.

Markowiak, P, and K. Śliżewska. 2017. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients.* 9:1021-1050.

Modi, S.K. Mody, H.B. Patel, G.B. Dudhatra, Avinash Kumar, and T.J. Sheikh. 2011. Growth promoting use of antimicrobial agents in animals. *J. Applied Pharm. Sci.* 1:33-36.

Musa, H.H., S.L. We, C.H. Zhu, H.I. Seri, G.Q. Zhu. 2009. The potential benefits of

- probiotics in animal production and health. *J. Anim. Vet. Adv.* 8:313-321.
- Newbold, T. A. 2007. The nonantibiotic anti-inflammatory effect of antimicrobial growth promoters, the real mode of action? A hypothesis. *Poult. Sci.* 86:605–609.
- NRC. 2000. Nutrient Requirements of Beef Cattle. 7th Edition. Natl. Acad. Press, Washington, D.C.
- NRC, 2007. Nutrient requirement of small ruminant. Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids. National Academy Press, Washington, DC.
- NOM-024-ZOO-1995. 1995. Estipulaciones de salud animal y características zoosanitarias durante el transporte de animales. http://198.61.233.93:8080/web/a_paginas/a_pdf/024_zoo.pdf (03.11.2015).
- NOM-051-ZOO-1995. 1995. Trato humanitario en la movilización de animales (03.11.2015).
- NOM-062-ZOO-1999. 1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO.PDF> (03.11.2015).
- Oyetayo, V.O., and F.L. Oyetayo. 2005. Potential of probiotics as biotherapeutic agents targeting the innate immune system. *Afr. J. Biotech.* 4:123-127.
- Paravez, S., K.A. Malik, S. Ah-Kang, and H.Y. Kim. 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J. Appl. Microbiol.* 100:1171-1185.
- Plascencia, A., and R.A. Zinn. 2017. The rumen is not a “black box”. AFMA Matrix. The AFMA Symposium Edition. Plaas Media Pub. 26:40-47.
- Plascencia, A., V. Núñez, Y. García, A. Barreras, A. López-Soto, V. González-Vizcarra, A. Hernández, D. Urías-Estrada, and A. Estrada. 2017. Supplemental effects of a standardized mixture of glyconutrients, β -glucan, probiotics and enzymes (Glycozyme) on site and extent of digestion in steers fed a high-energy diet. Congreso

- Internacional de las Ciencias Agropecuarias. Agrociencias 2017, La Habana Cuba. P56.
- Radev, V. 1999. Influence of the yeast culture (Yea-Sacc 1026) on the rumen metabolism in sheep. *Bulgar. J. Agric. Sci.* 5: 663-668.
- Radzikowski, D. 2017. Effect of probiotics, prebiotics and synbiotics on the productivity and health of dairy cows and calves. *WSN*.78:193-198.
- Rook, G.A., and L.R. Brunet. 2005. Microbes, immunoregulation, and the gut. *Gut* 54: 317-320.
- SAS. 2004. User's guide: statistics, version 9. SAS Inst. Cary, NC.USA.
- Schlachter, S., Chan, K., Marras, S.A.E. and Parveen, N. 2017. Detection and Differentiation of Lyme Spirochetes and Other Tick-Borne Pathogens from Blood Using Real-Time PCR with Molecular Beacons. *Methods Mol Biol*, Vol. 1616, pp. 155-170.
- Soren, N.M., M.K. Tripathi, R.S. Bhatt, and S.A. Karim. 2013. Effect of yeast supplementation on the growth performance of Malpura lambs. *Trop. Anim. Health Prod.* 45: 547-554.
- Timmerman, H.M., L. Mulder, H. Everts, D.C. van Espen, E. Van der Wal, G. Klaassen, S.M. Rouwers, R. Hartemink, F.M. Rombouts, and A.C. Beynen. 2005. Health and growth of veal calves fed milk replacers with or without probiotics. *J. Dairy Sci.* 88:2154-2165.
- Tripathi, M.K., and S.A. Karim. 2011. Effect of yeast cultures supplementation on live weight change, rumen fermentation, ciliate protozoa population, microbial hydrolytic enzymes status and slaughtering performance of growing lamb. *Livest Sci* 135: 17-25.
- Tripathi, M.K., S.A. Karim, O.H. Chaturvedi, and D.L.Verma. 2008. Effect of different liquid cultures of live yeast strains on performance, ruminal fermentation and microbial protein synthesis in lambs. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)* 92: 631-

