

UMSATZ VON OCHRATOXIN A IN PANSENFLÜBIGKEIT *IN VITRO*

Haydar Özpinar, Tanay Bilal, Ismail Abaş, Can Kutay

Institut für Tierernährung und ernährungsbedingte Krankheiten, Veterinärmedizinische Fakultät, Istanbul Universität, Turkey, E-mail: hozpinar@istanbul.edu.tr

Zusammenfassung: In dieser Studie wurde die Bedeutung der unterschiedlichen Mikroorganismen des Pansens und der Effekt von Stärke-, Cellulose- und Monensinzusatz auf den Ochratoxin A (OTA) Abbau im Pansensaft untersucht. Die Pansensaftflora wurde durch fraktionierte Zentrifugation in Protozoen und Bakterien getrennt, bzw. ungetrennter Pansensaft mit OTA und einer Nährlösung bis zu 48 Stunden inkubiert und dabei die Abbaugeschwindigkeit von OTA *in vitro* gemessen. Gleichzeitig wurde die Gasbildung nach dem "Hohenheimer Gas Test" gemessen. Ochratoxin A wurde durch eine HPLC-Methode analysiert. Wiedererfindungsraten wurden an OTA 70 % und an Ochratoxin α 53 % gefunden. Die Halbwertszeit von OTA betrug unter Kontrollbedingungen 3,7 Stunden. Der Zusatz von Stärke senkte diese Zeit signifikant auf 1,91 Stunden ab, während Cellulose die Halbwertszeit auf 4,5 erhöhte. Monensin erhöhte die Halbwertszeit um das 5-fache auf 20,1 Stunden. Durch die Trennung der Flora in Protozoen und Bakterien konnte gezeigt werden, dass überwiegend die Protozoen für den Abbau von OTA verantwortlich sind. Somit scheint ein Zusatz von Stärke die Protozoenzahl zu erhöhen und somit auch die Abbaugeschwindigkeit von OTA.

Schlüsselwort: Ochratoxin A, Abbau, *in vitro*, Pansensaft

DEGRADATION OF OCHRATOXIN A IN RUMEN FLUID *IN VITRO*

Summary: In this study, the effect of some nutrients and rumen mikroorganism on Ochratoxin A degradation were investigated. For this purpose, degradation speed time of OTA in rumen was measured by adding starch, cellulose and monensin under *in vitro* condition. Furthermore the protozoon and the bacteria were by fractionated centrifugation of rumen fluid to detect the mikroorganism which decreased Ochratoxin A degradation. These studies were performed under *in vitro* conditions by using the "Hohenheimer Gas Test". Incubation was carried out over period of 48 h by incubating pure Ochratoxin A with a mixture of ruminal fluid and a culture medium. Ochratoxin A and Ochratoxin α was determined by HPLC-flourescence deduction. The recovery rates for Ochratoxin A and Ochratoxin α were 70 % and 53% respectively.

Half-life of Ochratoxin A is 3.7 hours under normal conditions. The ruminal degradation rate of Ochratoxin A was decreased to 1.9 hours by adding starch and was increased to 4.5 hours by adding cellulose. By adding monensin the half-time of Ochratoxin A was 20.1 hours. We determined that OTA is degraded by protozoon and mikroorganism imported role. This study indicate that, adding starch increase protozoon number and gas production. In result of that OTA degrade to Ochratoxin α .

Key words: Ochratoxin A, degradation, rumen fluid, *in vitro*

Einleitung

Die Ochratoxine stellen Metaboliten des Sekundärstoffwechsels von Lagerpilzen verschiedener Aspergillus- und Penicilliumstämme dar. Ochratoxine sind Isocoumarin-Derivate, die durch eine Peptidbindung mit L- β -Phenylalanin verknüpft sind (1).

Ochratoxin A wurde in einer Vielzahl von natürlich kontaminierten Futtermitteln nachgewiesen, meist in Ländern temperierten oder kontinentalen Klimas. Gerste, Hafer, Weizen und Mischfuttermittel am häufigsten belastet waren. Die durchschnittliche Ochratoxin A-Konzentration betrug 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, wobei die Werte zwischen 0.1 und 206 $\mu\text{g}/\text{kg}$ streuten (2,3). Im tierischen

Stoffwechsel erfolgt häufig die Spaltung der Peptidbindung der Ochratoxin-Moleküle. Im Fall von Ochratoxin A führt dies zur Bildung von L- β -Phenylalanin und Ochratoxin α .

