

EVALUACIÓN DEL LICOR RUMINAL EN VACUNOS LECHEROS ALIMENTADOS CON DESECHOS DE CERVECERÍA

Evaluation of ruminal contents in dairy cattle feed on diets with brewery scraps

Geovanny Finol Parra*
Cruz Arraga de Alvarado*
Gibson Fernández**
Luis Añez**

* Unidad de Investigaciones Clínicas
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad del Zulia
Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela

** Estudiantes miembros del Centro de Investigación Estudiantil
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad del Zulia
Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela

RESUMEN

Se realizó la evaluación del licor ruminal de 10 bovinos alimentados con pasto, yacija y melaza y luego de adicionar a su alimentación desechos de cervecería *ad libitum*. El muestreo se realizó tres veces por semana, por una semana con la primera alimentación que era la tradicional de la finca y por tres semanas luego de la adición de los desechos de cervecería. Las muestras de licor ruminal fueron obtenidas con una sonda orogástrica y analizadas a nivel de la finca. Se determinó pH, color, olor, consistencia, velocidad de sedimentación, tipo y número de protozoarios, proporción de flagelados y reacción de las bacterias a la coloración de GRAM. Al comparar los resultados, se observaron diferencias significativas en la velocidad de sedimentación, tipo y número de protozoarios. A la tercera semana de la alimentación con desechos de cervecería se evidenció un incremento no significativo del pH a la vez que se observó reducción del número de entodiniomorfos, lo cual podría indicar muerte de protozoarios por acción del pH.

Palabras claves: Licor ruminal, bovinos, desechos de cervecería.

ABSTRACT

The ruminal content evaluation of ten (10) bovine, feed, with graze, chicken manure, molasses and additional brewery scraps *ad libitum* was performed. The analisis was done three times per week when they were feed with the normal food of the farm, and three times per week for three weeks after the addition of brewery scraps in the diet.

The ruminal content was obtained using a orogastric catheter and proccesed at field level. The ruminal content characteristics like pH, color, odor, consistency, sedimentation velocity, methylen blue reduction, in vivo protozoaric activity, type and number of protozoa, flagellates proportion and bacteria predominance (using Gram stain) were determinated. Significant differences of the ruminal content were found in sedimentation velocity, type and number of protozoan when compared the results of both types of diets.

At the third week, the bovines feeding with additional brewery scraps showed an slight but not significant variation of the pH. At that time there was also a significant decrease in the quantity of the entodiniomorphs which could represent protozoan death due to the pH.

Key words: Ruminal content, bovines, brewery scraps.

INTRODUCCIÓN

Se conoce que los rumiantes (bovinos), mamíferos del orden Artiodactila, obtienen sus nutrientes fundamentalmente

de la degradación de los materiales vegetales sometidos a la acción de los microorganismos, contenidos en los pre-estómagos.

Se encuentran extensas revisiones bibliográficas que cubren el campo de la caracterización, identificación y metabolismo de los microorganismos ruminales y su inherencia en el rumiante [3,5,6,7,8,9,11,12,16,19,20,22]. En la mayoría de las investigaciones realizadas para caracterizar e identificar los protozoarios del rumen, se ha utilizado la técnica de la fistulización a través de una intervención quirúrgica para obtener el licor ruminal [14,15,20,21].

La técnica de la fistulización ha sido usada en diversas investigaciones pero requiere de ciertas actitudes y acciones poco prácticas para ser llevadas a cabo por la mayoría de los veterinarios.

Se ha planteado una forma más fácil de obtener el licor ruminal que es a través del uso de la sonda orogástrica.

Algunas investigaciones se han reportado usando esta técnica. Entre ellas se encuentra un experimento comparativo con la técnica de fistulización realizado por Poulsen y col [17] en el año de 1988 y algunos trabajos sobre análisis diagnóstico del fluido ruminal como los reportados por Alonso, Ana [3] y Garry, F. [8]. Los estudios del licor ruminal involucran pruebas específicas en el líquido, como determinación del pH, características organolépticas tales como olor, color y consistencia, velocidad de sedimentación, actividad protozoárica, conteo y tipos de protozoarios [1,2,3,8,9].

