



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
ESCUELA DE INGENIERÍA ZOOTÉCNICA**

**“EFECTO DE PREPARADOS CON LEVADURAS
SACCHAROMYCES CEREVISIAE Y *LEVICA -25* VIABLES EN LOS
METANÓGENOS Y METANOGÉNESIS RUMINAL *IN VITRO*”**

TESIS DE GRADO

Previa la obtención del título de:

INGENIERO ZOOTECNISTA

AUTOR

SANDRA ISABEL CASTAÑEDA CAGUANA

Riobamba-Ecuador

2010

Esta Tesis fue aprobada por el siguiente Tribunal

Ing. Luis Alberto Fiallos Ortega.Ph.D.

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Ing. M.C. Byron Leoncio Díaz Monroy.

DIRECTOR DE TESIS

Dra. M.C. Georgina Hipatia Moreno Andrade.

ASESOR DETESIS

Riobamba, 11 de febrero del 2010

AGRADECIMIENTO

Agradezco especialmente a mi Dios bendito por haberme bendecido con unos padres maravillosos, trabajadores y honrados ya que con su esfuerzo me dieron la educación necesaria para sobresalir en la vida y además me enseñaron que en esta vida hay que luchar con mucha honradez para conseguir lo que uno se propone .

DEDICATORIA

La meta alcanzada se la dedico a mi madre María Manuela (+), quien fue una madre cariñosa y bondadosa, la cual me guio y me lleno de bendiciones desde el cielo y me dio fuerzas en los momentos difíciles y a mi padre Milton quien es el pilar fundamental de mi vida.

CONTENIDO

	Pág.
Resumen	iv
Abstract	v
Lista de Cuadros	vi
Lista de Gráficos	vii
Lista de Anexos	viii
I. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
II. <u>REVISIÓN DE LITERATURA</u>	3
A. EL RUMEN Y SUS CARACTERISTICAS	3
1. <u>Características físico-químicas</u>	4
2. <u>Proceso ruminal</u>	4
3. <u>Cambios en el ecosistema ruminal</u>	6
B. ORGANISMOS IMPLICADOS EN LA DIGESTIÓN DE LA PARED CELULAR VEGETAL	7
1. <u>Los hongos</u>	7
2. <u>Protozoos</u>	8
3. <u>Bacterias</u>	9
C. FACTORES QUE INCIDEN EN LOS PROCESOS DE DIGESTIÓN MICROBIANA DE LOS FORRAJES	11
ADITIVOS MICROBIANOS	12
1. <u>Aditivos microbianos de origen ruminal</u>	13
2. <u>Aditivos microbianos bacterianos</u>	14
LAS LEVADURAS	15
1. <u>Saccharomyces cerevisiae</u>	16
2. <u>Levica 25</u>	17
FORMACION DEL METANO EN EL RUMEN	17
III. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	20
A. LOCALIZACIÓN Y DURACIÓN DEL EXPERIMENTO	20
B. UNIDADES EXPERIMENTALES	20
C. MATERIALES, EQUIPOS E INSTALACIONES	21

1. <u>Materiales</u>	21
2. <u>Equipos</u>	21
3. <u>Instalaciones</u>	21
D. TRATAMIENTOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL	22
E. MEDICIONES EXPERIMENTALES	24
F. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS Y PRUEBAS DE SIGNIFICANCIA	24
G. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	25
1. <u>Técnicas de cultivo y conteos de microorganismos</u>	25
2. <u>Preparación de la muestra del pasto</u>	26
3. <u>Obtención del preparado microbiano con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y Levica 25</u>	26
H. METODOLOGIA DE EVALUACION	26
1. <u>Población de metanógenos</u>	26
2. <u>Producción de gas</u>	27
3. <u>Bacterias celulolíticas y bacterias viables totales</u>	27
4. <u>Protozoos</u>	27
5. <u>Ph</u>	27
IV. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	28
A. EVALUACIÓN DE LA METANOGÉNESIS RUMINAL <i>IN VITRO</i> POR EFECTO DE PREPARADOS MICROBIANOS CON LEVADURAS VIABLES	28
1. <u>Potencial hidrógeno</u>	28
2. <u>Producción de gas total</u>	29
3. <u>Producción de gas metano</u>	33
B. EFECTO DE PREPARADOS MICROBIANOS CON LEVADURAS VIABLES EN LA POBLACIÓN MICROBIOLÓGICA RUMINAL <i>IN VITRO</i>	36
1. <u>Población de bacterias viables totales</u>	36
2. <u>Población de bacterias celulolíticas</u>	38
3. <u>Población de bacterias metanogénicas</u>	41
4. <u>Población de protozoos</u>	44
C. ANÁLISIS DE PREFACTIBILIDAD ECONÓMICA DEL USO DE PREPARADOS MICROBIANOS CON LEVADURAS VIABLES EN	

RUMIANTES MAYORES.	47
VI. <u>CONCLUSIONES</u>	50
VI. <u>RECOMENDACIONES</u>	51
VII. <u>LITERATURA CITADA</u>	52
ANEXOS	

RESUMEN

En el departamento de ciencias Biofisiológicas perteneciente al Instituto de Ciencia Animal, que se encuentra ubicado en el Municipio San José de las Lajas, provincia Habana, Cuba, , entre Septiembre 2008 a Enero 2009, se realizó la siguiente investigación: “Efecto de preparados con levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Levica - 25* viables en los metanógenos y metanogénesis ruminal *in vitro*”, cuyos tratamientos evaluados fueron: Pasto estrella (control), Pasto estrella + *Saccharomyces cerevisiae* y *Pasto estrella + Levica 25* donde se utilizó líquido ruminal de búfalos. Se evaluaron 3 tratamientos con 4 repeticiones cada uno a las 8,12 y 24 horas, en la cual se aplicó un diseño completamente al azar bifactorial 3 x 3 (3 tratamientos, 3 horas de muestreo). Existió diferencias altamente significativas en función al tipo de tratamientos dentro de cada hora de evaluación y en función de las horas evaluadas en los diferentes tratamientos, cuyas variables: población de metanógenos producción de gas producción de metano bacterias celulolíticas bacterias viables totales protozoos y Ph. Observándose en éste último que se registraron diferencias significativas dentro de los tratamientos en donde se utilizaron levaduras y el tratamiento control, no siendo así dentro de las horas de fermentación, en donde no se registraron diferencias estadísticas. Por lo tanto la utilización de Levaduras como suplemento en la dieta de rumiantes mejora el aprovechamiento del alimento ya que aumenta la población de bacterias celulolíticas las cuales desdoblan la celulosa y hay una disminución de la población de bacterias metanogénicas las cuales producen el metano que es perjudicial para el medio ambiente. Se determinó que la mejor levadura es la Levica-25 la cual produce un efecto más eficiente. Por todo lo expuesto se recomienda la utilización de preparados microbianos a partir de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae* y *Levica 25*) en rumiantes mayores para disminuir la metanogénesis en el rumen e incrementar la población de bacterias celulolíticas que permitirán una mayor digestibilidad y aprovechamiento de los nutrientes de los pastos, igualmente realizar otras investigaciones con otros preparados microbianos.

ABSTRACT

In the department of sciences Biofisiológicas belong to the Institute of Animal Science that is located in the Municipality San José de las Lajas, county Habana, Cuba province, between September 2008 and January 2009, I've made the follow investigation: "Effect of prepared with yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Levica* -25 viable in the metanógenos and metanogénesis ruminal in vitro" whose valued treatments were: 1 pasture it shatters (control), Pasture it shatters + *Saccharomyces cerevisiae* and Grass shatters + *Levica* 25 where you uses liquidate ruminal of buffalos. 3 treatments were evaluated with 4 repetitions each one at the 8,12 and 24 hours, in which a design was applied bifactorial totally at random 3 x 3 (3 treatments, 3 hours of sampling).Existed highly significant differences in function to the type of treatments in every hour of evaluation and in function of the hours evaluated in the different treatments whose variables: population of metanógenos production of gas production of methane bacterias celulolíticas bacterias viable total protozoos and Ph. Observed in this last that registered significant differences inside the treatments where yeasts and the treatment control were used, not being this way in the hours of fermentation where didn't register statistical differences. Therefore the use of Yeasts like supplement in the diet of ruminant improvement the use of the food since the population of bacterias celulolíticas increases which unfold the cellulose and there is the population's of bacterias metanogénicas decrease which produce the methane that is harmful for the environment. You determines that the best yeast is the *Levica*-25 which produces a more efficient effect. All told that exposed the use is recommended of prepared microbial starting from yeasts (*Saccharomyces cerevisiae* and *Levica* 25) in ruminant adults to diminish the metanogénesis in the rumen and to increase the population of bacterias celulolíticas that you/they will allow a bigger digestibilidad and use of the nutrients of the grasses, equally to carry out other investigations with other microbial preparations.

LISTA DE CUADROS

No.		Pág.
1.	CONDICIONES METEOROLÓGICAS.	20
2.	PREPARACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES.	22
3.	ESQUEMA DEL EXPERIMENTO.	22
4.	PREPARACIÓN DEL TRATAMIENTO EXPERIMENTAL PARA LA VALIDACIÓN.	23
5.	ESQUEMA DEL EXPERIMENTO PARA LA VALIDACIÓN.	24
6.	ESQUEMA DEL ADEVA.	24
7.	EVALUACIÓN DEL pH, POR EFECTO DE PREPARADOS MICROBIANOS CON LEVADURAS VIABLES SOBRE LA METANOGÉNESIS RUMINAL “ <i>IN VITRO</i> ”, DE ACUERDO AL TRATAMIENTO Y TIEMPO DE FERMENTACIÓN.	28
8.	EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS Y FERMENTATIVAS, ANTE EL EFECTO DE PREPARADOS MICROBIANOS CON LEVADURAS VIABLES SOBRE LA METANOGÉNESIS RUMINAL “ <i>IN VITRO</i> ”, DE ACUERDO AL TRATAMIENTO Y TIEMPO DE FERMENTACIÓN.	30
9.	VALIDACIÓN DEL EFECTO DE PREPARADOS MICROBIANOS A BASE DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> SOBRE LA POBLACIÓN MICROBIOLÓGICA RUMINAL <i>IN VITRO</i> .	47
	DETERMINACIÓN DE COSTOS PARA EL ANÁLISIS DE PREFACTIBILIDAD ECONÓMICA DEL USO DE PREPARADOS MICROBIANOS A BASE DE LEVICA 25.	49

LISTA DE GRÁFICOS

No.		Pág.
1.	Comportamiento de la producción de gas total <i>in vitro</i> por efecto de la utilización de preparados microbianos con levaduras viables.	31
2.	Comportamiento de la producción de gas metano <i>in vitro</i> por efecto de la utilización de preparados microbianos con levaduras viables.	34
3.	Población de bacterias celulolíticas <i>in vitro</i> por efecto de la utilización de preparados microbianos con levaduras viables.	39
4.	Población de bacterias metanogénicas <i>in vitro</i> por efecto de la utilización de preparados microbianos con levaduras viables.	43
5.	Comportamiento de la población de protozoarios <i>in vitro</i> por efecto de la utilización de preparados microbianos con levaduras viables.	45

LISTA DE ANEXOS

1. Análisis de varianza de los indicadores ruminales en la evaluación de la metanogénesis ruminal *in vitro* por efecto de preparados microbianos con levaduras viables.
2. Análisis de varianza de los indicadores de la población microbiológica ruminal *in vitro* por efecto de preparados microbianos con levaduras viables.

I. INTRODUCCIÓN

Los rumiantes producen alrededor del 97 % del metano generado por los animales domésticos, y el sitio principal de generación de metano es el rumen como consecuencia inevitable de la fermentación de los carbohidratos por los microorganismos que habitan en el, estimándose una producción anual de 300 – 600 litros en rumiantes adultos.

Este gas es el responsable del 18% del efecto invernadero producido en la atmósfera. Se emite a la atmósfera mediante el eructo y la cantidad que se libera depende del volumen y tipo de alimento que consumen los rumiantes, siendo su producción menor cuando las dietas tienen bajas cantidades de fibra. Gil, S. (2004).

El metano que emiten los rumiantes no sólo constituye un problema ecológico, sino que también contribuye a la pérdida de energía del alimento, lo que trae como consecuencia una disminución de la productividad de los animales, estimándose que más del 10% de la energía bruta que contienen los alimentos se pierde en forma de metano.

Se ha demostrado en rumiantes, que las prácticas de alimentación que aumenten el consumo y la velocidad de digestión o acorten el tiempo de permanencia de los alimentos en el rumen, disminuyen la producción de metano por unidad de forraje digerido. Al respecto, el empleo de preparados microbianos con levaduras viables constituye una atractiva opción. Una posibilidad, que ha sido estudiada para reducir la producción de metano en el rumen, es el empleo de aditivos con levadura *Saccharomyces cerevisiae*. En Cuba determinaron que esta levadura es capaz de activar la población microbiana ruminal e indicó que otras levaduras, entre las que se destaca LEVICA 25 puede producir potencialmente efectos superiores a la *Saccharomyces cerevisiae*.

Es bien reconocido que la dieta y principalmente, el contenido de fibra influyen en la densidad poblacional de metanógenos en el rumen, así menor cantidad de bacterias metanogénicas se detectarán en el rumen de animales alimentados con concentrado en relación a los alimentados con forraje.

Se ha demostrado que la producción de metano se incrementa rápidamente

después de la alimentación, asimismo, a medida que la digestibilidad de la ración se incrementa, la producción de metano disminuye. Numerosas vías se han empleado para atenuar la producción de metano en el rumen, algunas muy costosas y por lo tanto, no aplicables dentro de las condiciones productivas de países en vías de desarrollo.

El empleo de aditivos microbianos con levaduras viables es una opción válida para contrarrestar la población de metanógenos, debido a su importante papel como manipuladoras de la fermentación ruminal, lo que provoca un incremento de bacterias celulolíticas que permiten una mejor digestión y consecuentemente mayor aprovechamiento de los nutrientes del alimento. Por estas consideraciones en la presente investigación se plantearon los siguientes objetivos:

- Evaluar el efecto de preparados de levaduras a partir de *Saccharomyces cerevisiae* y LEVICA 25 en la metanogénesis ruminal *in vitro* de rumiantes mayores.
- Estudiar el efecto *in vitro* de preparados microbianos con levaduras viables, sobre la población microbiológica del rumen.
- Realizar un análisis de prefactibilidad económica para el uso de preparados microbianos con levaduras viables en rumiantes mayores.
- Validar los resultados en bovinos lecheros del Ecuador a partir de *Saccharomyces cerevisiae* en reemplazo de Levica 25.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

A. EL RUMEN Y SUS CARACTERISTICAS

En el rumen se encuentran una de las más grandes densidades de población de microorganismos conocidas, los cuales varían en tipo y proporción según su alimento, estos mantienen una relación simbiótica con el hospedero. Angulo, R.(2005).

El rumen provee un ambiente apropiado, con un suministro generoso de alimentos, para el crecimiento y reproducción de los microbios. La ausencia de aire (oxígeno) en el rumen favorezca el crecimiento de especies especiales de bacteria, entre ellos las que pueden digerir las paredes de las células de plantas (celulosa) para producir azúcares sencillos (glucosa). Los microbios fermentan glucosa para obtener la energía para crecer y ellos producen ácidos grasos volátiles (AGV) , como los productos finales de fermentación.

Mientras que crecen los microbios del rumen, producen aminoácidos, las piedras fundamentales para proteínas. Las bacterias pueden utilizar amoníaco o urea como fuentes de nitrógeno para producir aminoácidos.

La mayoría está compuesta por microorganismos anaerobios estrictos, pero hay una pequeña población de bacterias anaerobias facultativas, que toleran pequeñas concentraciones de O₂ que pueden utilizar en su metabolismo. La población microbiana del rumen, está constituida por bacterias, hongos y protozoos. El tipo y la proporción de microorganismos varían en función del tipo de alimento. Doré, J y Gouet, P. (1991). Las bacterias, son los principales agentes que actúan en la fermentación de los carbohidratos estructurales y la proteína de las plantas. Los protozoos ciliados son importantes en la digestión de carbohidratos no estructurales, intervienen en el fraccionamiento físico del alimento y juegan un importante papel como reguladores del pH ruminal. Prins, R.(1991). Los búfalos presentan mayor población de bacterias y hongos, característica que les permite realizar una degradación más eficiente de la pared celular de los forrajes y de la proteína proveniente de la dieta. Esta ha sido considerada como una de las razones por la cual, los búfalos tienen mayor capacidad de transformar los forrajes de baja calidad en energía disponible en forma de ácidos grasos volátiles (AGV) .Franzolin, R.(2001).