- Uyeno, Y., S. Shigemori, and T. Shimosato. 2015. Effects of prebiotics/prebiotics in cattle health and productivity: Minireview. *Microbes Environ.* 30:126-132.
- Van den Abbeele, P., Belzer, C., Goosens, M., Kleerebezem, V. M. de Vos, O. Thas, R. de Weerd, F. M. Kerckhof, and T. Van de Wiele. 2013. Butyrate-producing *Clostridium* cluster XIVa species specifically colonize mucins in an in vitro gut model. *ISME Journal*. 7:949-961
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Anim. Sci.* 74:834–843.
- Williams, P.E.V., C.J. Newbold. 1990. Rumen probiotics: The effects of novel microorganisms on rumen fermentation and ruminant productivity. In: *Recent Advances in Animal Nutrition* (Haresign, W., and Cole, D.J.A. Eds). Butterworths, London, pp. 211-227.
- Wolin, M.J. 1960. A theoretical rumen fermentation balance. *J. Dairy Sci.* 43:1452-1459.
- Yoon, I.K., and M.D. Stern. 1996. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* cultures on ruminal fermentation in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 79: 411-417.
- Zinn, R.A. 1988. Comparative feeding value of supplemental fat in finishing diets for feedlot steers supplemented with and without monensin. *J. Anim. Sci.* 66:213-227.
- Zinn, R.A. 1990. Influence of steaming time on site of digestion of flaked corn in steers. *J. Anim. Sci.* 68:776-781.

Table 5. Composition of basal diet and treatments for trial 1 and 2¹.

Item	Treatments			
	Control	SC ²	MOS ³	SC+MOS ⁴
Ingredient composition (%)				
Sudan hay	10.00	10.00	10.00	10.00
Cracked corn	70.00	70.00	70.00	70.00
Soybean meal	9.50	9.50	9.50	9.50
Active Flora®	0	++	0	++
Rumen Yeast®	0	0	++	++
Molasses cane	6.00	6.00	6.00	6.00
Yellow grease	2.00	2.00	2.00	2.00
Trace mineral salt ⁵	2.50	2.50	2.50	2.50
Chemical composition (%DM basis) ⁶				
Crude protein	13.43	13.43	13.43	13.43
Starch	62.91	62.91	62.91	62.91
Neutral detergent fiber	15.13	15.13	15.13	15.13
Ash	5.87	5.87	5.87	5.87
Gross energy, Mcal/kg	4.17	4.17	4.17	4.17
Calculated net energy (Mcal/kg) ⁷				
Maintenance	2.10	2.10	2.10	2.10
Gain	1.44	1.44	1.44	1.44

¹ For trial1, chromic oxide was added at dose of 30 g/kg as feed basis diet.

² SC= live saccharomyces cerevisiae at dose of 3g /lamb/day (LSC; ActiveFlora, ICC, São Paulo, Brazil).

³ MOS= mannan oligosaccharide, b-glucans and yeast metabolites at dose of 3g /lamb/day (MOS, β-Glucans and yeast metabolites; RumenYeast, ICC, São Paulo, Brazil).

⁴ SC+MOS= supplemented with 1.5 g/lamb/day LSC plus 1.5 g/lamb/day MOS.

⁵ Mineral premix contained: Crude protein 50%, Calcium, 28%; Phosphorous, 0.55%; Magnesium, 0.58%; Potassium, 0.65%; NaCl, 15%; vitamin A, 1,100 IU/kg; vitamin E, 11 UI/kg.

⁶ Dietary composition was determined by analyzing subsamples collected and composited throughout the experiment. Accuracy was ensured by adequate replication with acceptance of mean values that were within 5% of each other.

⁷ Based on tabular net energy (NE) values for individual feed ingredients (NRC, 2007).

Table 6. Oligonucleotides used to RT-PCR amplification and quantitation of HAB microorganism in ruminal fluid samples from ovine/bovine under probiotic/prebiotic treatment.

Bacteria	Primer Forward	Primer Reverse	Gene	Amplicon
<i>C. sticklandii</i> GenBank NR_102880.1	CCTATCACTGGGAT AACACAC	CACCAACAAGCTAAT CAGAC	16S ribosomal RNA Position 12-244	122 bp
<i>C. aminophilum</i> strain F GenBank: NR_118651.1	GTAACACGTGGGTA ACCTGC	CGCCAACTAGCTAAT CAGAC	16S ribosomal RNA Position: 128 - 271	144 bp

Table 7. Effect of treatments on total tract digestion.