Al evaluar el licor ruminal es imprescindible un estudio microscópico, el cual permite visualizar a los protozoarios y las bacterias.

Los protozoarios observados en el rumen son principalmente especies ciliadas [7]; por lo menos se han descrito 40 especies de protozoarios. Los protozoarios flagelados, anteriormente clasificados así, en la actualidad se ha descrito que corresponden a formas móviles de hongos (tricomonadales) [10].

Para los propósitos de la evaluación clínica sólo 2 grupos de protozoarios son considerados: Entodiniomorfos (oligotricos) y los Holotricos [7,8].

Se conoce que el mayor efecto de los protozoarios es cambiar el tamaño de las proteínas y la energía de los nutrientes de forma que sean más fácilmente disponibles para su absorción [13,21].

Algunos autores han demostrado que son capaces de digerir hasta un 7% de la celulosa total de los pastos [4].

Es práctica común en los ganaderos de la región zuliana alimentar bovinos con pasto y utilizar concentrados, fuentes nitrogenadas como la yacija o la gallinaza y desechos de cervecera, en forma aislada y combinados como suplementos alimenticios.

También es común el introducir estas raciones de un día para otro sin que exista un período de acostumbramiento a la nueva dieta; sobre todo esta práctica es realizada con las vacas que van a ordeño y especialmente en la época de verano donde existe deficiencia de pastizales.

En casos de cambios repentinos a dietas de alta calidad alimenticia como los concentrados, el desbalance de las especies microbianas puede permitir que organismos oportunistas facultativos, traten de dominar la reducción del pH ruminal conduciendo a un trastorno del rumen. El ajuste de pH por lo general requiere una semana [21].

El efecto que producen diferentes tipos de granos y concentrados sobre el licor ruminal, ha sido estudiado por varios autores [1,2,3,7,8,19,23,24,25], sin embargo no existen datos disponibles de la relación entre protozoarios ciliados del rumen y las dietas tradicionales utilizadas en el trópico [20].

Con esta investigación nos propusimos:

- Determinar las características del licor ruminal bajo la alimentación convencional de la finca.
- Determinar el efecto de la administración de desechos de cervecera sobre las características del licor ruminal.
- Comparar las características del licor ruminal bajo alimentación convencional de la finca, con la administración de desechos de cervecera.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 10 bovinos machos, mestizos de Holstein y Pardo Suizo con criollo y Pardo Suizo con Cebú, ubicados en el kilómetro 66 de la carretera Machiques-Colón del Estado Zulia, en una zona de bosque seco tropical. La alimentación de los animales durante la primera semana consistía de pasto fresco a potrero *ad libitum* al igual que yacija, sal común, melaza y agua.

Durante esa semana se analizaron 3 muestras de licor ruminal. A partir de la segunda semana los animales fueron ubicados en un potrero más pequeño, donde además de la alimentación citada se les administraba desechos de cervecera. Se denomina desechos de cervecera al grano de cebada luego que es tratado para obtener la cerveza; es un material sólido, que presenta la siguiente composición química:

Materia Seca 90%, Proteína Cruda 26%, Grasa 6%, Fibra Cruda 15%, Cenizas 4% y Extrato libre de Nitrógeno 39%.

La energía metabolizable por KCal por Kg de Materia Seca (EM/KCa/Kg MS) es de 2400.