Así mismo el rumen provee un ambiente apropiado, con un suministro generoso de alimentos, para el crecimiento y reproducción de los microbios. La ausencia de aire (oxígeno) en el rumen favorece el crecimiento de especies bacterianas, entre ellos las que pueden digerir las paredes de las células de plantas (celulosa), para producir azúcares sencillos (glucosa). Los microbios fermentan glucosa para obtener la energía para crecer y ellos producen ácidos grasos volátiles (AGV) como los productos finales de fermentación.

1. Características físico-químicas

El rumen se puede considerar como un fermentador de temperatura constante que presenta condiciones anaerobias (potencial de oxígeno: 10^{-22} M). Debido al tamponamiento producido por la saliva, el pH se mantiene constante en torno a 6.5. Este tamponamiento salivar es importante ya que durante la fermentación ruminal se generan ácidos orgánicos que tienden a bajar el pH. Franzolin, R. (2001).

En conjunto, puede considerarse el rumen como un sistema de cultivo continuo cuya tasa de crecimiento está controlada por el aporte nutritivo derivado de la alimentación del animal (sistema quimiostático).

2. Proceso ruminal

El proceso en el rumen dura cerca de 9h. Los alimentos rumiados pasan por la redécilla, se devuelven a la boca donde se mastican y pasan al resto de compartimentos gástricos (cuajar). La digestión que tiene lugar en el rumen es únicamente bacteriana: el rumen no produce enzimas.

Los microorganismos ruminales no sólo digieren azúcares de alto peso molecular sino que también son responsables de la producción de los aminoácidos y factores de crecimiento necesarios para el desarrollo del animal que, por consiguiente, no necesita ingerirlos en la dieta.

Los microorganismos ruminales pertenecen a varios grupos taxonómicos:(1) bacterias, principalmente bacilos o cocos Gram-negativos, aunque también hay grupos Gram-positivos. Llegan a alcanzar números muy altos (10^{10} a 10^{11} bacterias por gramo). Los grupos principales son *Ruminococcus* y *Bacteroides*. Ecológicamente se producen equilibrios entre los diferentes grupos bacterianos, equilibrios que si se desestabilizan son causantes de problemas en el rendimiento del proceso ruminal (por ejemplo: hay bacterias que metabolizan algunos

productos secundarios de otras, el H₂ por ejemplo, que si no es eliminado rápidamente puede llegar a ser inhibidor de otros procesos ruminales. Por consiguiente, el mantenimiento de microorganismos como *Methanobacterium ruminantium* responsable de la formación de metano a partir de CO₂ e H₂ es imprescindible para el proceso). (2) Arqueas, como microorganismos metanógenos. (3) Protozoos: hay entre 10⁵ y 10⁶ unidades por gramo; anaerobios (lo que es muy infrecuente entre los protozoos) ciliados con cierta capacidad de degradación de celulosa y de almidón mediante fermentación. Actúan como depredadores de bacterias. Carro, M. & Ranilla, M. (2003).

Entre todos estos microorganismos se establecen cadenas tróficas en las que unos utilizan como fuente de alimento los residuos de los anteriores. Así mismo, se producen cadenas por protozoos predadores de eubacterias y arqueas. Desde el punto de vista bioquímico se produce la degradación de la celulosa según el esquema siguiente.

Celulosa → celobiosa → glucosa → fermentación ácido-mixta (ácidos grasos volátiles) → ácidos grasos absorbidos en el rumen la fermentación rinde ácidos orgánicos de cadena corta (acético, propiónico y butírico).

La degradación de la celulosa la inician microorganismos celulolíticos que representan entre el 1 y el 5% de la flora ruminal. La mayoría de los microorganismos de esta flora no son celulolíticos, aunque en conjunto pueden degradar una gran número de polímeros de alto peso molecular como almidón, pectina, lípidos, etc. De los residuos vegetales, sólo la lignina no es digerible por la flora ruminal.

Los productos finales del proceso ruminal son los ácidos grasos de cadena corta, también CO₂ y CH₄ (65%-35%). El origen del metano está en la actividad de *Methanobacterium ruminantium* a partir del CO₂ y del H₂ producidos en la fermentación ácida mixta. Estos gases se eliminan mediante eructos lo que, probablemente sirva para diseminar las bacterias en la población y, por otra parte, es origen de una gran cantidad del metano libre en la atmósfera.

La eliminación de gases mediante eructos es necesaria para el proceso porque pueden llegar a suponer 80 de los 100 litros de la panza del animal. Si no se produce la eliminación de estos gases (por ejemplo, porque se produce espuma

en la panza, lo que ocurre en ciertos casos de ingestión de alimento en condiciones incorrectas) se pueden originar problemas serios que pueden causar la muerte del animal (patología denominada timpanitis).

Los restos no digeridos durante el proceso ruminal y las bacterias y protozoos son enviados al estómago después del proceso de masticación. En la práctica, los finales residuos no metabolizados son de tipo lignina. Gil, S. (2004).

3. Cambios en el ecosistema ruminal

La composición bacteriana depende de la dieta y de cuál sea la principal fuente de carbono (celulosa, almidón o pectina; según el alimento sea heno, granos o heno de leguminosas, por ejemplo).

El rumen es un ecosistema muy constante: cambios bruscos en él pueden llevar a la muerte del animal (ej: *S. bovis* crece de forma explosiva cuando brusco de dieta de heno a grano; como esta bacteria usa el almidón mediante fermentación da lugar a una fuerte acidosis). Cambios graduales en la dieta dan lugar a selección de nuevas poblaciones de microorganismos. En otras ocasiones, la dieta puede dar lugar a la formación de espuma que dificulta o impide la erucción.

Hay un equilibrio entre microorganismos metanógenos (arqueobacterias) e hidrogénicos que, a su vez, son inhibidos en condiciones de concentración alta de hidrógeno.

Se puede añadir urea ($\text{H}_3\text{C}-\text{CO}-\text{CH}_3$) al forraje para que sea fuente de nitrógeno para los microorganismos ruminales que así producen proteínas que luego utiliza el animal.

B. ORGANISMOS IMPLICADOS EN LA DIGESTIÓN DE LA PARED CELULAR VEGETAL

1. Los hongos

Los hongos son los primeros organismos en invadir y digerir el componente estructural de las plantas y tienen una relación estrecha con las bacterias permitiendo así que estas penetren al compartimento intracelular y colonicen el material vegetal, iniciando el proceso de degradación de las fracciones insolubles del alimento. Akin, D y Borneman, W. (1990).

La población de hongos anaerobios del rumen está directamente relacionada con el contenido en fibra de la dieta, y su proporción disminuye en dietas ricas en almidón o azúcares solubles. Grenet, E. et al. (1989). Los hongos ruminales tienen capacidad enzimática de hidrolizar celulosa y xilano, aunque parece que no pectina. Fonty, G. et al. (1992). Lógicamente, su actividad enzimática frente a estos substratos es variable dependiendo de su origen filogenético, en especial de su estructura rizoidal, pero se ha postulado que algunas especies, como *Neocallimastix frontalis*, *Piromyces communis* y *Orpinomyces jyonii* son tanto o incluso más eficientes en la digestión de los polisacáridos estructurales como las especies bacterianas más activamente celulolíticas.

La acción fúngica sobre la pared celular vegetal y su contribución a la digestión ruminal de ésta, parece estar muy relacionada con su activa colonización. Se ha observado mediante microscopía electrónica que las zoosporas son atraídas por quimiotactismo, y se adhieren rápidamente a las partículas, preferentemente en estomas y zonas de corte de los tejidos lignificados (esclerenquima, xilema), aunque los tejidos vegetales no lignificados (floema, parénquima medular) son los más rápidamente degradados. Akin, D y Borneman, W. (1990). En este sentido, los hongos ruminales son especialmente activos frente a substratos muy lignificados. De hecho, aunque no está probada su capacidad de utilización de lignina como fuente de nutrientes, *N. frontalis* puede solubilizar pequeñas cantidades de lignina de la pared celular vegetal, probablemente debido a la solubilización de compuestos fenólicos, en mayor medida que las bacterias. Akin, D y Borneman, W. (1990), aumentando la accesibilidad de los polisacáridos estructurales para las bacterias. Los hongos ruminales, a diferencia de algunas bacterias, no son capaces de fermentar los compuestos fenólicos. Akin, D y Rigsby, L (1985). Por otra parte, la acción mecánica de los hongos sobre la pared celular vegetal disminuye la rigidez estructural de los forrajes, y favorece la ruptura de las partículas de forraje. Orpin, C. (1983), aumentando también así la superficie accesible para la acción bacteriana.

2. Protozoos

Su principal [función](#) es ingerir partículas del tamaño de las bacterias, como almidón, fibras, cloroplastos.

La mayoría de los componentes son Ciliata, los organismos unicelulares más complejos. Su biomasa es similar a la de las bacterias, pero pueden sobrepasarla más de 3 veces según la dieta, o inclusive desaparecer. Las diferentes especies varían en tamaño, entre 25 a 250 micras, agrupándose en 17 géneros de la sub clase Entodiniomorpha y 2 géneros de la sub clase Holotriches, que difiere en su [morfología](#) y [metabolismo](#). Las especies presentes varían con la especie animal, la localidad y la dieta.

Los tiempos de generación oscilan entre 0.5 a 2 días. Los más lentos pueden llegar a desaparecer con los fluidos del rumen, varios permanecen adheridos a fragmentos de alimento, por lo que son más retenidos que las bacterias y una gran parte pueden ser lisadas en el rumen.

Los protozoos provocan un aumento en la actividad proteolítica ruminal. Estos microorganismos, aunque son capaces de sintetizar aminoácidos, no lo hacen en cantidades significativas, por lo que los requeridos para la síntesis de proteínas protozoarias los obtienen de la digestión de bacterias, zoosporas de hongos y de las proteínas vegetales y aminoácidos libres, consumidos por el hospedero. Ambos aspectos hacen que cuando los protozoos están presentes en el rumen se reduzca la eficiencia de utilización de la proteína por el rumiante. Kamra,D. y Agawal,N.(2004).

El efecto de los protozoos sobre la digestión de la fibra vegetal depende del papel y de la importancia relativa de los distintos géneros y especies en el ecosistema ruminal. Jouany,J.(1994). En general, la presencia de protozoos aumenta, directa o indirectamente, la digestión ruminal de celulosa y hemicelulosas respecto a animales defaunados. Aunque las actividades enzimáticas endoglucanasa, β -celobiosidasa y β -glucosidasa —implicadas en la hidrólisis de celulosa— por una parte, y hemicelulasa y xilanasas, por otra, están ampliamente distribuidas entre los protozoos del rumen, se continúa especulando si su acción puede ser debida, al menos en parte, a las bacterias que contienen.

3. Bacterias

A pesar del papel de las poblaciones protozoaria y fúngica del rumen en la digestión de la pared celular vegetal, parece claro que son las bacterias los microorganismos más activamente implicados en este proceso, tanto cualitativamente, por su alta actividad enzimática, como a nivel cuantitativo, por la magnitud de su repercusión debida a su elevada concentración en el rumen.

Las tres especies bacterianas celulolíticas predominantes, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* y *R. albus*, tienen características peculiares que las diferencian de otras especies que pueden estar también implicadas en el proceso de digestión de la pared celular vegetal. Algunas, como *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Clostridium locheadii*, *Cl. longisporum* o *Eubacterium cellulosolvens* pueden considerarse también celulolíticas, pero su importancia en la digestión de la pared celular es secundaria, en el caso de las tres últimas, por su escasa concentración en el rumen. Tanto *B. fibrisolvens*. Akin, D y Rigsby, L (1985). Como *Cl. longisporum* carecen de estructuras de adhesión de tipo celulosoma, limitándose en gran medida su capacidad de digestión del substrato. Además, es necesario considerar otras especies no celulolíticas que utilizan productos resultantes de la hidrólisis de las paredes vegetales, que pueden contribuir a evitar efectos de retroinhibición enzimática por acúmulo de catabolitos en el medio y a su vez aportar nutrientes esenciales (amoníaco, ácidos grasos ramificados) a las bacterias más activamente implicadas.

A partir de estudios con protozoos cultivados in vitro, tratados con antibióticos para eliminar la posible contaminación bacteriana, se ha observado que la celulosa cristalina (avicel) es degradada en un 30% por protozoos de los géneros *Eudiplodinium* y *Polyplastron*, y en un 10% por *Epidinium*. Jouany, J. (1994). La capacidad de degradar celulosas sustituidas (hexaetilcelulosa, carboximetilcelulosa), es mayor para todos los géneros, siendo más limitada en *Entodinium* e *Isotricha*.

Sin embargo, el crecimiento en medios que incluyen polisacáridos estructurales como única fuente de energía respecto a un medio sin substrato es muy variable, y sólo *Eudiplodinium* y *Epidinium* responden positivamente a la incorporación de una fuente de celulosa o de xilano.

Entre los Ophryoscolecidos, los protozoos de los géneros *Eudiplodinium*, *Polyplastron* y *Epidinium* son activos degradadores de xilano, utilizándolo como fuente de nutrientes, y degradan celulosas sustituidas con bajo grado de cristalinidad, aunque no son capaces de utilizar los productos de su hidrólisis. Sólo los dos primeros géneros mencionados son capaces de digerir y utilizar celulosa cristalina.

Los protozoos del género *Entodinium* no son capaces de actuar frente a este tipo de substratos, mientras que los protozoos del género *Isotricha* tienen cierta actividad β - glucanasa, pero no utilizan los productos de la hidrólisis para su crecimiento .Williams,A.(1988).

La capacidad de depolimerizar pectina está presente en algunas especies de protozoos, pero la posibilidad de utilizar los productos liberados como fuente de energía es mínima. Orpin,C.(1983).

C. FACTORES QUE INCIDEN EN LOS PROCESOS DE DIGESTIÓN MICROBIANA DE LOS FORRAJES

Los forrajes, tanto los tropicales como los de clima templado, difieren entre sí en la estructura y composición de su pared celular, dependiendo de su especie vegetal, parte anatómica y fase de desarrollo .En el mismo sentido, la estructura de la pared celular vegetal es muy compleja y variable, tanto química como histológicamente. Todas estas diferencias condicionan el modo de ataque microbiano a los polisacáridos estructurales, y en último término, el ritmo y extensión de la degradación por los microorganismos ruminales. De hecho, el ritmo de digestión de la celulosa de los forrajes por la población ruminal es muy inferior a la observada in vitro sobre celulosa purificada.

Mientras el floema y el mesófilo de las hojas, el parénquima de los tallos de gramíneas y leguminosas inmaduras, y el floema de las gramíneas inmaduras, se degradan rápidamente, en algunos casos en menos de 12 horas de incubación,

otros tejidos vegetales presentan resistencia a la degradación. Los residuos de degradación microbiana de hojas incluyen una elevada proporción de esclerénquima y xilema, y los de tallos de xilema, en caso de las leguminosas, y de epidermis, esclerénquima y xilema en gramíneas. Como indican Akin,D y Rigsby,L (1985), el mesófilo es rápidamente degradado por las bacterias ruminales sin precisar adhesión, mediante una acción enzimática extracelular, mientras que la epidermis y las vainas de los paquetes parenquimatosos precisan una íntima adhesión de las principales especies fibrolíticas. La resistencia de estos tejidos a su degradación se debe tanto a su estructura anatómica como a su composición química.