Die toxische Wirkung von Ochratoxin A beruht auf der kompetitiven Hemmung des für die Proteinsynthese essentiellen Enzyms Phenylalanin-t-RNA-Synthetase (Creppy et al., 1983a).

Neben einer ausgeprägten nephrotoxischen Wirkung konnten auch hepatotoxische, teratogene, immunsuppressive, genotoxische und karzinogene Eigenschaften von Ochratoxin A gefunden werden (4,5,6). Trotz einer hohen Toxizität von Ochratoxin A sind die Spaltprodukte Ochratoxin α und β nicht toxisch (7,8).

Die von Wiederkäuern nach oraler Aufnahme tolerierten hohen Toxinmengen weisen auf einen natürlichen Abwehrmechanismus hin, dessen Ursache in einer mikrobiellen Metabolisierung im Pansen zu suchen ist. Aufgrund der natürlich vorkommenden Gehalte von Ochratoxin A in Futtermitteln, sind beim Wiederkäuer in erster Linie chronische Effekte zu erwarten (9).

Das Vorhandensein einer funktionstüchtigen Pansenflora ist die Voraussetzung für eine gewisse Toleranz gegenüber Ochratoxin A. Müller (9), konnte zeigen, dass alle Versuchstiere mit intakter Flora trotz der Verabreichung von 2 mg Ochratoxin A/kg KM überlebten.

Der Mensch wird über die Nahrungskette durch pflanzliche Nahrungsmittel direkt und indirekt durch kontaminierte tierische Produkte (Carry-Over) mit Ochratoxin A belastet. In verschiedenen Gebieten Bulgariens, Rumäniens und Türkei leidet die Bevölkerung an einer endemisch auftretenden schweren Nierenkrankheit (BEN = Balkan Endemic Nephropathy). Aufgrund gleichartiger pathologischer und anatomischer Erscheinungen bei Mykotoxischer Porciner Nephropathie (MPN) und BEN, gilt in erster Linie Ochratoxin A als Krankheitsursache. In endemischen Regionen ist die Frequenz der Ochratoxin A-Kontamination in Getreide deutlich höher und korreliert mit dem Gehalt des Toxins in menschlichem Blut (10, 11).

Ochratoxin A im Pansensaft wurde in erster Linie zu Ochratoxin α hydrolysiert. Die Umsetzung des Toxins erwies sich als abhängig von Fütterung und dem Zeitpunkt der Pansensaftentnahme. Die Halbwertszeiten des Toxinabbaues variierten in Abhängigkeit der untersuchten Faktoren im Bereich zwischen 0,38 und 2,78 Stunden (9). Nach bisherigen Untersuchungen scheint bei der Metabolisierung von Ochratoxin A den Protozoen die größte Bedeutung zuzukommen (12,13,14).

Das Ziel dieser Arbeit war es daher festzustellen, wie sich Fütterungsfaktoren, wie unterschiedliche Mengen an Stärke und Cellulose, sowie der Zusatz von Antibiotika (Monensin) *In vitro* auf Zusammensetzung der Pansenflora und auf die Inaktivierung von Ochratoxin A auswirken.

Material und Methoden

Als Versuchstiere standen zwei, ca 500 kg schwere, pansenfistulierte Holstein-Frisien Kühe zur Verfügung. Die Tiere erhielten ein handelsübliches Mineralfutter, Wasser stand zur freien Verfügung. Die Tieren wurden mit zwei verschiedenen Rationen, eine war als Grundration (40% Heu + 60% Kraftfutter, **Ration I**) und andere Heuration (100% Heu, **Ration II**), gefüttert. Die Rationen wurden 14 Tage vor Beginn der Versuche gefüttert, um eine Anpassung der Pansenflora und -fauna an die Versuchsbedingungen zu ermöglichen. Monensinzusatz (200 mg/Tag) wurde direkt in Pansen durch Pansenfistel, mit dem Grundration gegeben. Die Tiere wurden morgens 7.00 und abends 17.00 Uhr gefüttert. Die Rohnährstoffgehalte der Rationskomponenten wurden nach dem Weender-Analyse-Verfahren (15)

ermittelt (Tabelle 1).