El contenido de Aminoácidos en porcentaje es el siguiente: fenilalanina + tirosina 2.25%, valina 1.46%, licina 0.87%, metionina 0,40%, arginina 1.00%, glicina 1.01%

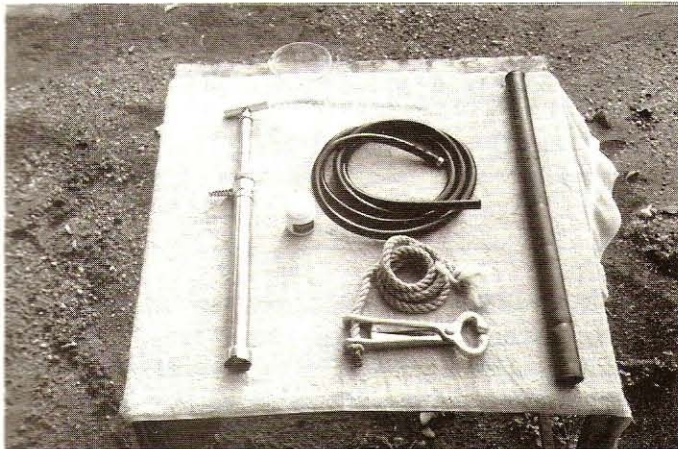


FIGURA 1. MATERIALES Y EQUIPOS USADOS PARA LA TOMA DE MUESTRAS: NARIGÓN, ESPÉCULO DE FRICK, LUBRICANTE, SONDA OROGÁSTRICA, BOMBA IMPELENTE-EXPELENTE, VASO DE PRECIPITADO.

También contiene: calcio 0.30%, fosfatos totales 0.50%, fosfatos disponibles 0.40%. El suministro de los desechos de cervecería no fue gradual, sino en forma brusca, a razón de aproximadamente 3 kg/animal.

Estas condiciones de alimentación se mantuvieron por un lapso de tres semanas hasta la finalización del estudio, de igual manera el muestreo fue realizado tres veces por semana con intervalo de un día. La sujeción de los animales se realizó con el uso de un brete, la cabeza se colocó en posición horizontal a la vez que se obligaba a abrir la boca con la ayuda del narigón, se introdujo el espéculo de Frick, se midió por fuera del animal la longitud aproximada de cuanto se introduciría la sonda orogástrica; luego de lubricada la misma, se introdujo hasta la faringe, se esperó que el animal deglutiera para pasar al esófago y se deslizó suavemente hasta llegar al rumen. Una vez en el rumen la sonda se conectó a una bomba impelente expelente y se realizó succión, desechando los primeros chorros, evitando así contaminación con saliva; fueron colectados 50 a 250 cc en un vaso de precipitado de 500 cc para su posterior análisis, FIGS. 1 y 2.

Para realizar los análisis de laboratorio de inmediato, todo el equipo necesario fue trasladado a la hacienda, para así obtener resultados más exactos.

La determinación de pH se realizó inmediato a la colección utilizando para ello un pH metro portátil. El olor se determinó mediante el acercado del licor al olfato agitando suavemente. El color se determinó mediante la observación. La consistencia se determinó visualmente, al mover la muestra o transpasarla a otro vaso para poder observar su densidad. Para la prueba de sedimentación se homogeneizó la muestra, se colocó en un cilindro graduado hasta la marca de 10cc, y se hicieron tres lecturas del material sedimentado a los 10, 20 y 30 minutos. Para la prueba de reducción de Azul de Metileno se homogeneizó la muestra, se tomaron 9.5 cc y se pasaron a