La lignificación de la planta es uno de los factores que más afecta a la degradación microbiana de los forrajes, tanto por su indigestibilidad per se como en cuanto a su relación con las cadenas de hemicelulosas. El carácter hidrofóbico de la lignina acentúa el proceso de deshidratación de la pared celular a medida que aumenta la edad de la planta, lo que disminuye la accesibilidad de los polisacáridos estructurales. Además, una considerable proporción de las unidades de arabinosa de las cadenas laterales de xilanos están esterificadas con ácidos p-cumárico y ferúlico [en paja de cebada, 2,9 y 6,7 %, respectivamente, que establecen enlaces con las cadenas de lignina. Aunque estos compuestos fenólicos, especialmente el ácido p-cumárico, son tóxicos para la población microbiana ruminal su concentración en el contenido rumen es probablemente insuficiente para generar este efecto. No obstante, su solubilización a partir de las paredes celulares pudiera provocar en las zonas de activa degradación una concentración de fenoles próxima a los niveles tóxicos, por lo que pueden inhibir, o al menos ralentizar, la actividad fibrolítica bacteriana. Fondevila,M.(1994)

D. ADITIVOS MICROBIANOS

En los últimos años las investigaciones en nutrición animal se encaminan a optimizar la eficiencia productiva del ganado mediante la manipulación del ecosistema microbiano que habita en el tracto gastrointestinal de estos animales Galindo,J.(1988). En este sentido, una de las vías más explotadas es el uso de aditivos, dentro de éstos se estudian un gran número de sustancias: antibióticos, ácidos orgánicos, extractos vegetales y enzimas. Los primeros estudios con

aditivos microbianos se enfocaron en experimentos in vivo, y las limitadas investigaciones in vitro comprendían la enumeración de bacterias ruminales y estudios de desaparición de la MS in vitro. Este tipo de experimentos proveían alguna información acerca de cambios en las poblaciones bacterianas del rumen, pero no se dirigían adecuadamente al metabolismo microbiano. Sin embargo, a finales de la década de los 80 e inicio de los 90, se condujeron numerosos estudios con el propósito de evaluar el efecto de aditivos microbianos en la fermentación de la mezcla de microorganismos ruminales in vitro.

La creciente preocupación por el uso de antibióticos y otras sustancias utilizadas como aditivos en la alimentación de los animales, ha despertado el interés por el estudio de los aditivos de origen microbiano. Kamra,D. y Agawal,N.(2004).

Para la elaboración de aditivos microbianos, se han estudiado varios microorganismos como posibles candidatos. Con la adición de algunos de estos microorganismos se demostró un incremento de las bacterias totales, celulolíticas y hongos del rumen. Wiedmeier,R. (1987), y los incrementos en la digestibilidad de alimentos

Estos compuestos provocan modificaciones de los procesos digestivos y metabólicos de los animales, que se traducen en aumentos de la eficiencia de utilización de los alimentos.

La terminología asociada con la incorporación de cultivos de microorganismos a las dietas de rumiantes es inconsistente y a la vez confusa. El término probiótico se definió como “un suplemento alimenticio microbiano vivo, con efecto beneficioso para el animal hospedero, que mejora el balance microbiano intestinal” .Fuller,R.(1989), señala utiliza el término probiótico para referirse a “recuentos de bacterias viables ácido lácticas, seleccionadas y concentradas” (*Lactobacillus*, *Streptococcus*). En 1989 la US FDA (*Food and Drug Administration*),propuso a los fabricantes que utilicen el término aditivo microbiano (o DMF, direct fed-microbial) en lugar de probiótico, y lo define como una fuente de microorganismos viables, que existen naturalmente y que incluye bacterias, hongos y levaduras.

Los microorganismos que se emplean como aditivos microbianos en la alimentación de animales rumiantes son enumerados por Kamra,D.N. y Agawal,N.(2004). y se agrupan en cuatro grupos fundamentales: 1) Bacterias y

hongos de origen ruminal, 2) Bacterias ácido lácticas de origen no ruminal, 3) Otras bacterias de origen no ruminal y 4) Hongos y levaduras de origen no ruminal.

Los aditivos microbianos, de uso más difundido en las dietas de rumiantes consisten en extractos de la fermentación de *Aspergillus oryzae* y cultivos de *Saccharomyces cerevisiae*, o ambos. Marty, R. (1992).

1. Aditivos microbianos de origen ruminal

En el caso de los microorganismos aislados del ecosistema ruminal se plantea que son capaces de secretar enzimas fibrolíticas muy activas, en comparación con las secretadas por microorganismos aerobios. De esta forma, los anaerobios del rumen han ganado popularidad en la manipulación ruminal para incrementar la degradabilidad de la fibra .Se plantea además, que los rumiantes salvajes, presentan una microbiota más eficiente en comparación con los rumiantes domésticos.

Algunos de los principales resultados que se obtuvieron con el empleo de microorganismos ruminales como aditivo son, el incremento de los niveles de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), y la disminución de la proporción acetato:propionato, tras la adición de *Piromyces* sps. aislados de las heces de antilope (*Baselophus tragocamelus*) a búfalos. Con la adición de este hongo aumentaron la actividad enzimática del contenido ruminal y el número de bacterias totales, celulolíticas y hongos. Se observaron también incrementos en la digestibilidad del alimento con cepas de los hongos ruminales *Piromyces* sps y del género *Orpinomyces* y de la bacteria celulolítica *Ruminococcus* sp. aislada de las heces de Chinkara (*Gazella gazella*).

En estudios recientes, Marrero, Y, *et al.* (2005), aislaron 24 cepas de levaduras en el rumen. Las levaduras no pertenecen a este ecosistema, sin embargo, llegan al rumen a través de los alimentos y pueden crecer por cortos períodos de tiempo, debido a que se depositan en este órgano con nutrientes o tejidos procedentes del medio exterior y en ocasiones son capaces de utilizar algunos de los recursos de su nuevo hábitat. Marrero, Y.(2005), evaluaron mediante la técnica de producción de gas *in vitro*, la capacidad de las cepas aisladas para estimular la fermentación ruminal.

2. Aditivos microbianos bacterianos

Las bacterias como aditivo microbiano, se emplearon inicialmente por sus efectos

post ruminales beneficiosos, basados en el mantenimiento del equilibrio de la microbiota del tracto digestivo, limitando la proliferación de especies potencialmente patógenas. Sin embargo, ciertos aditivos microbianos de origen bacteriano pueden además, mejorar las funciones ruminales, la ganancia de peso y la producción de leche. La acción de estos microorganismos a nivel ruminal tiene efectos diferentes a los que ocurren en el tracto post-ruminal o en los animales monogástricos, pues, generalmente, los aditivos microbianos en el rumen, actúan en la composición de la población microbiana y su actividad. Dentro de las bacterias que se utilizan en la alimentación de rumiantes encontramos algunas aisladas del rumen y otras de origen no ruminal pertenecientes fundamentalmente a los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Bacillus* y *Propionibacteriu*, Kamra y Agawal (2004).

Martínez, J. et. al. (1995), indican que las bacterias pertenecientes al género *Lactobacillus* se encuentran dentro de las más estudiadas como aditivos microbianos en rumiantes. Con la adición de *L. acidophilus* a la dieta de estos animales se observó un aumento en la ganancia de peso, el consumo de materia seca, la digestibilidad del alimento y la eficiencia de conversión alimentaria. Existen productos basados en este tipo de bacterias que han sido evaluados en rumiantes. Tal es el caso de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus rhamnosus* con los que se encontró un aumento en la ganancia de peso y en la producción de leche así como, mayor contenido de proteína y grasa. Reyes, J, et al. (2005), al evaluar estos mismos microorganismos encontraron que las vacas que los consumieron produjeron más leche, y con mayor contenido de proteínas y sólidos no grasos.

E. LAS LEVADURAS

Se conoce que las levaduras viables o sus hidrolizados son capaces de producir en los animales domésticos, rumiantes efectos probióticos. Dentro de las sustancias consideradas con una actividad probiótica activa se encuentran algunos de los componentes estructurales de la pared de las levaduras; encontrándose entre las fuentes más abundantes cepas pertenecientes a la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Estos polisacáridos y sus productos de hidrólisis producen sus efectos probióticos, principalmente, mediante el estímulo a la respuesta inmunológica y la prevención de enfermedades infecciosas en

animales y el hombre. Lila, Z, et al. (2005).

Las levaduras, son capaces de destruir bacterias patógenas, debido a la habilidad que poseen de ligar estos microbios a sus paredes celulares o de unirse a los sitios receptores de patógenos al nivel de la mucosa intestinal .Dawson,K,et al,(1990).Se ha comprobado experimentalmente que los oligosacáridos de manosa derivados de la hidrólisis de paredes celulares de levaduras son capaces de reducir la adherencia de muchas bacterias a la mucosa intestinal y ejercer un efecto inmuno estimulante .

1. Saccharomyces cerevisiae

Los cultivos de levaduras basadas en el *Saccharomyces cerevisiae* se utilizan extensamente en dietas del rumiante. Los productos disponibles varían ampliamente ya sea en la cepa utilizada de *S. cerevisiae* y en el número y la viabilidad de las células de la levadura presentes.

El origen de *Saccharomyces* es una cuestión controvertida, ya que existen dos teorías. La primera defiende que las uvas dañadas (por hongos, exceso de agua, pájaros, insectos, etc.), sirven de "depósito" para microorganismos, entre los que se incluye *Saccharomyces cerevisiae*, y que por tanto, estas uvas son la principal fuente de levaduras en las fermentaciones espontáneas. La forma en que estos microorganismos llegan a estas uvas se cree que se debe principalmente a los insectos. La segunda teoría apuesta porque su principal procedencia es el ambiente de bodega (superficies del equipamiento de bodega: bombas, tuberías, depósitos de fermentación etc.), aunque no descarta una presencia minoritaria de *S. cerevisiae* en las uvas.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un hongo ascomiceto unicelular. Los hongos son organismos eucarióticos (sus células tienen una organización interna en orgánulos membranosos), quimioheterótrofos. A continuación vamos a explicar el concepto de quimioheterótrofo y a describir los principales grupos de hongos.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es objeto de numerosas investigaciones, en las que se demostró su acción en la estabilización del pH ruminal Abd El-Ghani,A.(2004), y el incremento en las bacterias celulolíticas y aumentos en la digestión de la MS, la FDN, la producción de AGCC totales y de propionato y la digestión de proteínas .En un intento por probar otras especies de *Sacharomyces*, Oeztuerk evaluaron el efecto de *Saccharomyces boulardii* en el metabolismo ruminal y concluyeron que la levadura era digerida por los microorganismos del

rumen por lo que era más utilizada como prebiótico que como aditivo microbiano. Las levaduras en la alimentación de rumiantes se utilizaron mucho antes de la década de los 50, cuando la biomasa de levadura como subproducto de la industria del alcohol fue utilizada como fuente de proteína. Desde esta época hasta la fecha se llevan a cabo numerosos estudios que evalúan el efecto de este microorganismo como aditivo en la dieta de los rumiantes.

Otro de los efectos de estos aditivos microbianos es su acción en la estabilización del pH ruminal .Abd El-Ghani,A.(2004), lo que favorece el desarrollo de bacterias celulolíticas. Existen dos efectos de la levadura que pudieran contribuir a la estabilización del pH, uno de ellos es la inhibición del crecimiento de bacterias productoras de ácido láctico .Girard,D, et al. (1993) ,y el otro la estimulación del crecimiento de bacterias que utilizan ácido láctico como *Selenomonas ruminantium* Los estudios realizados indican que se estimula la producción de AGCC Sin embargo, las levaduras producen una disminución de la relación acético/propiónico como consecuencia de un aumento en la concentración de propiónico El aumento en las concentraciones de AGCC totales con la adición de estos aditivos microbianos, indica que hubo una mayor utilización del sustrato y por tanto su empleo podría mejorar la eficiencia de producción de los animales a los cuales se les suministre.

2. Levica 25

La cepa de levadura LEVICA 25 resultó ser la más promisoría para su empleo como activadora de la fermentación ruminal de un cepario de 24 cepas aisladas en el rumen. Esta cepa produjo 15% más de gas en fermentaciones in vitro con *Cynodon nlemfuensis* en relación al resto de las aisladas y además ejerció efectos activadores más prolongados en las poblaciones fúngicas y de bacterias totales y celulolíticas cuando se comparó con la cepa *Saccharomyces cerevisiae* L/25-7-13, en vacas que consumen dietas fibrosas. Galindo,J,et al.(2003)

F. FORMACION DEL METANO EN EL RUMEN

La fermentación microbiana que ocurre en el rumen transforma los carbohidratos, proteínas y glicerol a acetato, dióxido de carbono y amoníaco, produciéndose además metano, propionato y butirato como resultado de reacciones de transferencia de protones y electrones. El metano es un producto de desecho nutricional y puede representar entre el 2 y 12 % de la energía bruta consumida

por el animal

La producción de metano en el rumen tiene un efecto significativo en los productos finales de la fermentación. Las bajas presiones parciales de hidrógeno creadas por los metanógenos causan un cambio termodinámico en la producción de este elemento por los microorganismos fermentativos en un proceso de transferencia interespecífica de hidrógeno lo que resulta en la producción de H₂ y acetato como principales.

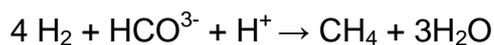
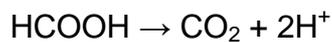
La metanogénesis es la formación de [metano](#) por [microbios](#). Es una forma de metabolismo microbiano muy importante y extendida. En la mayoría de los entornos, es el paso final de la descomposición de la [biomasa](#). Recientemente se ha demostrado que el tejido de las [hojas](#) de las plantas vivas emite metano. Aunque el mecanismo por el que ocurre esta producción de metano es, hasta ahora, desconocido, las implicaciones son grandes; es un ejemplo de metanogénesis en organismos no microbianos, supuestamente en condiciones [aeróbicas](#).

La metanogénesis es el paso final en la [descomposición](#) de la materia orgánica en condiciones anaeróbicas. Durante el proceso de descomposición, aceptores de electrones (como el [oxígeno](#), [hierro](#), [sulfato](#), [nitrato](#) y [manganeso](#)) , se [reducen](#), mientras que se acumulan [hidrógeno](#) (H₂), y [dióxido de carbono](#). También se acumulan compuestos orgánicos ligeros por [fermentación](#). Durante las fases avanzadas de la descomposición orgánica, todos los aceptores de electrones quedan reducidos excepto el dióxido de carbono. El dióxido de carbono es un producto de la mayoría de los procesos catabólicos, por lo que no se reduce como otros aceptores de electrones potenciales.

Solo la metanogénesis y la fermentación pueden darse en ausencia de aceptores de electrones distintos al carbono. La fermentación sólo permite la ruptura de compuestos orgánicos más grandes y produce compuestos orgánicos pequeños. La metanogénesis elimina con efectividad los productos casi finales de la descomposición: el hidrógeno, los compuestos orgánicos pequeños y el dióxido de carbono. Sin la metanogénesis se acumularía una gran cantidad de carbono (en forma de productos de la fermentación), en los ambientes anaeróbicos.

Para muchas bacterias metanogénicas el H₂ y CO₂ son los únicos sustratos que pueden utilizar. El H₂ que los metanógenos usan en la naturaleza, es generalmente un producto del metabolismo de la materia orgánica de otros anaerobios incluyendo bacterias, hongos y protozoos. Gran parte de los metanógenos que utilizan H₂ para reducir CO₂ a CH₄ pueden también utilizar formiato y entonces crecen en presencia de los dos sustratos.

Los cultivos puros de estos microorganismos producen H₂ de la oxidación de piruvato a acetil-CoA y CO₂. El formiato se considera un transportador esencial de electrones. Estos electrones se separan del formiato por la enzima formiato deshidrogenasa y se usan para reducir CO₂ a CH₄. Zinder, S. (1992).



De acuerdo con la estequiometría de la fermentación ruminal es posible calcular las producciones de metano, ácidos grasos de cadena corta (AGCC) , y ATP que se obtienen con diferentes raciones. Por cada mol de hexosa que se fermenta se producen 0,58 moles de metano (para el almidón y la celulosa pueden ser 162 g en peso seco).

Son organismos anaeróbios estrictos, y requieren condiciones libres de oxígeno y un potencial redox menor que -330mM. La mayoría tiene tiempos de duplicación que van desde varias horas a varios días.