Die Pansensaftprobe wurde vor der Morgenfütterung über eine Pansenfistel entnommen und in eine warmes Wasserbad gestellt. Das Nährmedium für die Ochratoxin A-Inkubation wurde nach dem Hohenheimer Futterwerttest (16) erstellt. Im Labor wurde der Pansensaft mit dem Nährmedium gemischt und mit CO₂ begast.

Tabelle 1. Die Rohnährstoffgehalte der Futtermittel

Futtermittel	XA %	XL %	XP %	XF %	Nfe %	Gasbil. ml	NEL MJ
Heu	8.90	1.05	10.23	29.40	39.62	45.90	5.01
Kraftfutter	6.80	3.40	20.56	5.49	52.05	57.65	7.08

Reines Ochratoxin A wurde mit Stärke in Pansensaft/Nährmedium-Lösung für die Dauer von 48 Stunden in Woulffschen Flaschen inkubiert. Dabei sollte der Metabolismus des Toxins untersucht werden. Die eingesetzte Konzentration an Ochratoxin A betrug 200 μ g/l Pansensaft. Ein Ansatz ohne Substrat wurde als Kontrolle mitgeführt. Nach einer Inkubationsdauer von 2 Minuten wurde eine gleichmäßige Verteilung im Ansatz angenommen und die ersten Proben gezogen. Weitere Parallelen wurden nach 1, 2, 4, 12, 24, 32, 48 Stunden entnommen. Die Proben wurden bis zur Analyse der Ochratoxine -20°C tiefgefroren.

Die Auszählung der Protozoen erfolgte mit Hilfe einer Zählkammer (FUCHS und ROSENTHAL, $1 \times 1 \times 0.2$ mm) bei 320-facher mikroskopischer Vergrößerung. Die Anfärbung der Protozoen hat sich die von Abe et al., (17) beschriebene Methode durchgeföhrt.

Der Nachweis von Ochratoxinen wurde mit Hilfe von HPLC-Floureszenzdedektion durch den Methoden von Lerch und Müller, (18) geföhrt (*Geräte*: Floureszenzdedektor: F 1000 (Merck/Hitachi, Darmstadt), *Säule*: ODS-Hypersil 5 μ m (Shandon Ltd., Cheshire, UK) 12.5 cm, 14.6 mm Innendurchmesser, *Elutionsmittel*: 0,25 n-Phosphorsäure/Acetonitril/Isopropanol: 55/35/10 v/v, *Flußrate*: 1.5 ml/min., *Dedektionwellenlänge*: Extinktion 335 nm, Emmission 475 nm, *Retentionszeiten*: Ochratoxin A: ca. 5 min.; *Nachweisgrenzen*: Ochratoxin A: 0.1 ppb.

Ochratoxin A wurde von Makor Chemicals Ltd. bezogen.

Zur Bestimmung der Aktivität der Protozoen wurde der Pansensaftprobe über eine Minute mit 500 g zentrifugiert, die flüssige Phase abdekantiert und der Bodensatz (Protozoen) mit Nährmedium auf das ursprüngliche Volumen ergänzt.

Die statistische Auswertung erfolgte durch das Verfahren der Repeated Measures Analyses of Variance (RMAV) (19). Die zeitliche Verlauf des Ochratoxin A Abbaus wurde durch Anpassung der Messdaten an eine Exponentialfunktion der Form $y = a \cdot e^{-k \cdot t}$ (nach Linearisierung) mit der Prozedur PROCREG (20) beschrieben. Der zeitliche Abbau – bzw. Syntheseverlauf wurde aufgrund der Verhältnisse der Abbaurate – bzw. Syntheserate Konstanten zueinander beurteilt.

Ergebnisse

In den Parallelproben wurden 70±6 % der theoretisch zugesetzten Menge an Ochratoxin A gemessen, für Ochratoxin α lagen die entsprechenden Werte bei 53 ± 4%.

Die Halbwertszeit des Abbaues von Ochratoxin A lag der Kontrollgruppe bei 3,7 Stunden. Stärkezusatz zeigte einen positiven Einfluss, indem sich die Halbwertszeit auf 1,91 Stunden verringerte (Tabelle 2).

Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede (p<0,001); n = 5

Die Halbwertszeit des Ochratoxinabbaues war durch Cellulosezusatz höher als durch Stärkezusatz. Die Halbwertszeit lag bei dem Cellulosezusätzten Gruppe 4,5 Stunde.

In Abhängigkeit von Monensinzusatz wurde die Abbaugeschwindigkeit langsamer und es hatte signifikante unterschiedlich zu anderen Gruppe (p<0.001). Die Halbwertszeit des Abbaues von Ochratoxin A an Monensinzusatz um 20.1 Stunde.