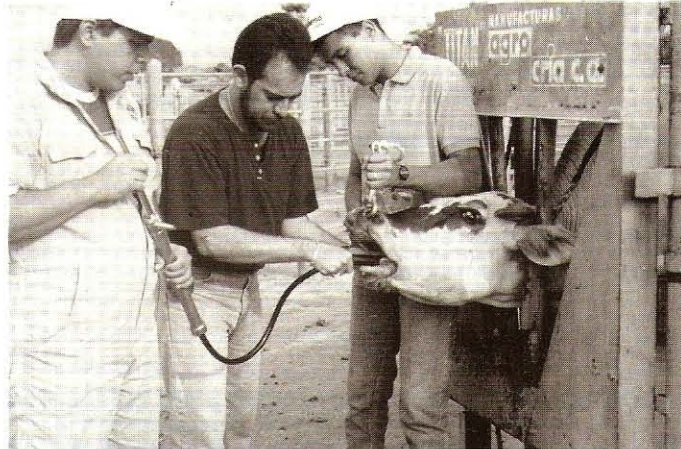


FIGURA 2: OBTENCIÓN DE LICOR RUMINAL USANDO SONDA OROGÁSTRICA.

un tubo de ensayo que contenía 0.5 cc de azul de metileno 0.03%; se mezcló y luego se observó, tomando el tiempo en el cual ocurría el cambio de color del licor ruminal a su color original, usando un tubo con licor sin azul de metileno como control de color. La actividad protozoárica en vivo se determinó colocando una gota de licor previo a su homogenización, sobre un porta objeto, y fue cubierto con una laminilla para la observación con objetivo de 10X. Se evaluó la actividad de los protozoarios observando toda la extensión de la lámina para con ello obtener una idea general de la motilidad, la cual fue clasificada según la observación en: muy activa, moderadamente activa, poco activa, inactiva. Se evaluaron los flagelos clasificándolos como: muy numerosos, numerosos, escasos o ausentes.

Se realizó el conteo de protozoarios tomando una gota de licor ruminal previamente homogeneizado, mezclándolo con una gota de lugol sobre una lámina porta objeto para inactivarlos, se llevó a microscopio con objetivo 10X para observar su morfología y tipo. Luego se procedió a contar diez campos visuales distintos y se obtuvo la media por campo de cada tipo de protozoarios.

Por último se homogeneizó la muestra, se tomó una gota, se hizo un extendido, se colpreó con tinción de Gram, se observó el microscopio con objetivo de inmersión (100X) para determinar la proporción de bacterias Gram positivas y Gram negativas.

Se obtuvieron medias, desviaciones standard, valores mínimos y máximos, proporción del número de casos, porcentajes y se determinaron niveles de significancia para establecer las variaciones del licor ruminal con el cambio de alimentación.

RESULTADOS

- No se observaron cambios en el pH cuando se sustituyó la alimentación convencional por la de desechos de cervecería, TABLA I.

TABLA I

INDICADORES DE pH DEL LICOR RUMINAL DE BOVINOS, SEGÚN EL TIPO DE ALIMENTO

Tipo de alimento	No.	\bar{X}	DS	Min.	Máx.
Convencional	30	7.02 ^A	0.33	6.3	7.7
Desechos de cervecería	90	7.18 ^A	0.34	6.0	7.6

Letras iguales indican que no hubo diferencias significativas

TABLA II

COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE SEDIMENTACIÓN DEL LICOR RUMINAL DE BOVINOS SEGÚN EL TIPO DE ALIMENTACIÓN

Tipo de alimentación	\bar{X}	DS	n
Convencional	4.42 ^A	0.48	9
Desechos de cervecería (1ra. semana)	4.28 ^A	0.44	9
Desechos de cervecería (2da. semana)	4.37 ^A	0.29	9
Desechos de cervecería (3ra. semana)	4.78 ^B	0.21	9

Las letras diferentes indican diferencias significativas expresadas en centímetros cúbicos

TABLA III

INDICADORES DE LA REDUCCIÓN DEL AZUL DE METILENO DEL LICOR RUMINAL DE BOVINOS ALIMENTADOS CONVENCIONALMENTE Y CON DESECHOS DE CERVECERÍA

Reducción	\bar{X}	Máx.	Min.
Convencional	2.9 ^A	11	1.5
Desechos de cervecería	3.1 ^A	8	1.0

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas. La media está expresada en minutos