El crecimiento de especies autótrofas se estimula por la adición de compuestos orgánicos como acetato, cisteína, vitaminas del complejo B, líquido de rumen o extracto de levadura. Las bacterias metanogénicas requieren además, sodio, hierro, cobalto, molibdeno y otros elementos trazas. Las condiciones redox se obtienen por la adición de sulfitos, cisteína o una combinación de ambos.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

A. LOCALIZACIÓN Y DURACIÓN DEL EXPERIMENTO

El experimento se efectuó en el Laboratorio de Microbiología del Rumen del Instituto de Ciencia Animal, el cual se encuentra ubicado en la Carretera Central Km. 47 ½, Municipio “San José de las Lajas”, Provincia La Habana, Cuba. El experimento de validación se efectuó en el Laboratorio de Biotecnología y Microbiología Animal de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo en la Facultad de Ciencias Pecuarias localizado en la Panamericana Sur Km ½.

Las condiciones meteorológicas en las zonas de estudio se resumen en el cuadro 1.

Cuadro 1. CONDICIONES METEOROLÓGICAS.

PARAMETROS	ICA – CUBA	ESPOCH – ECUADOR
Temperatura	26 °C	14 °C
Humedad	78%	60%
Vientos	15 km/h	22 km/h
Heliofania	11 horas	10 horas

Fuente: Estación Meteorológica ICA, (2008). FRN-ESPOCH, (2008).

La ejecución de la investigación en Cuba tuvo una duración de 120 días en su proceso de experimentación, mientras que la validación se realizó en un lapso de 30 días.

B. UNIDADES EXPERIMENTALES

Las unidades experimentales estuvieron conformadas por 4 botellas de vidrio de 100 mL selladas con tapón de butilo y agrafe, en las cuales se introdujo el líquido ruminal, pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*), y preparados de levaduras.

C. MATERIALES, EQUIPOS E INSTALACIONES

1. Materiales

- Dos búfalos canulados en rumen.

- Forraje verde de pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*).
- Preparados con levaduras viables.
- Botellas de cristal, Erlenmeyers.
- Pipetas, probetas, y otros utensilios de laboratorio.
- Tubos roll y tapones.

2. Equipos

- Balanza analítica.
- Baños de incubación.
- Incubadoras.
- Autoclave.
- Máquina sembradora de tubos roll.
- Computadora.
- Impresora.
- Cámara de Fotos.

3. Instalaciones

- Laboratorios.
- Comederos.
- Bebederos .

D. TRATAMIENTOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Los tratamientos fueron:

1. Pasto estrella (control).

2. Pasto estrella + *Saccharomyces cerevisiae*

3. Pasto estrella + LEVICA 25

El siguiente cuadro 2, muestra los tratamientos experimentales:

Cuadro 2. PREPARACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS EXPERIMENTALES.

TRATAMIENTO	Pasto estrella, g	Líquido rumen, g	Buffer, g	Preparado levadura, g	TOTAL
<i>Control</i>	0.2	4	16	-	20
<i>S. cerevisiae</i>	0.2	4	12	4	20
<i>Levica-25</i>	0.2	4	12	4	20

FUENTE: Castañeda, S. (2008).

El diseño experimental fue completamente al azar bifactorial 3 x 3 (3 tratamientos, 3 horas de muestreo). El siguiente cuadro 3, detalla el esquema del experimento.

Cuadro 3. ESQUEMA DEL EXPERIMENTO.

TRATAMIENTOS	HORAS	CÓDIGO	TUE	REPETICIONES	TOTAL
<i>Control</i>	8	C 8	1	4	4
	12	C 12	1	4	4
	24	C 24	1	4	4
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8	S 8	1	4	4
	12	S 12	1	4	4
	24	S 24	1	4	4
<i>Levica-25</i>	8	L 8	1	4	4
	12	L 12	1	4	4
	24	L 24	1	4	4
TOTAL BOTELLAS					36

Elaboración: Castañeda, S. (2008).

El experimento respondió al siguiente modelo matemático:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Variable en estudio

μ = Media poblacional

α_i = Efecto del factor A (Preparados de Levaduras)

β_j = Efecto del factor B (Horas de fermentación)

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Efecto de la interacción entre A y B

ε_{ij} = Efecto del error experimental

El tratamiento para la validación fue:

Para el tratamiento de la validación se utilizó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en reemplazo a Levica 25 ya que esta no existe en nuestro país porque es propiedad del ICA, además se utilizó como pasto la Alfalfa que es un alimento común de nuestra sierra ecuatoriana y el animal está adaptado a este pasto, además se utilizó la alfalfa ya que los animales canulados para la extracción del líquido ruminal se encuentran en la sierra y es más factible adaptarles a la alfalfa que a un pasto tropical. Alfalfa + *Saccharomyces cerevisiae*

El cuadro 4, muestra el procedimiento para la preparación del tratamiento experimental:

Cuadro 4. PREPARACIÓN DEL TRATAMIENTO EXPERIMENTAL PARA LA VALIDACIÓN.

Tratamiento	Alfalfa, g	Líqu. rumen	Buffer	Preparado levadura	TOTAL
Alfalfa + <i>S. cerevisiae</i>	0.2	4	12	4	20

Fuente: Castañeda, S. (2008).

El siguiente cuadro 5, nos detalla el esquema del experimento para la validación.

Cuadro 5. ESQUEMA DEL EXPERIMENTO PARA LA VALIDACIÓN.

TRATAMIENTO	Código	TUE	REPETICION	TOTAL
Alfalfa + <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SC ₂	4	1	4

Fuente: Castañeda, S. (2008).

E. MEDICIONES EXPERIMENTALES

- Población de metanógenos
- Producción de gas
- Producción de metano
- Bacterias celulolíticas
- Bacterias viables totales
- Protozoos
- Ph

F. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS Y PRUEBAS DE SIGNIFICANCIA

Los resultados experimentales fueron sometidos a los siguientes procedimientos:

- Análisis de Varianza (ADEVA).
- Separación de Promedios por el método de rango múltiple de Duncan a un nivel de significancia de $P < 0.05$ y $P < 0.01$. El siguiente cuadro 6, nos detalla el esquema del adeva.

Cuadro 6. ESQUEMA DEL ADEVA

Fuente de Variación	Grados de libertad
Total	35
Factor A	2
Factor B	2
Interacción AxB	4
Error	27

Fuente: Castañeda, S. (2008).

G. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

El experimento se condujo bajo condiciones *in Vitro*, para lo cual se utilizó la técnica de Theodorou, M, *et al.* (1994), y se utilizaron botellas de vidrio de 100 mL selladas con tapón de butilo y agrafe.

En cada botella se introdujo la mezcla integrada por líquido de rumen y solución buffer en una relación de una parte de líquido ruminal, tres partes de solución buffer, y para el control se introdujo la mezcla integrada por líquido de rumen y solución buffer en una relación de una parte de líquido ruminal, cuatro partes de solución buffer.

El inóculo ruminal se obtuvo a partir de dos búfalos canulados en rumen alimentados con una dieta de forraje de gramíneas sin suplementación adicional y libre acceso al agua.

La muestra de líquido ruminal se colectó a través de la cánula, con la ayuda de una bomba de vacío y se conservó en termos herméticamente cerrado hasta su traslado al laboratorio de microbiología y genética molecular del rumen, del Instituto de Ciencia Animal donde, posteriormente, se filtrarán a través de muselina. Para conformar la mezcla a fermentar, se utilizó el pool (licuado) de líquido ruminal de los búfalos con el propósito de eliminar el efecto animal.

1. Técnicas de cultivo y conteos de microorganismos

Se utilizó la técnica de cultivo de Hungate,R. (1970), en tubos roll y bajo condiciones de anaerobiosis estricta.

La siembra de bacterias viables totales, y celulolíticas se efectuó en los medios de cultivo de Caldwell,D.y Bryant,M. (1966), modificado por Galindo,J. (1988). Las bacterias metanogénicas se contaron por el mismo método; pero se utilizó una mezcla de hidrógeno y dióxido de carbono (60:40) en la fase gaseosa.

Los protozoos se preservaron en formol al 10% en una dilución 1:1 (v/v). Las muestras preservadas se guardaron en refrigerador a 4°C y se contaron, posteriormente, al microscopio óptico en cámara de Neubauer. Para ello los protozoos se tiñeron con una solución de violeta genciana al 0.01% en ácido acético glacial al 1%.

2. Preparación de la muestra del pasto

El alimento base para la fermentación es pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*). La misma se obtuvo a partir de un área sin pastorear del Instituto de Ciencia Animal. Para su preparación, se recolectaron hojas con sus pecíolos, de manera que semeje el bocado del animal. La muestra se secó en estufa a 60°C durante 48 horas. Luego se molió en molino hasta un tamaño de partículas de 1mm. Se conservó en frascos de cristal hasta su posterior utilización en el experimento.

Una muestra de aproximadamente 100 g se llevó al laboratorio de Química Analítica para determinar su composición bromatológica.

3. Obtención del preparado microbiano con *Saccharomyces cerevisiae* y Levica 25

Primeramente se preparó sendos pre inóculos, para lo cual se toman varias asas de cultivos en cuña de ambas levaduras con 24 horas de crecimiento y se disuelven en 10 mL de caldo extracto de malta. Se incubó a 30 °C durante 16 horas. El preparado que se utilizó en el experimento se obtuvo después de inocular los 10 mL anteriormente obtenidos en 100 mL de caldo extracto de malta. De igual manera, se colocaron en la incubadora a 30° C durante 16 horas. Se obtuvieron dos preparados microbianos, los que corresponden a sendas levaduras con una concentración inicial de células de 1×10^7 cel/mL.

H. METODOLOGIA DE EVALUACION

1. Población de metanógenos

Se utilizó la técnica de cultivo de Hungate,R. (1970), en tubos roll y bajo condiciones de anaerobiosis estricta. Las bacterias metanogénicas se contaron por el mismo método; pero se utilizó una mezcla de hidrógeno y dióxido de carbono (60:40) en la fase gaseosa.

2. Producción de gas

Para desarrollar el experimento se utilizó la técnica de producción de gas in vitro Theodorou.M, et al, (1994). Las incubaciones se llevaron a cabo en botellas de vidrio de 50 mL selladas con tapón de butilo y agrafe. Éstas se colocaron en baño con agitación mecánica (120 rpm) y temperatura controlada a 39oC. El gas se midió por el desplazamiento del embolo de una jeringuilla de 10 mL después de puncionar el tapón.

3. Bacterias celulolíticas y bacterias viables totales

Se utilizó la técnica de cultivo de Hungate, R. (1970), en tubos roll y bajo condiciones de anaerobiosis estricta. La siembra de bacterias viables totales, y celulolíticas se efectuó en los medios de cultivo de Caldwell,D. y Bryant,M. (1966).

Los conteos de colonias se realizaron mediante el número más probable (NMP). El número de unidades formadoras de colonia (ufc) y de talo (uft), se determinó, bajo lupa, por conteo visual de aparición de las colonias en los tubos roll.

4. Protozoos

Los protozoos se contaron al microscopio óptico en cámara de Neubauer. Para ello los protozoos se tiñeron con una solución de violeta genciana al 0.01% en ácido acético glacial al 1%.

5. Ph

Esta variable se evaluó mediante el pHmetro que nos ayudara a medir el pH de la muestra evaluada.

preparado microbiano a base de *Saccharomyces cerevisiae* en la validación en Ecuador, fue menor a medida que se incrementa el tiempo de fermentación, es así que a partir de un pH 6.80 a las 8 horas se obtuvo un pH de 6.25 a las 24 horas de fermentación.

Esta característica esta directamente relacionada a los efectos de aditivos microbianos cuya acción principal es la estabilización del pH ruminal. Abd El-Ghani, A.A. (2004), lo que favorece el desarrollo de bacterias celulolíticas. Existiendo dos efectos de la levadura que pudieran contribuir a la estabilización del pH, uno de ellos es la inhibición del crecimiento de bacterias productoras de ácido láctico. Girard, D. et al. (1993) y el otro la estimulación del crecimiento de bacterias que utilizan ácido láctico como *Selenomonas ruminantium*. Kamra, D. et al. (2004).

2. Producción de gas total

En cuanto a la producción de gas total se registró diferencias significativas ($P < 0.01$), dentro de los tratamientos de cada uno de los factores en estudio, por lo que se exponen los siguientes resultados:

Al comparar los promedios en cuanto a producción de gas total, en función al tipo de tratamientos dentro de cada hora de evaluación, se determinó diferencias estadísticas ($P < 0.01$), con diferentes comportamientos en la producción de gas total dentro de cada periodo de tiempo evaluado, de esta manera se determinó que a las 8 horas de evaluación se obtuvo el mayor promedio de producción de gas con el tratamiento control con 43.30 ml/g de materia seca, seguido por el tratamiento a base de *Saccharomyces cerevisiae* en el cual se presentó una producción de gas total de 30.30 ml/g de materia seca, finalmente y en un menor promedio se encuentra el tratamiento a base de *Levica 25* con 20.50 ml/g de materia seca, cuadro 8, grafico 1.

Dentro de las 12 horas de evaluación, la producción de gas total obtenida mediante la incorporación de levaduras *in vitro* y el tratamiento control difieren estadísticamente entre sí, siendo superior la producción de gas con el tratamiento control alcanzando un promedio de 62.13 ml/g de materia seca, seguida por los promedios más bajos obtenidos mediante la utilización *in vitro* de *Saccharomyces cerevisiae* y *Levica 25* con 45.50 y 25.33 ml/g de materia seca respectivamente, cuadro 8, grafico 1.

Finalmente a las 24 horas de evaluación, existe un comportamiento similar a las

comparaciones anteriormente realizadas, determinándose los mayores promedios mediante los tratamientos control y la utilización de *Saccharomyces cerevisiae* con 95.00 y 71.55 ml/g de materia seca respectivamente, por otro lado el grupo a base de *Levica 25* con 42.55 ml/g de materia seca presentó el promedio más bajo de entre los tres tratamientos, cuadro 8, gráfico 1.

Al comparar los promedios en cuanto a la producción de gas total en función a las horas de evaluación dentro de cada tipo de levadura y grupo control, se determinó diferencias estadísticas ($P < 0.01$), con diferentes comportamientos dentro de cada tipo de levadura evaluada, de esta manera al comparar la producción de gas total dentro del grupo control, se determinó el mayor promedio a las 24 horas con 95.00 ml/g de materia seca, seguido por producciones más bajas de gas total obtenidas a las 12 y 8 horas de evaluación en las cuales se determinaron producciones de 62.12 y 43.30 ml/g de materia seca respectivamente, cuadro 8, grafico 1.

Por su parte mediante la incorporación *in vitro* de *Saccharomyces cerevisiae*, la producción de gas total difiere estadísticamente en los periodos de tiempo evaluados, siendo superior la producción de gas total a las 24 horas alcanzando un promedio de 71.55 ml/g de materia seca, seguida por los promedios obtenidos a las 12 y 8 horas de evaluación con promedios de 45.50 y 30.30 ml/g de materia seca respectivamente, lo cual indica un incremento en la producción de gas total a medida que transcurre el tiempo, cuadro 8, grafico 1.

De igual manera y con el mismo comportamiento señalado anteriormente, mediante la incorporación *in vitro* de *Levica 25* se de

Cuadro 8. EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS Y FERMENTATIVAS, ANTE EL EFECTO DE PREPARADOS MICROBIANOS CON LEVADURAS VIABLES SOBRE LA METANOGÉNESIS RUMINAL “IN VITRO”, DE ACUERDO AL TRATAMIENTO Y TIEMPO DE FERMENTACIÓN.