Pansensaft des Tieres wurde durch fraktionierte Zentrifugation in eine Protozoen und Bakterienfraktion aufgetrennt und mikroskopische auf eine erfolgreiche Trennung untersucht. In der Fraktion der leichten Bakterien und des zellfreien Überstandes wurde das Toxin nur in sehr geringen Mengen abgebaut, während der Abbau in der Protozoenfraktion ähnlich wie in der Kontrolle verlief (Abb. 1).

Da den Pansenprotozoen eine Schlüsselrolle beim Pansenstoffwechsel zukommt, wurde überprüft, ob die Abbaugeschwindigkeit von Ochratoxin A mit der Gesamtzahl von Protozoen in Pansensaft korreliert (Tabelle 3).

Die höchste Protozoenanzahl der Zusatzgruppen wurde der Stärkeansatzgruppe beobachtet (Tabelle 3). Es wurde zwischen Protozoenkonzentrationen und Stärkegehalt eine enge Korrelation festgestellt (p<0.05).

Die Nettogasbildungen an Stärke-Heu- und Monensinzusatzes wurden in vitro gemessen. So wurden die

Kontrolle von den Nährmedien an dem OTA Abbau stattfindet. In diesem Versuch wurde die höchste Gasbildung bei der Stärkezusatzte Gruppe festgestellt (Tabelle 4).

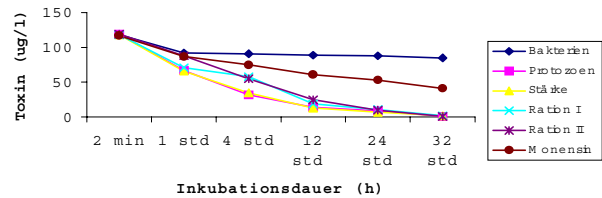


Abbildung 1. Ochratoxin A-Abbau

Tabelle 4. Einfluss verschiedener Testsubstrate (200 mg TS) auf den Verlauf der Nettogasbildung von Pansensaft bei Inkubation bis zu 48 Stunden (n = 15).

Substrat	Nettogasbildung, ml						
	Inkubationsdauer (h)						
	1	2	4	12	24	32	48
Stärke	2.3	6	27	64	81	81	81
Heu	1.2	1.2	2.7	12.5	38	54	72
Monensin	2	3.7	8.2	32	43	50	57

Diskussion

Bei Inkubation von Ochratoxin A mit Pansensaft wurde nach einer Versuchsdauer von 2 Minuten 70 ± 6µg/l von der theoretisch zugesetzten Toxinmenge (200 µg/l Pansensaft) in Form Ochratoxin A wiedergefunden, für Ochratoxin α lagen die entsprechenden Werte bei 53 ± 4. Die ermittelte Wiederfindungsraten stimmen mit der Arbeit von Galtier und Alvineria (21), Müller (9) überein.

In dieser Arbeit traten die niedrigsten Halbwertszeiten beim Ochratoxin A Abbau nach Stärkezusatz auf. Die Geschwindigkeit des Toxinabbaus war nicht konstant, sondern vom verwendeten Zusatz abhängig. Der in den verschiedenen Pansensaftproben unterschiedliche

Tabelle 2. Ochratoxin A Abbau: Abbauraten k (-geschwindigkeit), Halbwertszeit und Bestimmtheitsmaß der Schätzgleichung bei unterschiedlicher Zusätzen zum Pansensaft und Bakterien und Protozoenfraktionen - Exponentialfunktion der Form $y=a * e^{-k*t}$ als Schätzgleichung (t in h).

	Abbauraten	Halbwertszeit	Bestimmtheitsmaß, R ²
Ration I	$y = 4.54565 \times e^{-0.119216t}$	3.7 ^b	0.9398
Ration II	$y = 4.5741 \times e^{-0.106644t}$	4.5 ^c	0.9373
Monensin	$y = 4.5170 \times e^{-0.021213t}$	20.1 ^d	0.8883
Pansensaft			
-mit Stärke	$y = 4.4329 \times e^{-0.179486t}$	1.91 ^a	0.9132
Protozoenfraktion	$y = 4.4190 \times e^{-0.144845t}$	2.44 ^a	0.9586
Bakterienfraktion	$y = 4.5881 \times e^{-0.005307t}$	99.42 ^c	0.3628