TABLA IV

ACTIVIDAD PROTOZOÁRICA EN VIVO DEL LICOR RUMINAL DE BOVINOS ALIMENTADOS EN FORMA CONVENCIONAL Y CON DESECHOS DE CERVECERÍA SEGÚN NÚMERO Y PORCENTAJE

Actividad protozoárica	Convencional		D. de Cervecería	
	No.	(%)	No.	(%)
Muy activa	23	76.6	69	76.6
Moderadamente activa	7	23.4	21	23.4
Poco activa	0	0	0	0
Inactiva	0	0	0	0
Total	30	100	90	100

- El olor del licor ruminal en ambos sistemas de alimentación fue en un 100% *sui generis* para el tipo de alimentación recibida. En el caso de los alimentados con desechos de cervecería el olor del licor era similar al del alimento.
- El color del licor ruminal de Bovinos alimentados en forma convencional fue en un 10% verde oliva y en un 90% verde oscuro. En el alimentado con desechos de cervecería el licor en un 43.3% de las muestras fue verde oliva y en un 56.7% fue verde oscuro. El aumento del número de muestras verde oliva se observó a partir de la segunda semana de alimentar con desechos de cervecería.
- Al comparar los niveles de sedimentación en cilindro graduado del licor ruminal de bovinos alimentados en forma convencional con los alimentados con desechos de cervecería, se observó que no existían diferencias significativas durante las dos primeras semanas, pero si existió variación a la tercera semana, donde la sedimentación fue más rápida, TABLA II.
- La reducción del azul de metileno en animales alimentados convencionalmente se produjo en un tiempo menor (\bar{X} de 2.9 minutos) que los que recibieron desechos de cervecería (\bar{X} de 3.1 minutos), sin existir diferencia significativa en los valores, TABLA III.
- Al evaluar la actividad protozoárica en vivo del licor ruminal de bovinos alimentados en forma convencional, en el 76.6% de los casos fue muy activa, en el 23.4% moderadamente activa. No se encontraron protozoarios poco activos e inactivos, TABLA IV. Los resultados fueron similares en los alimentados con desechos de cervecería. Fue en la tercera semana cuando la actividad protozoárica se observó con la máxima actividad.
- La cantidad de flagelados obtenidos del licor ruminal de bovinos recibiendo el alimento convencional fue en el 20% muy numerosos (Mayor 20/campo 40X), en el 50% numerosos (10-20/campo 40X), en el 30% escasos (menor de 10/campo 40X). No se encontraron muestras con ausencia de flagelados. Los porcentajes fueron similares con desechos de cervecería, TABLA V.
- Al comparar los tipos de protozoarios en los dos grupos estudiados de alimentación en bovinos, se observaron ambos tipos de protozoarios ciliados, FIGS. 3 y 4. Se obtuvo diferencias significativas en el número de entodinio-

TABLA V

PROPORCIÓN DE FLAGELADOS EN EL LICOR RUMINAL DE BOVINOS ALIMENTADOS EN FORMA CONVENCIONAL Y CON DESECHOS DE CERVECERÍA, SEGÚN NÚMERO Y PORCENTAJE

Flagelados	No.	(%)	No.	(%)
Muy numerosas	6	20	15	16.7
Numerosas	15	50	44	48.9
Escasas	9	30	31	34.4
Ausentes	0	0	0	0
Total	30	100	90	100

Muy numerosos: Mayor de 20/campo 40X. Numerosos: 10-20/campo 40X. Escasos: Menor de 10/campo 40X