VARIABLES	TRATAMIENTOS DE ACUERDO AL TIEMPO									\bar{X}	Prob.	CV (%)
	8 Horas			12 Horas			24 Horas					
	C	S	L	C	S	L	C	S	L			
Densidad de Bacterias Viables Totales, 1×10^{11} UFC/mL	72,00 a	66,00 b	18,00 c	112,95 a	78,50 b	69,50 c	264,25 a	169,50 b	126,0 c	108,52	0.0001**	1,43
Densidad de Bacterias Celulolíticas, 1×10^4 UFC/mL	26,00 c	27,00 b	30,00 a	14,00 c	30,00 b	42,50 a	13,50 c	37,25 b	64,50 a	31,64	0.0001**	3,32
Densidad de Bacterias Metanogénicas, 1×10^9 UFC/mL	81,00 a	72,50 b	66,53 c	112,00 a	54,53 b	43,03 c	300,00 a	48,48 b	39,25 c	90,81	0.0001**	2,25
Densidad de Protozoarios, 1×10^5 especímenes/mL	19,13 a	16,50 b	14,88 c	21,50 a	14,50 b	12,63 c	34,88 a	11,25 b	6,88 c	16,90	0.0001**	6,61
Producción de Gas Total, mL/g de MS	43,30 a	30,30 b	20,50 c	62,13 a	45,50 b	25,33 c	95,00 a	71,55 b	42,55 c	48,46	0.0001**	3,41
Producción de Gas Metano, μ L	9,25 a	8,25 b	6,75 c	10,50 a	7,75 b	4,50 c	11,50 a	4,75 b	3,00 c	7,36	0.0001**	6,60

VARIABLES	TIEMPO DE FERMENTACIÓN DE ACUERDO AL TRATAMIENTO									\bar{X}	Prob.	CV (%)
	Control			<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			<i>Levica 25</i>					
	8	12	24	8	12	24	8	12	24			
Densidad de Bacterias Viables Totales, 1×10^{11} UFC/mL	72,00 c	112,95 b	264,25 a	66,00 c	78,50 b	169,50 a	18,00 c	69,50 b	126,00 a	108,52	0.0001**	1,43
Densidad de Bacterias Celulolíticas, 1×10^4 UFC/mL	26,00 a	14,00 b	13,50 b	27,00 c	30,00 b	37,25 a	30,00 c	42,50 b	64,50 a	31,64	0.0001**	3,32
Densidad de Bacterias Metanogénicas, 1×10^9 UFC/mL	81,00 c	112,00 b	300,00 a	72,50 a	54,53 b	48,48 c	66,53 a	43,03 b	39,25 c	90,81	0.0001**	2,25
Densidad de Protozoarios, 1×10^5 especímenes/mL	19,13 c	21,50 b	34,88 a	16,50 a	14,50 b	11,25 c	14,88 a	12,63 b	6,88 c	16,90	0,0128*	6,61
Producción de Gas Total, mL/g de MS	43,30 c	62,13 b	95,00 a	30,30 c	45,50 b	71,55 a	20,50 c	25,33 b	42,55 a	48,46	0.0001**	3,41
Producción de Gas Metano, μ L	9,25 c	10,50 b	11,50 a	8,25 a	7,75 a	4,75 b	6,75 a	4,50 b	3,00 c	7,36	0.0006**	6,60

Fuente: Castañeda, S. (2008).

C: Control SS: *Saccharomyces cerevisiae* L: *Levica 25*

Letras iguales no difieren estadísticamente. Según Duncan (P<0.05 y P<0.01).

Prob: Probabilidad.

CV (%): Porcentaje de Coeficiente de Variación.

X: Media General.

**.: Diferencia altamente significativa entre promedios. *: Diferencia significativa entre promedios. ns: Diferencia no significativa entre promedios.

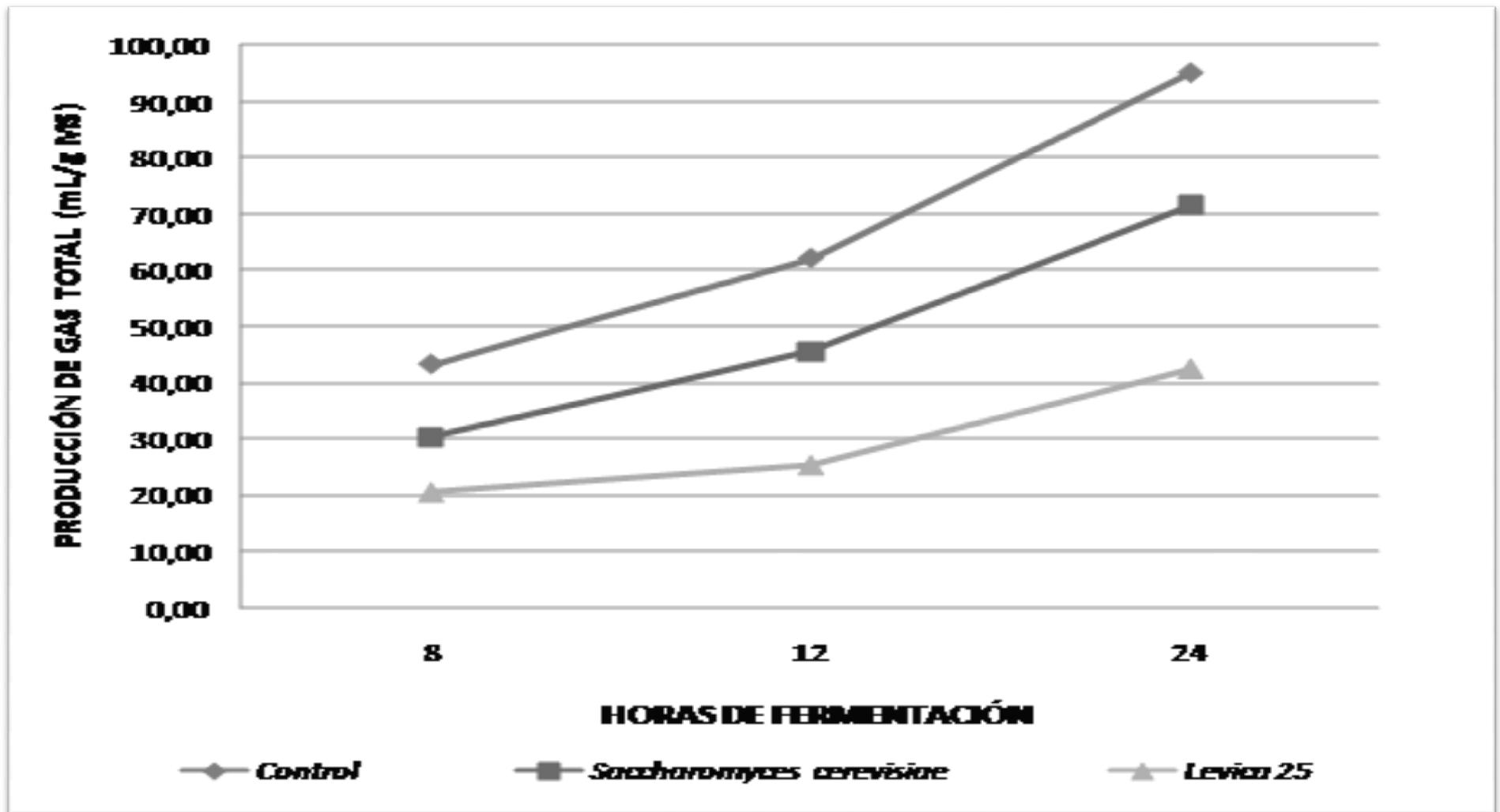


Gráfico 1. Comportamiento de la producción de gas total *in vitro* por efecto de la utilización de preparados microbianos con levaduras viables.

terminaron diferencias estadísticas, es así que a las 24 horas de evaluación se determinó el mayor promedio con 42.55 ml/g de materia seca de gas total, seguido por las 12 y 8 horas de evaluación donde se determinaron promedios de producción de gas total de 25.33 y 20.50 ml/g de materia seca, respectivamente, cuadro 8.

Los resultados obtenidos en cada una de las horas evaluadas en los diferentes tratamientos demuestran la marcada disminución de gas metano que compone gran parte de la producción de gas total, considerando lo expuesto por Marrero, Y. (2006) *et. al* quienes determinaron que esta levadura es capaz de activar la población microbiana ruminal y reducir la producción de Metano, destacando a LEVICA 25 que puede producir potencialmente efectos superiores a la *Saccharomyces cerevisiae* por lo que en la presente investigación se obtuvieron efectos similares a los expuestos por el mencionado autor.

3. Producción de gas metano

En cuanto a la producción de gas metano se registró diferencias significativas ($P < 0.01$), dentro de los tratamientos de cada uno de los factores en estudio, por lo que se exponen los siguientes resultados:

En cuanto a producción de gas metano, en función al tipo de tratamientos dentro de cada hora de evaluación, se determinó diferencias estadísticas ($P < 0.01$), con diferentes comportamientos en la producción de gas metano dentro de cada periodo de tiempo evaluado, de esta manera se determinó que a las 8 horas de evaluación se obtuvo el mayor promedio de producción de gas metano con el tratamiento control con 9.25 μL , seguido por el tratamiento a base de *Saccharomyces cerevisiae* en el cual se presentó una producción de gas metano de 8.25 μL , finalmente y en un menor promedio se encuentra el tratamiento a base de *Levica 25* con 6.75 μL , cuadro 8, grafico 2.

Dentro de las 12 horas de evaluación, la producción de gas metano obtenida mediante la incorporación de levaduras *in vitro* y el tratamiento control presentan diferencias estadísticas, siendo superior la producción de gas con el tratamiento control alcanzando un promedio de 10.50 μL , seguida por los promedios más bajos obtenidos mediante la utilización *in vitro* de *Saccharomyces cerevisiae* y *Levica 25* con 7.75 y 4.50 μL respectivamente, cuadro 8, grafico 2.

Finalmente a las 24 horas de evaluación, existe un comportamiento similar a las

comparaciones anteriormente realizadas, determinándose los mayores promedios mediante los tratamientos control y la utilización de *Saccharomyces cerevisiae* con 11.50 y 4.75 μL respectivamente, por otro lado el grupo a base de *Levica 25* con 3.00 μL siendo el promedio más bajo en cuanto a producción de gas metano, cuadro 8, grafico 2.

Al comparar los promedios en cuanto a la producción de gas metano en función a las horas de evaluación dentro de cada tipo de levadura y grupo control, se determinó diferencias estadísticas ($P < 0.01$), con diferentes comportamientos dentro de cada tipo de levadura evaluada, de esta manera al comparar la producción de gas metano dentro del grupo control, se determinó el mayor promedio a las 24 horas con 11.50 μL , seguido por producciones más bajas de gas metano obtenidas a las 12 y 8 horas de evaluación en las cuales se determinó producciones de 10.50 y 9.25 μL respectivamente, cuadro 8, grafico 2.

Por su parte mediante la incorporación *in vitro* de *Saccharomyces cerevisiae*, la producción de gas metano difiere estadísticamente en los periodos de tiempo evaluados, siendo superior la producción de gas metano a las 8 horas alcanzando un promedio de 8.25 μL , seguida por los promedios obtenidos a las 12 y 24 horas de evaluación con promedios más bajos de 7.75 y 4.75 μL respectivamente, lo cual indica una reducción de producción de gas metano a medida que transcurre el tiempo, cuadro 8, grafico 2.

De igual manera y con el mismo comportamiento señalado anteriormente, mediante la incorporación *in vitro* de *Levica 25* se determinaron diferencias estadísticas, es así que a las 24 horas de evaluación se determinó el promedio más bajo con 3.00 μL de gas total, en donde los mayores promedios de producción de gas metano se obtuvieron a las 12 y 8 horas de evaluación con 4.50 y 6.75 μL , respectivamente, cuadro 8, grafico 2.

Los resultados obtenidos con los preparados microbianos se hallan relacionados a lo descrito por Hungate, R. (1970), quien informó que los metanógenos que viven en el interior o adheridos a la superficie de los protozoos ciliados del rumen, son responsables de más del 37% de las emisiones de metano.

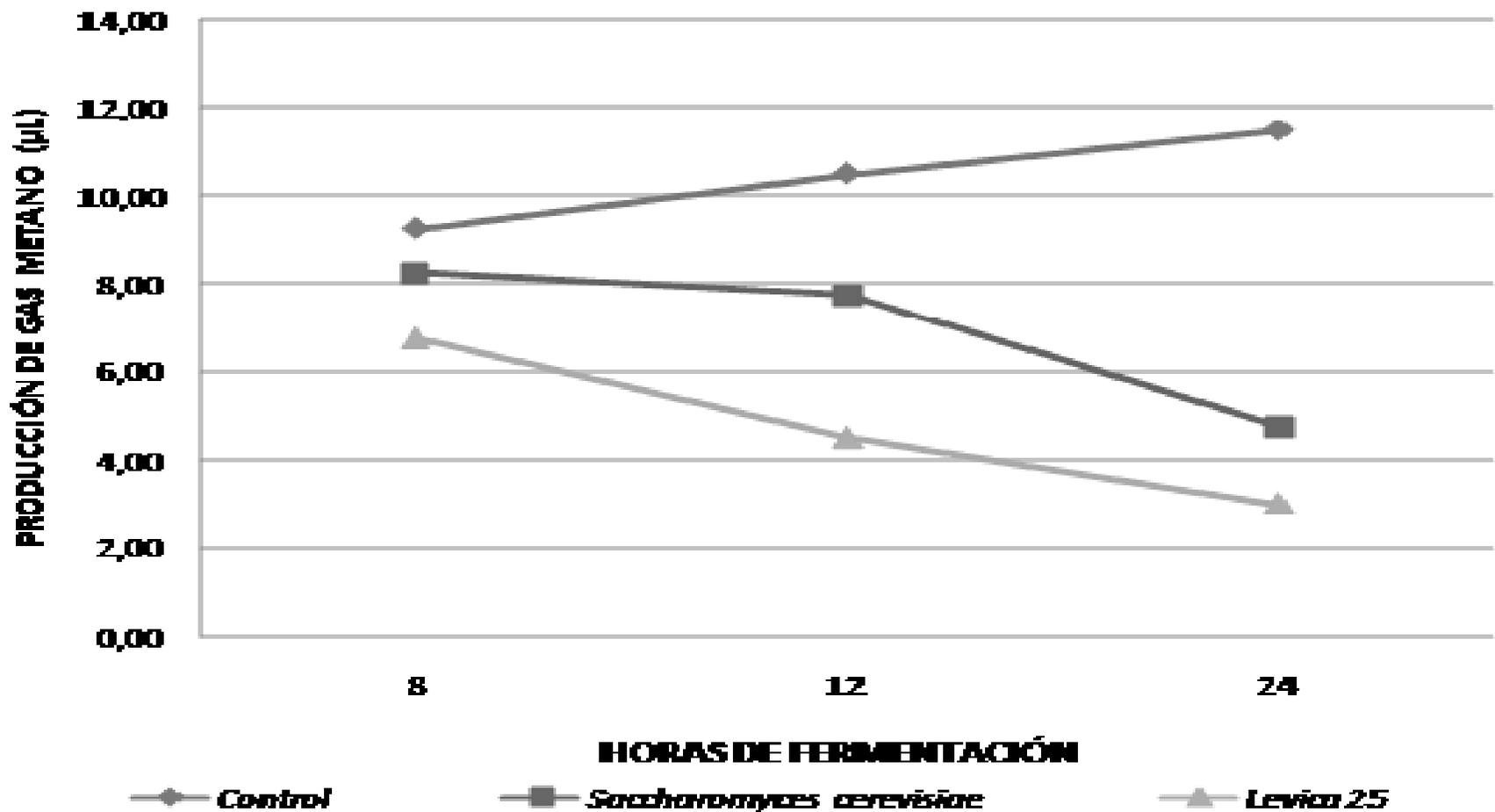


Gráfico 2. Comportamiento de la producción de gas metano *in vitro* por efecto de la utilización de preparados microbianos con levaduras viables.

B. EFECTO DE PREPARADOS MICROBIANOS CON LEVADURAS VIABLES EN LA POBLACIÓN MICROBIOLÓGICA RUMINAL *IN VITRO*

1. Población de bacterias viables totales

La densidad de bacterias viables totales registró diferencias significativas ($P < 0.01$), dentro de los tratamientos de cada uno de los factores en estudio, por lo que se exponen los siguientes resultados:

Al comparar los promedios de la densidad de bacterias viables totales, en función a los tratamientos dentro de cada hora de evaluación, se determinó diferencias estadísticas ($P < 0.01$), con diferentes comportamientos en la densidad de bacterias viables totales dentro de cada periodo de tiempo evaluado, de esta manera al comparar la densidad de bacterias viables totales a las 8 horas, se determinó el mayor promedio con el tratamiento control con 72.00×10^{11} UFC/ml, seguido por las densidades de bacterias obtenidas mediante la incorporación *in vitro* de *Saccharomyces cerevisiae* con 66.00×10^{11} UFC/ml, finalmente y con una densidad menor el tratamiento a base de *Levica 25* con el que se determinó una densidad de bacterias viables totales de 18.00×10^{11} UFC/ml, cuadro 8.