Tabelle 3. Anzahl der Protozoen während der 48 stündigen Inkubationen

Behandlung	Inkubationszeit (h) und Protozoenzahl (× 10 ⁶)								pH
	0	1	2	4	12	24	32	48	
Protozoenfraktion	1.403	1.057	0.766	0.473	0.308	0.100	0.060	0.012	6.6
Stärke	1.257	0.828	0.516	0.297	0.195	0.066	0.016	0.008	6.3
Ration I	0.711	0.524	0.247	0.187	0.125	0.061	0.011	0.005	6.5
Ration II	0.697	0.415	0.187	0.125	0.099	0.025	0.009	0.003	6.9
Monensin	0.316	0.247	0.192	0.118	0.090	0.020	0.006	0.002	6.5

mikrobielle Besatz muß sich somit auf die Metabolisierung von Ochratoxin A ausgewirkt haben. In Pansen leichtfermentierbare Kohlenhydrate, wie Stärke werden Protozoonkonzentration verstärkt (22).

Nach bisherigen Untersuchungen scheint bei der Metabolisierung von Ochratoxin A den Protozoen die größte Bedeutung zuzukommen (11,12,13,14,21,23).

In der vorliegenden Untersuchung wurde zwischen Protozoonkonzentration und Geschwindigkeit des Abbaus von Ochratoxin A eine signifikante Korrelation festgestellt ($p < 0.001$).

Für den Umsatz von Ochratoxin A in Pansensaft wurde überwiegend Protozoen verantwortlich gemacht. Es wurde in unterschiedlichen Pansensaftproben zwischen 10^5 und 10^6 Protozoen je ml Pansensaft gezählt. Mit steigenden Stärkegehalt in der Ration nimmt die Menge an verfügbarer Energie und somit die Protozoon-dichte in Pansen zu. So führte die zusätzliche Verabreichung von Stärke zu einer Cellulose in Pansensaft zu einer Erhöhung der Protozoonmenge. Den gleichen Sachverhalt beschrieben auch Dennis et al. (24).

Mit Monensinzusatz wurde Protozoonanzahl abnimmt, so wurde die Abbaugeschwindigkeit von Ochratoxin A langsamer. Shelling (25) beschreibt, dass die

Monensinzusatz die Pansenmikroorganismen beeinflusst und die Methangasabbildung niedriger. Mendoza et al. (26), beschreibt, dass die Antibiotikum von Ionoforguppen, haben toxische Effekte über Protozoen und Bakterien in Pansensaft. So werden die Protozoonzahl abnimmt.

Es ist festzuhalten, daß die Geschwindigkeit des Ochratoxin A Abbaus mit steigender Stärkekonzentration in der Ration und damit höherer Protozoonzahl zunimmt (22,27).

Die höchste Gasbildung wurde bei der Stärkezusatzgruppe festgestellt. Bei Inkubation mit Heu war die Gasbildung niedriger. Diese Ergebnis stimmt mit der Arbeit von Müller (9) überein. Die Stärke ist leicht abbaubare Kohlenhydrate, deswegen war die Gasbildung höher an die Stärkegruppe.

Schlußfolgerung

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, daß die gewählte Stärkekonzentration sich positiv auf die Protozoonzahl und somit auch positiv auf die Geschwindigkeit des Ochratoxin A Abbaus auswirkt.