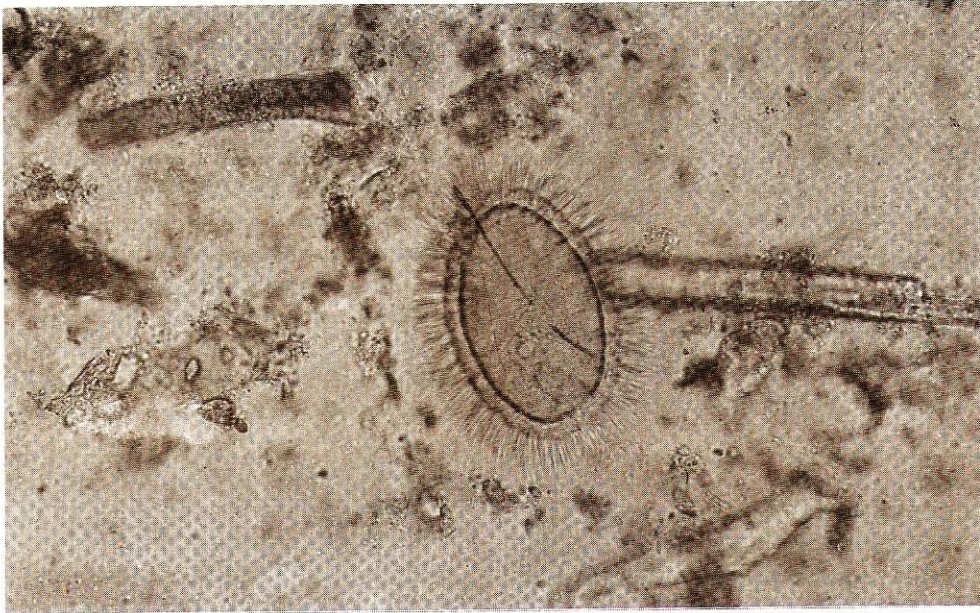


FIGURA 3. UN HOLOTRICO ES OBSERVADO EN EL CENTRO DEL CAMPO. AUMENTO 600X.



FIGURA 4. UN ENTODINIOMORFO DE GRAN TAMAÑO ES OBSERVADO EN LA PORCIÓN CENTRAL SUPERIOR; OTROS PEQUEÑOS SON INDICADOS CON FLECHAS.

TABLA VI

**INDICADORES DEL TIPO Y NÚMERO DE PROTOZOARIOS EN EL LICOR RUMINAL DE BOVINOS
SEGÚN EL TIPO DE ALIMENTO**

Tipo de alimento	Tipo de protozoario	No.	\bar{X}	DS	Min.	Máx.
Convencional	Holotricos	30	30.17 ^A	1.90	13.6	58.0
-	Entodiniomorfos	30	9.67 ^A	4.70	2.9	20.0
Desechos de cervecera	Holotricos	90	28.90 ^A	7.61	13.7	49.9
-	Entodiniomorfos	90	4.63 ^B	2.44	1.1	12.6

Las letras diferentes indican diferencias significativas. El número de animales fue de 10. El de muestreos aparece en el contenido de la tabla.

morfos, no así en los holotricos. Los entodiniomorfos disminuyeron durante la alimentación con desechos de cervecera y se observó que los que permanecían en su mayoría eran de gran tamaño, TABLA VI.

- En todas las muestras del licor ruminal se observaron bacterias Gram positivas y Gram negativas, predominando en un 100% las Gram negativas, sin distinción del sistema de alimentación.

DISCUSIÓN

Cada día se hace más importante el disponer de técnicas diagnósticas sencillas que nos permitan evaluar cambios en fluidos u órganos que no podemos examinar a simple vista para determinar estados fisiológicos o patológicos.

El examen del licor ruminal podría en muchas ocasiones ser fuente importante de información para la solución de un problema clínico. Definitivamente la técnica de sondaje orogástrico brinda al clínico una gran ayuda diagnóstica y debe ser usada con más frecuencia en nuestro medio. En el estudio comparativo del licor ruminal de bovinos alimentados en forma convencional y luego adicionando desechos de cervecera no se observaron cambios significativos en los resultados. Los valores encontrados están dentro de los parámetros reportados en la literatura [1,2,3,7,8,19,23,24,25]. El olor del licor ruminal de los animales estudiados fue *sui generis*, referido a la alimentación recibida, tal como lo cita Radostis [18].