Dentro de las 12 horas de evaluación, la densidad de bacterias viables totales obtenida mediante la incorporación de levaduras *in vitro* y el tratamiento control, difieren estadísticamente entre sí, siendo superior la densidad de bacterias con el tratamiento control alcanzando un promedio de 112.95×10^{11} UFC/ml, seguida por promedios más bajos obtenidos mediante la utilización *in vitro* de *Saccharomyces cerevisiae* y *Levica 25* con 78.50 y 69.50×10^{11} UFC/ml respectivamente, cuadro 8. Finalmente a las 24 horas de evaluación, existió un promedio mayor con el tratamiento control y la utilización de *Saccharomyces cerevisiae* con 264.25 y 169.50×10^{11} UFC/ml respectivamente, *Levica 25* presentó una densidad de bacterias viables totales de 126.00×10^{11} UFC/ml siendo el promedio más bajo de entre los tres tratamientos, cuadro 8.

Al comparar los promedios de la densidad de bacterias viables totales, en función a las horas de evaluación dentro de cada tipo de levadura y grupo control, se determinó diferencias estadísticas ($P < 0.01$), con diferentes comportamientos dentro de cada tipo de levadura evaluada, de esta manera al comparar la densidad de bacterias viables totales dentro del grupo control, se determinó el mayor promedio a las 24 horas con 264.25×10^{11} UFC/ml, seguido por densidades

más bajas de bacterias obtenidas a las 12 y 8 horas de evaluación en las cuales se determinaron densidades de 112.95 y 72.00×10^{11} UFC/ml respectivamente, cuadro 8.

Por su parte mediante la incorporación *in vitro* de *Saccharomyces cerevisiae*, la densidad de bacterias viables totales difieren estadísticamente en los periodos de tiempo evaluados, siendo superior la densidad de bacterias viables totales a las 24 horas alcanzando un promedio de 169.50×10^{11} UFC/ml, seguida por los promedios obtenidos a las 12 y 8 horas de evaluación con promedios de 78.50 y 66.00×10^{11} UFC/ml respectivamente, lo cual indica un incremento en la población de estas bacterias a medida que transcurre el tiempo, cuadro 8.

De igual manera y con el mismo comportamiento señalado anteriormente, mediante la incorporación *in vitro* de *Levica 25* se determinaron diferencias estadísticas, es así que a las 24 horas de evaluación se determinó el mayor promedio con 126.00×10^{11} UFC de bacterias viables totales/ml, seguida por las densidades de bacterias obtenidas a las 12 y 8 horas de evaluación donde se determinaron promedios de 69.50 y 18.00×10^{11} UFC/ml en su orden, cuadro 8.

Al validar esta biotecnología en Ecuador utilizando un preparado microbiano a partir de *Saccharomyces cerevisiae* se determinó que la densidad de Bacterias Viables Totales se incrementa a medida que transcurre el tiempo, de esta manera se observa un incremento en la densidad de bacterias viables totales a partir de la hora 8 con 65.00×10^{11} UFC/mL, pasando a una población de 74.80×10^{11} UFC/mL a las 12 horas de evaluación y finalmente incrementándose a 158.50×10^{11} UFC/mL a las 24 horas de fermentación.

Los resultados obtenidos en la población de bacterias viables totales están relacionados a los obtenidos por Orpin, C. (1983), quien al evaluar el efecto de *Saccharomyces boulardii* en el metabolismo ruminal y concluyó que la levadura era digerida por los microorganismos del rumen por lo que era más utilizada como prebiótico que como aditivo microbiano, por obtener un incremento significativo en la población de bacterias benéficas que favorecían a la digestión de los forrajes.

2. Población de bacterias celulolíticas

La densidad de bacterias celulolíticas registró diferencias significativas ($P < 0.01$) dentro de los tratamientos de cada uno de los factores en estudio, así mismo se determinó interacción significativa entre factores, por lo que se exponen los siguientes resultados:

Al comparar los promedios de la densidad de bacterias celulolíticas, en función al tipo de levadura dentro de cada hora de evaluación, se determinó que, al comparar la densidad de bacterias celulolíticas a las 8 horas, se obtuvo el mayor promedio mediante la incorporación *in vitro* de *Levica 25* con 30.00×10^4 UFC/ml, seguido por las densidades de bacterias obtenidas mediante la incorporación *in vitro* de *Saccharomyces cerevisiae*, y el tratamiento control determinándose densidades de 27.00 y 26.00×10^4 UFC/ml respectivamente, cuadro 8, grafico 3.

Por su parte a las 12 horas de evaluación, la densidad de bacterias celulolíticas obtenida mediante la incorporación de levaduras *in vitro* difieren estadísticamente entre sí, siendo superior la densidad de bacterias celulolíticas mediante el empleo de *Levica 25* alcanzando un promedio de 42.50×10^4 UFC/ml, seguida por los promedios obtenidos mediante la utilización *in vitro* de *Saccharomyces cerevisiae* con 30.00×10^4 UFC/ml y en última instancia el grupo control presentó la menor densidad de bacterias celulolíticas con un promedio de 14.00×10^4 UFC/ml, cuadro 8, grafico 3.

Finalmente a las 24 horas de evaluación, existe un comportamiento similar a las comparaciones anteriormente realizadas, determinándose los mayores promedios mediante la incorporación *in vitro* de *Levica 25* con 64.50×10^4 UFC/ml, seguido por las densidades de bacterias obtenidas mediante la incorporación *in vitro* de *Saccharomyces cerevisiae*, y el tratamiento control con 37.25 y 13.50×10^4 UFC/ml de bacterias celulolíticas cuadro 8, grafico 3.

Los resultados obtenidos en la presente investigación responden a lo descrito por varios autores al afirmar que los aditivos microbianos proveen estabilización del pH ruminal Abd El-Ghani, A. (2004), lo que favorece el desarrollo de bacterias celulolíticas. Existen dos efectos de la levadura que pudieran contribuir a la estabilización del pH, uno de ellos es la inhibición del crecimiento de bacterias productoras de ácido láctico Girard, D. et al. (1993) y el otro la estimulación del crecimiento de bacterias que utilizan ácido láctico como *Selenomonas ruminantium*. Los estudios realizados indican que se estimula la producción de AGCC. Lila, Z. et al. (2004).

Al comparar los promedios de la densidad de bacterias celulolíticas, en función a las horas de evaluación dentro de cada tratamiento, se determinó diferencias estadísticas ($P < 0.01$), con diferentes comportamientos dentro de cada tipo de levadura evaluada y grupo control, de esta manera al comparar la densidad de

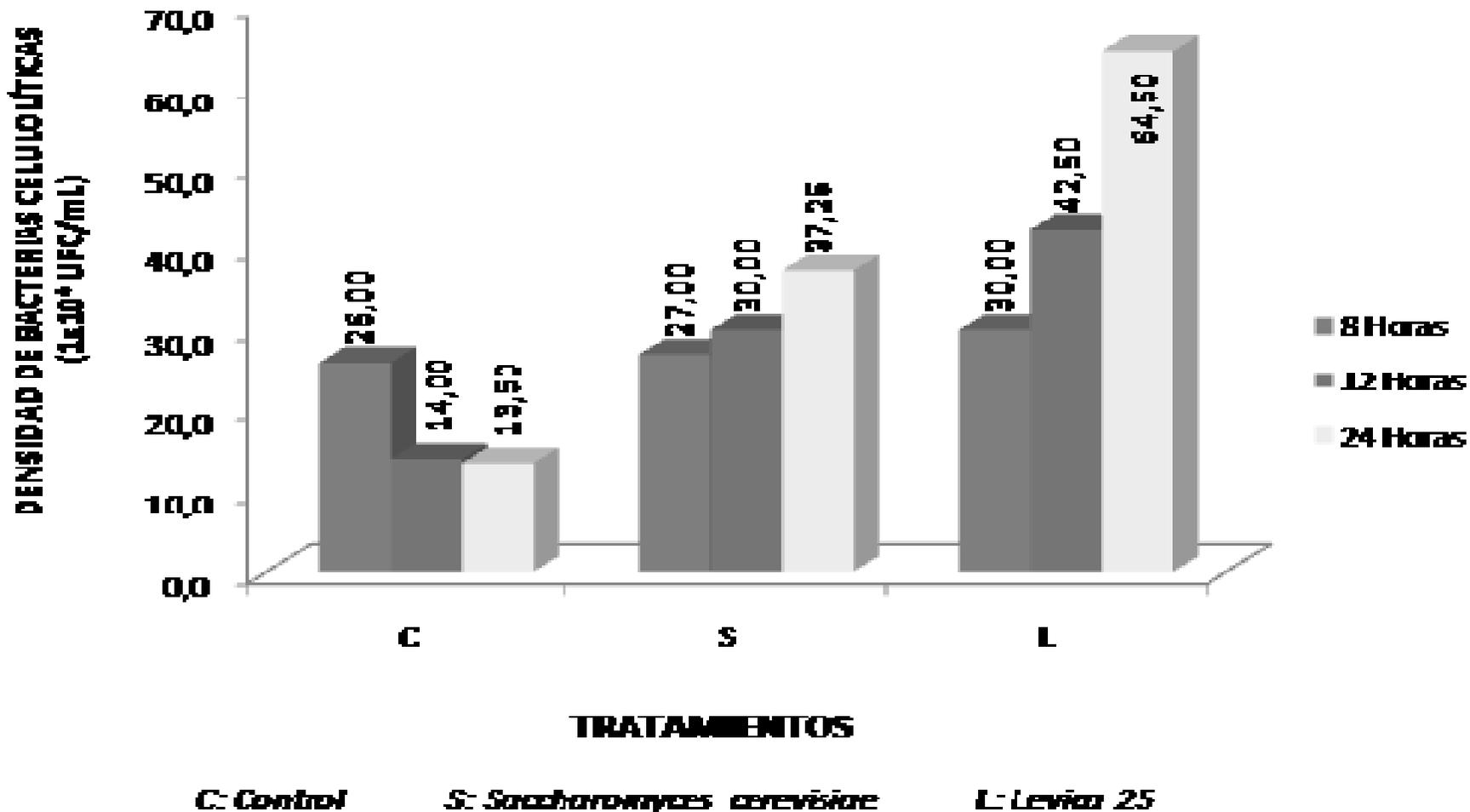


Gráfico 3. Población de bacterias celulolíticas *in vitro* por efecto de la utilización de preparados microbianos con levaduras viables.

bacterias celulolíticas dentro del grupo control, se determinó el mayor promedio a las 8 horas con 26.00×10^4 UFC/ml, seguido por los tratamientos que presentaron densidades de bacterias mas bajas obtenidas a las 12 y 24 horas de evaluación en las cuales se determinaron densidades de 14.00 y 13.50×10^4 UFC/ml respectivamente, cuadro 8, grafico 3.

Por su parte mediante la incorporación *in vitro* de *Saccharomyces cerevisiae*, la densidad de bacterias celulolíticas difieren estadísticamente en los periodos de tiempo evaluados, siendo superior la densidad de bacterias celulolíticas a las 24 horas alcanzando un promedio de 37.25×10^4 UFC/ml, seguida por los promedios obtenidos a las 12 y 8 horas de evaluación con promedios de 30.00 y 27.00×10^4 UFC/ml respectivamente, lo cual indica un incremento en la población de estas bacterias a medida que transcurre el tiempo, cuadro 8, grafico 3.

Mediante la incorporación *in vitro* de *Levica 25* se determinaron diferencias estadísticas, es así que a las 24 horas de evaluación se obtuvo el mayor promedio con 64.50×10^4 UFC de bacterias celulolíticas/ml, seguida por las densidades más bajas de bacterias obtenidas a las 12 y 8 horas de evaluación donde se determinaron promedios de 42.50 y 30.00×10^4 UFC/ml respectivamente, cuadro 8, grafico 3.

Finalmente al incorporar de manera *in vitro* la levadura *Levica 25*, existe un comportamiento similar, determinándose el mayor promedio de bacterias a las 24 horas de evaluación con 64.50×10^4 UFC/ml de bacterias celulolíticas, posteriormente se ubicó el promedio de densidad de bacterias celulolíticas a las 12 horas con 42.50×10^4 UFC/ml y con el menor promedio la densidad de bacterias alcanzadas a las 8 horas de evaluación con 30.00×10^4 UFC/ml, cuadro 8, grafico 3.

Respecto a estos resultados, se confirma que la levadura *LEVICA 25* resultó ser la más promisoría para su empleo como activadora de la fermentación ruminal. Coincidiendo con los resultados expuestos por Marrero, Y. (2005), quien afirma que esta cepa produjo 15% más de gas en fermentaciones *in vitro* con *Cynodon nlemfuensis* en relación al resto de las aisladas en el rumen y además ejerció efectos activadores más prolongados en las poblaciones fúngicas y de bacterias totales y celulolíticas cuando se comparó con la cepa *Saccharomyces cerevisiae* L/25-7-13, en vacas que consumen dietas fibrosas.

3. Población de bacterias metanogénicas

Dentro de la cuantificación de bacterias metanogénicas se registró diferencias significativas ($P < 0.01$) entre los tratamientos de los dos factores evaluados, determinándose además interacción significativa entre factores, encontrándose los siguientes resultados:

En el contraste de promedios de la densidad de bacterias metanogénicas en función al tipo de levadura dentro de cada hora de evaluación, se determinó diferencias estadísticas ($P < 0.01$), con diferentes comportamientos dentro de cada periodo de tiempo evaluado, de esta manera al comparar la densidad de bacterias metanogénicas a las 8 horas se determinó diferencias estadísticas es así que el mayor promedio se obtuvo a base del tratamiento control con 81.00×10^9 UFC/ml, seguido de los tratamientos en los que se incluyen levaduras a base de *Saccharomyces cerevisiae* y *Levica 25* obteniéndose promedios más bajos con 72.50 y 66.53×10^9 UFC/ml respectivamente, cuadro 8, grafico 4.

A las 12 horas de evaluación, la densidad de bacterias metanogénicas obtenida mediante la incorporación de levaduras *in vitro* difieren estadísticamente entre sí, siendo superior la densidad de bacterias metanogénicas obtenida en el grupo control donde no se utilizaron levaduras con un promedio de 112.00×10^9 UFC/ml, y determinándose una mayor eficiencia en la reducción de bacterias metanogénicas mediante el empleo de *Saccharomyces cerevisiae* y *Levica 25* con un promedio de 54.53 y 43.03×10^9 UFC/ml respectivamente, cuadro 8, grafico 4.

Por otro lado a las 24 horas de evaluación, existe un comportamiento similar a la comparación anteriormente realizada, determinándose las mayores eficiencias en reducción de bacterias metanogénicas mediante el tratamiento en el cual no se incluyo ningún tipo de levaduras, presentándose promedios de 300.00×10^9 UFC/ml, seguido del tratamiento a base de *Saccharomyces cerevisiae* con un promedio de 48.48×10^9 UFC/ml y finalmente con la mas baja densidad para este tipo de bacterias se encuentra el tratamiento a base de *Levica 25* en donde se determinó una densidad de 39.25×10^9 UFC/ml, cuadro 8, grafico 4.