Literaturverzeichnis

1. Van Der Merve KJ, Steyn PS, Fovrie L. Mykotoxins Part II. The constitution of ochratoxin A, B and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus*. *Wilh J Chem Soc* 1965: 7083-7088.
2. Bauer J, Gareis M. Ochratoxin A in der Nahrungsmittelkette. *J Vet Med (B)* 1987; 34, 613-627.
3. Özpınar H, Kahraman R, Senel HS, Dietrich R, Terplan G. Enzymimmunologischer Nachweis von Aflatoxin B, Ochratoxin A und Zearalenon in türkischen Futtermitteln. *Doğa-Tr. J Vet Anim Sci* 1993; 17: 239-244.
4. Creppy EE, Stormer FC, Rösenthaller R, Dirheimer G. Effects of ochratoxin A metabolites on yeast phenylalanyl-tRNA synthetase and on the growth and in vivo protein synthesis of hepatoma cells. *Chem Biol Interact* 1983a; 47: 239-247.
5. Harvey RB, Huff WE, Kubena LF, Phillips TD. Evaluation of diets contaminated with aflatoxin and ochratoxin fed to growing pigs. *Am J Vet Res* 1989; 50 (8): 1400-1405.
6. Höhler D. Ochratoxin A in food and feed: occurrence, legislation and mode of action. *Z Ernährungswiss* 1998; 37: 2-12.
7. Chu FS, Noh I, Chang CC. Structure requirements for ochratoxin intoxication. *Life Sci* 1972; 11: 503-513.
8. Creppy EE, Stormer FC, Rösenthaller R, Dirheimer G. Effects of two metabolites of ochratoxin A, (4R)-4 Hydroxyochratoxin A and Ochratoxin α , on immune response in mice. *Infect Immun* 1983b; 39: 1015-1018.
9. Müller K. Einfluß der Fütterung und anderer Faktoren auf den Umsatz von Ochratoxin A in Pansenflüßigkeit in vitro und in vivo. Promotion, Universität Hohenheim 1995.
10. Krogh P. Mycotoxic porcine nephropathy: A possible model for Balkan endemic nephropathy. *Bulg Acad Sci, Sofia*.1972: 266-270.
11. Hult K, Teiling A, Gatenbeck S. Degradation of ochratoxin A by a ruminant. *Appl Environ Microbiol* 1976; 32: 443-444.
12. Pettersson H, Kiessling K.-H, Cisluk P. Degradation of ochratoxin A in rumen. V. International IUPAC symposium on mykotoxins and phytooxins. Vienna/Austria.1982: 313-316.
13. Kiessling K.-H, Pettersson H, Sandholm K, Olsen M. Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa and rumen bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1984; 47: 1070-1073.
14. Xiao H, Marquardt RR, Frohlich AA, Phillips GD, Vitti T.G.Effect of a hay and a grain diet on the rate of hydrolysis of ochratoxin A in the rumen of sheep. *J Anim Sci* 1991; 69: 3706-3714.
15. Naumann K, Bassler R, Seibold R, Barth K Methodenbuch III: Die chemische Untersuchungen von Futtermitteln. (Hrsg.: Verband Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten). Verl J Neumann Neudamm.1976.
16. Steingass H, Menke KH. Schätzung des energetischen Futterwertes aus der in-vitro mit Pansensaft bestimmten Gasbildung und der chemischen Analysen. 1. Untersuchungen zur Methode. *Übersichten zur Tierernährung* 1986; 14: 251-270.
17. Abe M, Shibui H, Iriki T, Kumeno F. Relation between diet and protozoal population in the rumen. *Br J Nutr* 1973; 29: 197-202.
18. Lerch CM, Müller HM. Analysis of ochratoxin from buffered rumen fluid by reversed-phase high-performance liquid chromatography (HPLC). *Chromatographia* 1990; 30 (7/8): 424-427.
19. Zolman JF. Biostatistics. Experimental design and statistical inference. Oxford University Press, Inc.1993.
20. SAS. Institute Incorporation SAS User's Guide: Statistics, version 6.03 Edition. SAS Institute Inc, Cary, NC.1988.
21. Galtier P, Alvinerie M. In vitro transformation of ochratoxin A by animal microbial floras. *Ann Rec Vet* 1976; 7: 91-98.
22. Abe M, Iriki T. Effects of diet on the protozoa population in permeable continuous cultures of rumen contents. *Br J Nutr* 1978; 39: 255-264.
23. Özpınar H, Augohyte G, Drochner W. Inactivation of ochratoxin in ruminal fluid with variation of pH-value and fermentation parameters in an in vitro system. *Environm Toxicol Pharmacol* 1999; 7, 1-9.
24. Dennis SM, Aramel MJ, Bartley EE, Dayton AB. Effect of energy concentration and source of nitrogen on numbers and types of rumen protozoa. *J Dairy Sci* 1983; 66: 1248-1254.
25. Shelling GT. Monensin mode of action in the rumen. *J Anim Sci* 1984; 58: 1518-1525.
26. Mendoza MGD, Britton RA, Stock RA. Influence of ruminal protozoa on site and extent of starch digestion and ruminal fermentation. *J Anim Sci* 1993; 71: 1572-1578.
27. Lyle RR, Johnson RR, Wilhite JV, Backus WR. Ruminal characteristics in steers as affected by adaptation from forage to all-concentrate diets. *J Anim Sci* 1981; 53: 1383-1390.