Está reportado que el color del licor ruminal varía con la alimentación suministrada, [3,8,18] en el presente estudio esto fue también observado, ya que al introducir la alimentación con desechos de cervecera el color fue variando de verde oscuro a verde oliva, haciéndose más manifiesto el cambio en la última semana de muestreo.

Está determinado que la velocidad de sedimentación del licor ruminal es dependiente del número de protozoarios y microorganismos presentes en el mismo [1,18,19], considerando que también debe estar influenciado por la ingestión reciente

de líquido y el tipo de alimentación. En el presente estudio se observó que en la tercera semana de alimentación con desechos de cervecera, se obtuvieron velocidades de sedimentación más rápidas que en otros períodos, el cambio fue significativo; este cambio puede ser relacionado con la disminución del número de protozoarios presentes en las muestras, lo cual está de acuerdo con los autores citados. También la causa podría ser la consistencia del desecho de cervecera. La reducción del azul de metileno se prolongó en animales que recibían desechos de cervecera, más que en los alimentados convencionalmente, pero ambos resultados se enmarcan dentro de valores normales de reducción como lo cita Garry [8]. Otra de las causas del aumento en el tiempo de reducción podría ser la disminución en el número de protozoarios en el licor ruminal de animales alimentados con desechos de cervecera. Existen reportes contradictorios sobre la importancia de los protozoarios en la alimentación de los rumiantes. Algunos piensan que se pueden usar sólo como indicadores de disturbios alimenticios [18], otros han demostrado que son necesarios para la degradación y asimilación de proteínas y carbohidratos [3,4,7,13,20]. Consideramos que al evaluar el licor ruminal es importante reconocer si existe una adecuada actividad protozoaria, que nos permita constatar que la mayoría de los protozoarios están vivos, esto evitaría errores en la interpretación. En el estudio se observó que en ambas alimentaciones los protozoarios estaban activos, sin embargo en la tercera semana de alimentación con desechos de cervecera se observó un incremento en la actividad de los mismos.

Posiblemente esto se debiera a un sustrato más rico para su alimentación y que permanece mayor tiempo en el rumen, como lo cita Van Soest [21]. Los flagelados se mantuvieron presentes en el licor ruminal de los bovinos estudiados, sin que existieran diferencias significativas en la apreciación de sus concentraciones cuando se realizó el cambio en la alimentación. Se ha reportado que existen diferencias entre los protozoarios a los cambios de pH; los holotricos son más resistentes que los entodiniomorfos [3,7]. En el presente estudio no se observó una diferencia significativa en el pH, cuando los animales fueron alimentados con desechos de cervecera, sin

embargo existió una cierta diferencia, obteniéndose (\bar{X} 7.02) en alimentados convencionalmente y (\bar{X} 7.18) en alimentados con desechos de cervecera. Es posible que este ligero cambio haya podido afectar a los entodiniomorfos, ya que el conteo de los mismos luego de la administración de los desechos de cervecera, disminuyó significativamente, TABLA VI. Según Church [7] los entodiniomorfos utilizan más los almidones y fibras de plantas para su alimentación, que carbohidratos solubles; pudiera ser que los cambios en el número de entodiniomorfos se deben a esta condición. Se requeriría mayor número de observaciones al respecto.

AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad del Zulia (CONDES) por el financiamiento que permitió el desarrollo de esta investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Alonso, A. Patología de la Microflora Ruminal. Ciencias Veterinarias. Maracaibo, IV (4): 161-177. 1974.
- [2] Alonso, A. Patología de la microfauna ruminal en la subalimentación del bovino. Trabajo de ascenso. Universidad del Zulia, 1975.
- [3] Alonso, A. Diagnostic analysis of rumen fluid. Veterinary Clinics of North America. Large animal practice. 1 (2): 363-376. 1979.
- [4] Amos, H. and Akin, D. Rumen protozoal degradation of structurally intrac forage tissues. Applied and Environmental Microbiology. 36 (3): 513-522. 1978.
- [5] Barry, A. Revista International Science. 3:301-309, 1879. Citado en Hungate, 1966.
- [6] Bryant, M.D. Symposium on Microbial Digestion in Ruminants: Identification of groups of anaerobic bacteria active in the rumen. J. Dairy Sci. 51: 801-813. 1968.
- [7] Church, D.C. Fisiología digestiva y nutrición de los rumiantes. Vol. I. pp. 183-223. 1ra. ed. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 1974.
- [8] Garry, F. Diagnosing and treating indigestion caused by fermentative disorder. Symposium on bovine digestive diseases. Veterinary Medicine. pp. 660-670. 1990.
- [9] Griffiths, T.W. The evaluation of an improved artificial rumen technique for the study of rumen fermentation. J. Agric. Sci. 69: 355-366. 1967.
- [10] Grudsky, R. y Arias, J.L. Aspectos generales de la microbiología del rumen. Monografías Médico Veterinarias 5 (2): 63-89. 1983.
- [11] Harrison, D.G. and McAllan, A.B. Factors affecting microbial growth yields in the reticulo rumen. In Ruckebusch, Y. and Thivent, P. Digestive physiology and metabolism in ruminants. pp. 205-226. 1980.
- [12] Hungate, R.E. The rumen and its microbes. Chapter III. Academic Press Inc. New York, USA. 1966.
- [13] Klopfenstein, T.J.; Purser, B.D. and Tyznik, W.Y. Effects of defaunation on feed digestibility, rumen metabolism and blood metabolism. J. Animal Science 25: 765-773.
- [14] Lyon, T.P. Biotechnology in the feed industry. Alltech technical publications. Kentucky, USA. 1987.
- [15] Leng, R.A.; Deblow, D. and Waghorn, G. Dynamics of large ciliate protozoa in the rumen of cattle feed on diets of freshly cut grass. Br. J. Nutr. 56:455-462. 1986.
- [16] Nichols, R.E., and Penn, K.E. Simple methods for the detection of unfavorable changes in ruminal ingesta. J.A.V.M.A. Sept. 58: 275-277. 1958.
- [17] Poulsen, J.S.D.; Ozkan, K. and Amderson, J.O. Clinical chemical comparative examination of a maso ruminal samples collected by means of a naso ruminal sampler. Acta Veterinaria Scandinavica 29 (1): 129-133. 1988.
- [18] Radostits, O.M. Diseases of the ruminant stomachs and intestinos of cattle. Bovine practitioners 13: 63-97. 1981.
- [19] Rosemberg, G. Exploración clínica del ganado vacuno. Editorial Labor. Barcelona, España. pp. 150-154. 1966.
- [20] Ryle, M. and Orskov, E.R. Rumen ciliates and tropical feeds. World Animal Review 64 (USA). pp. 21-30. 1987.
- [21] Van Soest, P.J. Nutritional Ecology of the Ruminant. O. and B. Books Inc. Part IV. Gastrointestinal fermentations. Chapter 10. Rumen microbes. pp. 152-177. 1982.
- [22] Warner, A.C.I. Enumeration of rumen microorganisms. Y. Gen. Microbial 28: 119-123. 1962.
- [23] Wheeler, W. Gastrointestinal tract pH Environment and the influence of buffering materials on the performance of ruminants. Journal of Animal Science. 51 (1):224-233. 1980.
- [24] Yang, C.M.J. and Varga, G.A. Effect of sampling site on protozoa and fermentation end products in the rumen of dairy cows. Journal of Dairy Sci. p. 1492-1498. 1989.
- [25] Yohnson, R.R. Techniques and procedures for *in vitro* and *in vivo* rumen studies. J. Animal Sci. 25:855-875. 1966.