Al comparar los promedios de la densidad de bacterias metanogénicas, en función a las horas de evaluación dentro de cada tipo de levadura, se determinó diferencias estadísticas ($P < 0.01$), con diferentes comportamientos dentro de cada tipo de levadura evaluada de esta manera al comparar la densidad de bacterias metanogénicas dentro del grupo control, se determinó el mayor promedio a las 24

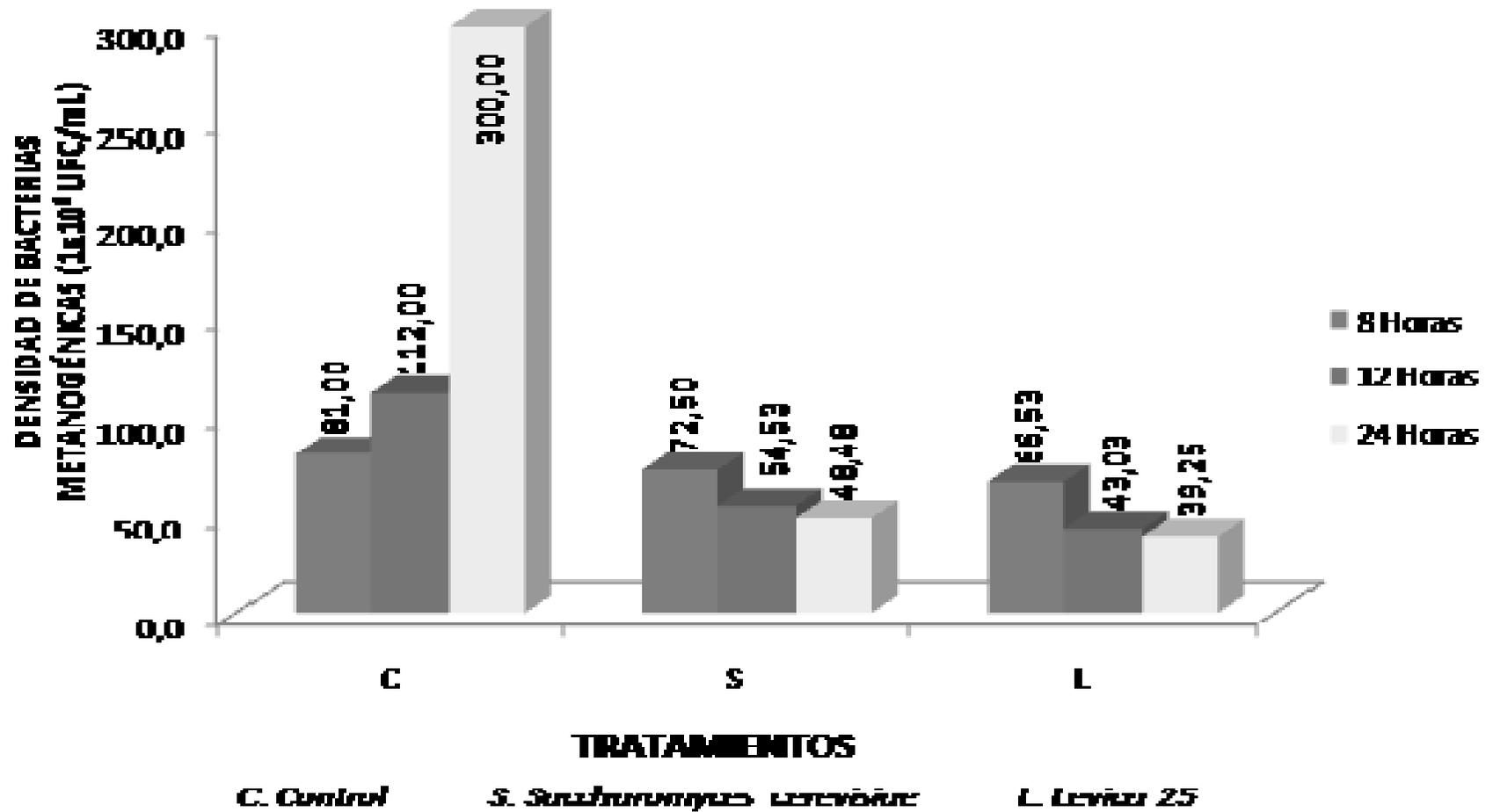


Gráfico 4. Población de bacterias metanogénicas *in vitro* por efecto de la utilización de preparados microbianos con levaduras viables.

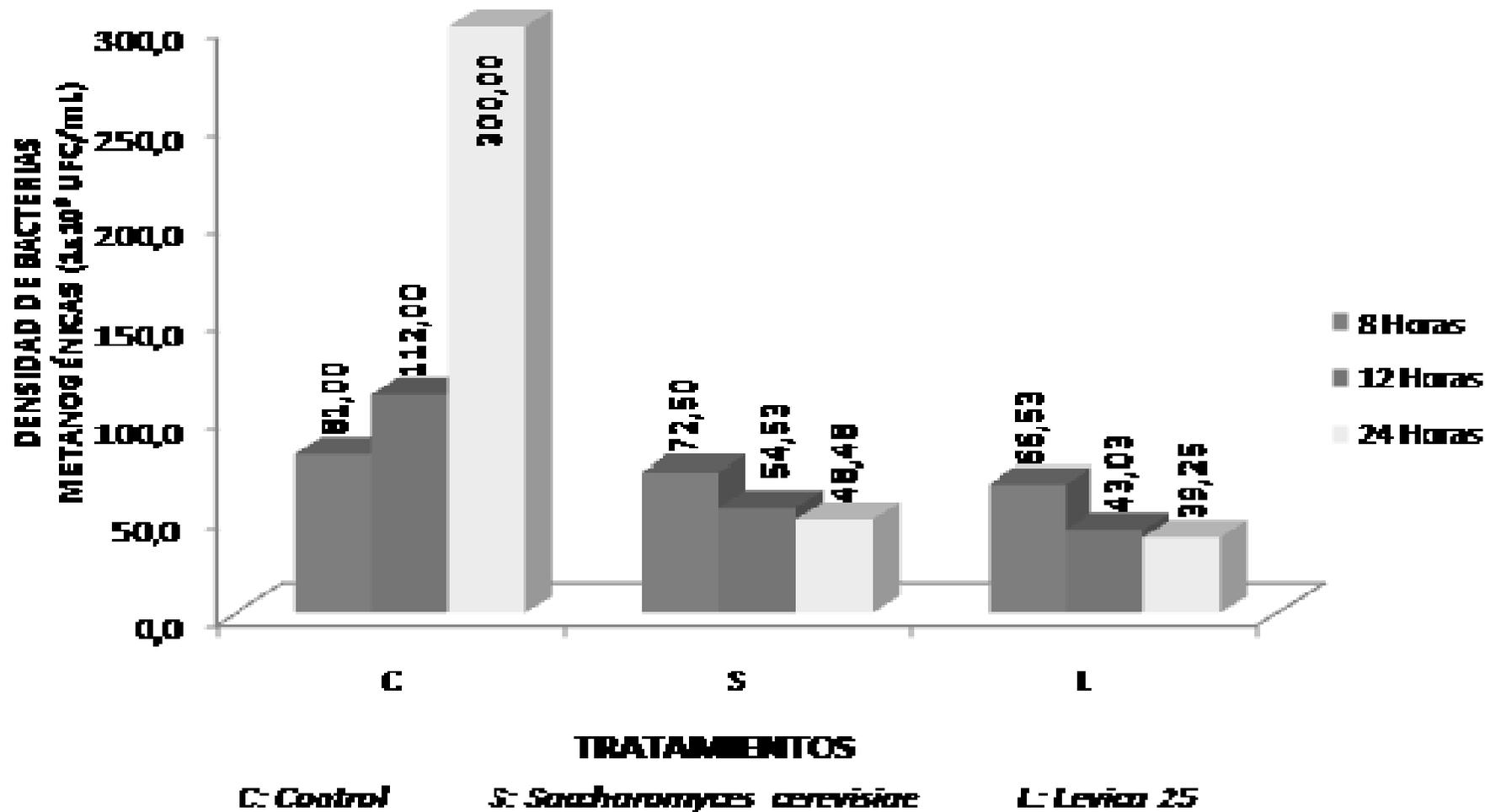


Gráfico 4. Población de bacterias metanogénicas *in vitro* por efecto de la utilización de preparados microbianos con levaduras viables.

horas con 300.00×10^9 UFC/ml, seguido por las densidades de bacterias obtenidas a las 12 y 8 horas de evaluación en las cuales se determinaron densidades de 112.00 y 81.00×10^9 UFC/ml respectivamente, cuadro 8, grafico 4.

Los resultados obtenidos con los preparados microbianos se hallan relacionados a lo descrito por Hungate, R. (1970), quien informó que los metanógenos que viven en el interior o adheridos a la superficie de los protozoos ciliados del rumen, son responsables de más del 37% de las emisiones de metano. En ausencia de protozoos o cuando su población se deprime, las emisiones de metano del rumen se reducen alrededor de un 13%. Asimismo indicó que este efecto varía con la dieta, por lo que dado el efecto que ejercen las levaduras sobre los protozoos la población de metanógenos es menor.

Por su parte mediante la incorporación *in vitro* de *Saccharomyces cerevisiae*, la densidad de bacterias metanogénicas difieren estadísticamente en los periodos de tiempo evaluados, siendo superior la densidad de bacterias metanogénicas a las 8 horas alcanzando un promedio de 72.50×10^9 UFC/ml, a continuación y con una densidad menor se obtuvo un promedio de 54.53×10^9 UFC/ml a las 12 horas de evaluación, mientras que el mas bajo promedio de entre los tres tratamientos evaluados se registró a las 24 horas con 48.48×10^9 UFC/ml, lo cual indica un descenso en la población de estas bacterias a medida que transcurre el tiempo, cuadro 8, grafico 4.

Mediante la incorporación *in vitro* de *Levica 25* se determinaron diferencias estadísticas, es así que a las 8 horas de evaluación se obtuvo el mayor promedio con 66.53×10^9 UFC de bacterias metanogénicas/ml, seguida por el promedio obtenido a las 12 horas de evaluación con 43.03×10^9 UFC/ml mientras que en un promedio menor se registró a las 24 horas con 39.25×10^9 UFC/ml, cuadro 8, grafico 4.

4. Población de protozoos

Dentro de la cuantificación en cuanto a la población de protozoos se registró diferencias significativas ($P < 0.01$), entre los tratamientos de los dos factores evaluados, determinándose además interacción significativa entre factores, encontrándose los siguientes resultados:

Al comparar los promedios de la densidad de protozoarios, en función al tipo de levadura dentro de cada hora de evaluación, se determinó que, al comparar su

densidad a las 8 horas, se obtuvo el mayor promedio mediante el tratamiento control con 19.13×10^5 especímenes/ml, seguido por densidades mas bajas de protozoarios obtenidas mediante la incorporación *in vitro* de *Saccharomyces cerevisiae*, y *Levica 25* determinándose una población de protozoarios de 8.25 y 6.75×10^5 especímenes /ml respectivamente, cuadro 8, grafico 5.

A las 12 horas de evaluación, la densidad de protozoarios obtenidas mediante la incorporación de levaduras *in vitro* y el tratamiento control, difieren estadísticamente entre sí, siendo superior la densidad de protozoarios obtenida en el grupo control con un promedio de 21.50×10^5 especímenes /ml, además se pudo observar que con una mayor eficiencia en la reducción de protozoarios se obtuvo mediante el empleo de *Saccharomyces cerevisiae* y *Levica 25* con un promedio de 14.50 y 12.63×10^5 especímenes /ml respectivamente, cuadro 8, grafico 5.

Por otro lado a las 24 horas de evaluación, existió un comportamiento similar a la comparación anteriormente realizada, determinándose las mayores eficiencias en la reducción de protozoarios mediante el tratamiento control, presentándose promedios de 34.88×10^5 especímenes /ml, seguido del tratamiento en el que se utilizó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* con un promedio de 11.25×10^5 especímenes /ml y finalmente con la mas baja densidad se encuentra el tratamiento a base de *Levica 25* en donde se determinó una densidad de 6.88×10^5 especímenes /ml, cuadro 8, grafico 5.

Estos resultados son similares a los descritos por Dawson,K,et al, (1990), que las levaduras son capaces de destruir bacterias patógenas, debido a la habilidad que poseen de ligar estos microbios a sus paredes celulares o de unirse a los sitios receptores de patógenos al nivel de la mucosa intestinal.

Al comparar los promedios de la densidad de protozoarios, en función a las horas de evaluación dentro de cada tipo de levadura, se determinó diferencias estadísticas ($P < 0.01$), con diferentes comportamientos dentro de cada tipo de levadura evaluada de esta manera al comparar la densidad de protozoarios dentro del grupo control, se determinó el mayor promedio a las 24 horas con 34.88×10^5 especímenes /ml, posteriormente se presentaron densidades mas bajas de protozoarios obtenidas a las 12 y 8 horas de evaluación en las cuales se determinaron promedios de 21.50 y 19.13×10^5 especímenes /ml respectivamente, cuadro 8,grafico 5.

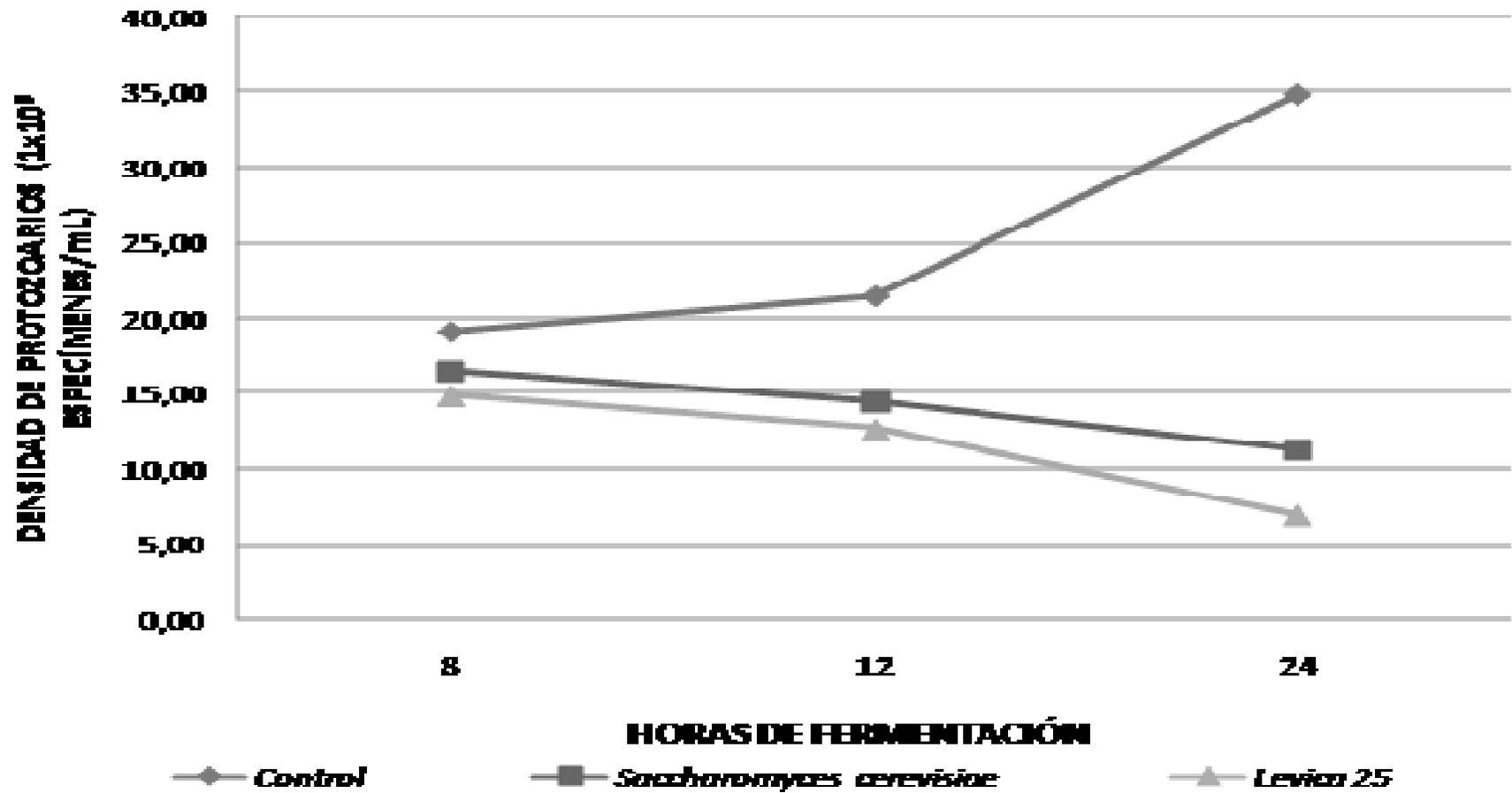


Gráfico 5. Comportamiento de la población de protozoarios *in vitro* por efecto de la utilización de preparados microbianos con

Por su parte mediante la incorporación *in vitro* de *Saccharomyces cerevisiae*, la densidad de protozoarios difieren estadísticamente en los periodos de tiempo evaluados, siendo superior la densidad de protozoarios a las 8 horas alcanzando un promedio de 16.50×10^5 especímenes/ml, a continuación y con una densidad menor se obtuvo un promedio de 21.50×10^5 especímenes/ml a las 12 horas de evaluación, mientras que el mas bajo promedio de entre los tres tratamientos evaluados se registró a las 24 horas con 11.25×10^5 especímenes /ml, lo cual indica un descenso en la población de protozoarios a medida que transcurre el tiempo, cuadro 8,grafico 5.