Item	SC, g/lamb/d ¹		P Value	MOS, g/lamb/d ¹		P Value	SEM
	0	3		0	3		
Intake, g/d							
Dry matter	1,140	1,140		1,140	1,140		--
Organic matter	1,074	1,074		1,074	1,074		--
Neutral detergent fiber	173	173		173	173		--
Starch	717	717		717	717		--
Nitrogen	24.5	24.5		24.5	24.5		--
Gross energy, Mcal/d	4.76	4.76		4.76	4.76		--
Fecal excretion, g/d							
Dry matter	235 ^a	221 ^b	0.04	235 ^a	222 ^b	0.04	7.22
Organic matter	197 ^a	184 ^b	0.03	195	186	0.07	6.21
Neutral detergent fiber	94.9	91.4	0.22	97.6 ^a	88.6 ^b	0.01	3.57
Starch	6.5 ^a	3.73 ^b	0.01	5.84	4.38	0.1	1.06
Nitrogen	6.6 ^a	6.18 ^b	0.02	6.59 ^a	6.19 ^b	0.03	0.19
Gross energy, Mcal/d	0.96 ^a	0.86 ^b	<0.01	0.947 ^a	0.875 ^b	0.02	0.032
Total tract digestion, %							
Dry matter	79.32	80.57	0.06	79.37	80.52	0.07	0.74
Organic matter	81.63	82.82	0.06	81.79	82.62	0.13	0.72
Neutral detergent fiber	45 ^b	47.04 ^a	0.03	43.42 ^b	48.63 ^a	<0.01	0.98
Starch	99.09 ^b	99.48 ^a	<0.01	99.19	99.39	0.1	0.14
Nitrogen	73.01 ^b	74.7 ^a	<0.01	73.11 ^a	74.67 ^a	0.02	0.66
Digestible energy, %	79.84 ^b	81.79 ^a	0.03	80.07	81.56	0.07	0.93
Digestible energy, Mcal/kg	3.329 ^b	3.411 ^a	0.02	3.338	3.401	0.06	0.038

^{a,b,c} Means a row with different superscripts differ (P < 0.05).

¹ SC= live *saccharomyces cerevisiae* at dose of 3g /lamb/day (LSC; ActiveFlora, ICC, São Paulo, Brazil); MOS= mannan oligosaccharide, b-glucans and yeast metabolites at dose of 3g /lamb/day (MOS, β-Glucans and yeast metabolites; RumenYeast, ICC, São Paulo, Brazil).

Table 8. Effect of treatments on ruminal, pH, AGV, methane production¹, and N-NH₃²

Item	SC, g/lamb/d ³		P Value	MOS, g/Lamb/d ³		P Value	SEM
	0	3		0	3		
Ruminal pH	5.77	5.81	0.77	5.64	5.94	0.04	0.16
Ruminal N-NH ₃ , mg/dL							
2-h post-feeding	4.78	4.95	0.57	5.66 ^a	4.07 ^b	<0.01	0.39
4-h post-feeding	2.84	2.89	0.88	3.92 ^a	1.81 ^b	<0.01	0.46
Total VFA, mM	102.2 ^b	112.1 ^a	<0.01	103.7 ^b	110.6 ^a	0.02	3.03
Ruminal VFA, mol/100 mol							
Acetate	53.74	54.23	0.74	52.38	55.59	0.07	2.03
Propionate	34.69	36.18	0.42	36.12	34.75	0.45	2.42
Butyrate	11.56 ^a	9.47 ^b	0.03	11.5 ^a	9.53 ^b	0.04	1.07
Acetate/propionate	1.56	1.52	0.71	1.47	1.61	0.27	0.162
Methane production ⁴	0.43	0.42	0.6	0.41	0.44	0.3	0.032

¹Ruminal pH and VFA measured at 4 h post-feeding (morning meal).

²Measured at 2 and 4 h post-feeding (morning meal).

³ SC= live *saccharomyces cerevisiae* at dose of 3g /lamb/day (LSC; ActiveFlora, ICC, São Paulo, Brazil); MOS= mannan oligosaccharide, b-glucans and yeast metabolites at dose of 3g /lamb/day (MOS, β-Glucans and yeast metabolites; RumenYeast, ICC, São Paulo, Brazil).

⁴Methane (mol/mol glucose equivalent fermented) estimated based on fermentation balance (Wolin,1960).

Table 9. Quantification of ruminal bacteria by real-time PCR (log₁₀ copies/mL or per g) in lambs fed a control diet or control diet supplemented with prebiotic, probiotic or its combination.

Item	SC, g/lamb/d ¹		P Value	MOS, g/Lamb/d ¹		P Value	SEM
	0	3		0	3		
Ruminal bacteria (log ₁₀ copies/mL)							
<i>Clostridium aminophilum</i>	8.925 ^a	8.804 ^b	0.02	9.002 ^a	8.727 ^b	<0.01	0.05
<i>Clostridium sticklandii</i>	5.939	5.876	0.67	6.068	5.747	0.06	0.19

¹ SC= live *saccharomyces cerevisiae* at dose of 3g /lamb/day (LSC; ActiveFlora, ICC, São Paulo, Brazil); MOS= mannan oligosaccharide, b-glucans and yeast metabolites at dose of 3g /lamb/day (MOS, β-Glucans and yeast metabolites; RumenYeast, ICC, São Paulo, Brazil).