Mediante la incorporación *in vitro* de *Levica 25* se determinaron diferencias estadísticas, es así que a las 8 horas de evaluación se obtuvo el mayor promedio con 14.88×10^5 especímenes de protozoarios/ml, seguida por el promedio obtenido a las 12 horas de evaluación con 12.63×10^5 especímenes/ml mientras que en un promedio menor se registró a las 24 horas con un promedio de protozoarios de 6.88×10^5 especímenes/ml, cuadro 8, grafico 5.

De la misma manera validar el efecto del preparado microbiano a partir de *Saccharomyces cerevisiae* en Ecuador se determinó que la densidad de Protozoarios decrece en relación al incremento del tiempo de fermentación, así se ha determinado una disminución en la población de protozoarios a partir de la hora 8 con 12.25×10^5 especímenes/mL decreciendo a una población de 10.50×10^5 especímenes/mL a las 12 horas de evaluación y finalmente a 8.00×10^5 especímenes/mL a las 24 horas de fermentación, cuadro 9.

Cuadro 9. VALIDACIÓN DEL EFECTO DE PREPARADOS MICROBIANOS A BASE DE *Saccharomyces cerevisiae* SOBRE LA POBLACIÓN MICROBIOLÓGICA RUMINAL *IN VITRO*.

VARIABLES	HORAS DE EVALUACIÓN		
	8	12	24
Densidad de Bacterias Viables Totales, 1×10^{11} UFC/mL	65,00	74,80	158,50
Densidad de Protozoarios, 1×10^5 especímenes/mL	12,25	10,50	8,00
pH	6,80	6,76	6,25

Fuente: Castañeda, S. (2008).

Los resultados obtenidos están relacionados a lo descrito por varios autores que afirman la capacidad de las levaduras de destruir bacterias patógenas, debido a la

habilidad que poseen de ligar estos microbios a sus paredes celulares o de unirse a los sitios receptores de patógenos al nivel de la mucosa intestinal. Se ha comprobado experimentalmente que los oligosacáridos de manosa derivados de la hidrólisis de paredes celulares de levaduras son capaces de reducir la adherencia de muchas bacterias a la mucosa intestinal y ejercer un efecto inmuno estimulante. Marrero, Y. (2005).

C. ANÁLISIS DE PREFACTIBILIDAD ECONÓMICA DEL USO DE PREPARADOS MICROBIANOS CON LEVADURAS VIABLES EN RUMIANTES MAYORES.

Dentro del análisis de prefactibilidad de la utilización de preparados microbianos a base de Levica 25 y *Saccharomyces cerevisiae*, se han considerado los costos de su aplicación en rumiantes mayores, involucrando los costos de preparación del medio de cultivo, preparación del inóculo y mano de obra, determinándose que el costo de 60 litros de preparado a partir de Levica 25 necesarios para ser suministrados a un rumiante mayor durante un año es de 21.24 USD, lo que corresponde a un costo diario de 0.058 USD/160 ml que deben ser ofertados diariamente a los rumiantes para disminuir el contenido de metanógenos del rumen e incrementar la densidad de bacterias celulolíticas que permitirán una mayor digestibilidad de los forrajes y por ende incremento de la productividad de rumiantes tanto de leche como de carne, cuadro 10.

Cuadro 10. DETERMINACIÓN DE COSTOS PARA EL ANÁLISIS DE PREFACTIBILIDAD ECONÓMICA DEL USO DE PREPARADOS MICROBIANOS A BASE DE LEVICA 25 Y *Saccharomyces cerevisiae*.

Concepto		Cantidad	C. Unit.	Subtotal
Medio de cultivo	Vinaza, L	32.92	0.05	1.65
	Miel, L	4.49	0.07	0.31
	Roca fosfórica, kg	2.17	0.10	0.22
	Urea, kg	11.97	0.56	6.65
	BIOPLA, kg	2.99	0.25	0.75
Preparación del Inoculo	Extracto-Caldo de			
	Malta	5.45	1.68	9.16
Mano de Obra	Jornal	0.25	10.00	2.50
TOTAL (USD)				21.24

Fuente: Castañeda, S. (2008).

VI. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos se concluye lo siguiente:

1. Mediante la utilización de preparados microbianos a base de levaduras *Levica 25* y *Saccharomyces cerevisiae* se determinó un efecto significativo en relación al grupo control en cuanto a la reducción de la producción de gas total y gas metano *in vitro* de la digestión del pasto estrella, sin embargo la utilización de *Levica 25* produce un efecto más eficiente.
2. Mediante la aplicación de preparados microbianos a base de *Levica 25* en la digestibilidad *in vitro* de líquido ruminal, se determinó una menor población de protozoos y bacterias metanogénicas lo que favoreció al desarrollo de bacterias celulolíticas en el rumen.
3. El costo de la aplicación de preparados microbianos a partir de levaduras en rumiantes mayores, durante un año es de 21.24 USD, lo que corresponde a un costo diario de 0.058 USD/160 ml que deben ser ofertados diariamente a los rumiantes para disminuir el contenido de metanógenos del rumen e incrementar la densidad de bacterias celulolíticas.
4. En la validación realizada en Ecuador, se determinó que la utilización de un preparado microbiano a base de *Saccharomyces cerevisiae* en bovinos, presenta resultados similares a los obtenidos en Cuba en cuanto a pH y densidad de bacterias viables totales y protozoarios.

VI. RECOMENDACIONES

1. Utilizar preparados microbianos a partir de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae* y *Levica 25*), en rumiantes mayores para disminuir la metanogénesis en el rumen e incrementar la población de bacterias celulolíticas que permitirán una mayor digestibilidad y aprovechamiento de los nutrientes de los pastos.
2. Realizar nuevas investigaciones para evaluar los niveles adecuados de suministro de preparados microbianos a base de levaduras, tanto en bovinos lecheros como en los de carne.
3. Divulgar los resultados obtenidos en la investigación a nivel de gobierno local y organizaciones de productores a fin de adoptar tecnologías que permitan el incremento de la productividad utilizando compuestos orgánicos amigables con el medio.

VII. LITERATURA CITADA

1. ABD EL-GHANI, A. 2004. Influence of diet supplementation with yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on performance of Zaraibi goats. Small Ruminant Research. Edit. ICCAP. pp. 12-13.
2. ANGULO, R. 2005. El búfalo de agua (*Bubalus bubalis*) un eficiente utilizador de nutrientes: aspectos sobre fermentación y digestión ruminal. Edit. Martí. pp. 20, 21, 23.
3. AKIN, D. y BORNEMAN, W. 1990. Role of rumen fungi in fiber degradation. Journal of Dairy Science. Edit Cenic. pp. 19-38.
4. AKIN, D. y RIGSBY, L. 1985. Degradation of Bermuda and orchardgrass by species of ruminal bacteria. Appl. Environ. Microbiol. Edit Cenic. pp. 9-98.
5. AKIN, D. Y RIGSBY, L. 1985. Influence of phenolic acids on rumen fungi. Agron. J. pp. 119.
6. CARRO, M. & RANILLA, M. 2003. Influence of different concentrations of disodium fumarate on methane production and fermentation of concentrate feeds by rumen micro-organisms in vitro. Br. J. Nutr. pp. 354.
7. CALDWELL, D. y BRYANT, M. 1966. Medium without fluid for non selective enumeration and isolation of rumen bacteria. Appl. Microb. pp. 19.
8. DAWSON, K. NEWMAN, K. & BOLING, J. 1990. Effects of microbial supplements containing yeast and lactobacilli on roughage-fed ruminal microbial activities. J. Anim. pp. 243.

9. DORE, J. y GOUET, P. 1991. Microbial interactions in the rumen. In: Jouany J P (editor). Rumen microbial metabolism and ruminant digestion. INRA Editions. Paris, Cedex.
10. FONTY, G. WILLIAMS, F. BONNEMOY, B. MORVAN, J. DORÉ y GOUET, P. 1992. Interactions between cellulolytic bacteria, anaerobic fungi and methanogens in the rumen of gnotobiotic lambs. Proc. Int. Conf. on «Manipulation of rumen microorganisms to improve efficiency of fermentation and ruminant nutrition. Edit. ICCAP. pp. 12-13.
11. FRANZOLIN, R .2001. Pesquisas en nutricao de bubalinos. En: Anais do II simpósio paulista de bubalinocultura. Pirassununga, Brasil.
12. FULLER, R. 1989. Probiotics in man and animals. J. Appl. Bacteriol. pp. 11-67.
13. FONDEVILA, M. 1994. Degradation and utilization of forage hemicellulose by rumen bacteria, singly, in coculture or added sequentially. J. Appl. Bacteriol. Edit. Martí. pp. 20, 21, 23.
14. GALINDO, J. 1988. Efecto de la zeolita en la población de bacterias celulolíticas y su actividad en vacas que consumen ensilaje Tesis PhD. Instituto de Ciencia Animal, La Habana, Cuba. Edit. ICCAP. pp. 12-13.
15. GALINDO, J., ELÍAS, A., PALENZUELA, T., PÉREZ, M. & ALDANA, A. 2003. Efecto del monensín en la producción de metano *in vitro* en tres sistemas ecológicos ruminales. Rev. Cubana Cienc. Agríc.
16. GIL, S.B. 2004. Sistema de producción de carne bovina: Engorde intensivo. Elementos que intervienen y posibles impactos en el medio ambiente. <http://www.ingenieroambiental.com/new3informes/feedlot.htm>
17. GIRARD, D. JONES, C. & DAWSON, K. 1993. Lactic acid utilization in rumen simulating cultures receiving a yeast culture supplement. J. Edit. ICCAP. pp. 41-42.

18. GRENET, E. BRETON, P. BARRY A y FONTY.J. 1989. Rumen anaerobic fungi and plant substrates colonization as affected by diet composition. Anim. Feed Sci.Technol. pp. 1119.
19. HUNGATE, R. 1970. The anaerobic, mesophilic cellulolytic bacteria. pp. 111.
20. JOUANY, J. 1994. Methods of manipulating the microbial metabolism in the rumen. Ann. Zootech. Edit Cenid. pp. 14-89.
21. KAMRA, D. & AGAWAL, N. 2004. Bacteria and fungi of non-rumen origin. En Probiotics as feed additives for the ruminants. Indian Veterinary Research Institute, Izatnagar. Edit. ICCAP. pp. 22-24.
22. LILA, Z, MOHAMMED, N., YASUI, T., KUROKAWA, Y, KANDA, S. & ITABASHI, H. 2004. Effects of a twin strain of *Saccharomyces cerevisiae* live cells on mixed ruminal microorganism fermentation in vitro. pp. 19.
23. MARRERO, Y. 2005. Las levaduras como mejoradoras de la fermentación ruminal de dietas con alto contenido de fibra. Tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. Instituto de Ciencia Animal. La Habana. Cuba. pp. 24-25-26.
24. MARRERO, Y, GALINDO, J., TORRES, V., ALDAMA, A. & NODA, A. 2005. Selección de levaduras con mayor capacidad fermentativa en el ecosistema ruminal. En: I Congreso Internacional de Producción Animal. Palacio de Las Convenciones. 7-11 de noviembre del 2005. Ciudad de La Habana, Cuba. pp. 34-89.
25. MARTÍNEZ, J.; ROMAY, Z.; ROJAS, T.; GUERRA, G. 1995. Manual Práctico de Microbiología. Universidad de La Habana. Editorial Pueblo y Educación. Edit. Martí. pp. 20, 21, 23.

26. MARTY, R. 1992. Manipulación de la fermentación ruminal. Rev. Cub. Cienc. Agric. Edit. ICCAP. pp. 12-13.
27. ORPIN, C. 1983. The role of ciliate protozoa and fungi in the rumen digestion of plant cell walls. Anim. Feed Sci. Technol. Edit Cenid. pp. 19-98.
28. PRINS, R. 1991. The rumen ciliates and their functions. Rumen microbial metabolism and ruminant digestion. INRA Editions. Paris, Cedex.
29. REYES, J., ALFONSO, F., REY, S., LEGARDA, Y, NODA, A. & RODRÍGUEZ, Y. 2005. Resultado de la evaluación del probiótico Sorbial en vacas lecheras en pastoreo. En: I Congreso Internacional de Producción Animal. Palacio de Las Convenciones. 7-11 de noviembre del 2005. Ciudad de La Habana, Cuba.
30. THEODOROU, M, WILLIAMS, B., DHANOA, M, MCALLAN, A. & FRANCE, J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminants feed. Anim. Feed. Sci. Tech. Edit. ICCAP. pp. 21-43.
31. WIEDMEIER, R. 1989. Optimizing the utilization of low quality forage through the supplementation and chemical treatment. En: 9th Annual Utah Beef Cattle Field Day, Brigham Young University, Provo, Utah, US.
32. WILLIAMS, A. AND COLEMAN.G. 1988. The rumen protozoa. p. 77-128. En: The rumen microbial ecosystem. P.N. Hobson (ed.), Elsevier Applied Sciences, Londres. Edit. ICCAP. pp. 22-24.
33. ZINDER, S. 1992. Methanogenesis. En: Encyclopedia of Microbiology, Lederberg, J. Ed. Academic Press, San Diego. Edit Cenid. pp. 2-98.

ANEXOS

Anexo 1. Análisis de varianza de los indicadores ruminales en la evaluación de la metanogénesis ruminal *in vitro* por efecto de preparados microbianos con levaduras viables.

a. POTENCIAL DE HIDRÓGENO (pH)

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F Ca1	Pr > F
Total	35	12.33316389			
L	2	7.32440556	3.66220278	26.03	<.0001
H	2	0.29587222	0.14793611	1.05	0.3632
L*H	4	0.91491111	0.22872778	1.63	0.1965
Error	27	3.79797500	0.14066574		

%CV DS MM
 5.472804 0.375054 6.853056

Duncan	Media	N	Tratamiento
A	7.4350	12	C
B	6.7883	12	S
C	6.3358	12	L

Duncan	Media	N	Tratamiento
A	6.9792	12	8
A	6.8100	12	12
A	6.7700	12	24

b. PRODUCCIÓN DE GAS TOTAL (mL/g MS)

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F Ca1	Pr > F
Total	35	18485.40556			
L	2	8377.870556	4188.935278	1535.97	<.0001
H	2	9125.842222	4562.921111	1673.10	<.0001
L*H	4	908.057778	227.014444	83.24	<.0001
Error	27	73.63500	2.72722		

%CV DS MM
 3.407743 1.651430 48.46111

Horas de Fermentación	Levadura			Promedio
	Control	Saccharomyces	Levica	
8	43,30	30,30	20,50	31,37
12	62,13	45,50	25,33	44,32
24	95,00	71,55	42,55	69,70
Promedio	66,81	49,12	29,46	48,46

C: Control S: Saccharomyces L: Levica

t Duncan 2,91 3,05
 D. Estándar 0,477
 L.S. Duncan 1,30 1,45

SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN DUNCAN: TRATAMIENTOS DENTRO DE TIEMPO

8			12			24		
C	S	L	C	S	L	C	S	L
43,30a	30,30b	20,50c	62,13a	45,50b	25,33c	95,00a	71,55b	42,55c

SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN DUNCAN: TIEMPO DENTRO DE TRATAMIENTOS

C	S	L
---	---	---

24	12	8
95,00a	62,13b	43,30c

24	12	8
71,55a	45,50b	30,30c

24	12	8
42,55a	25,33b	20,50c

c. PRODUCCIÓN DE GAS METANO (μl)

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F Ca1	Pr > F
Total	17	133.9027778			
L	2	98.11111111	49.05555556	207.76	<.0001
H	2	8.77777778	4.38888889	18.59	0.0006
L*H	4	24.88888889	6.22222222	26.35	<.0001
Error	9	2.1250000	0.2361111		

%CV DS MM
6.601078 0.485913 7.361111

Horas de Fermentación	Levadura			Promedio
	Control	Saccharomyces	Levica	
8	9,25	8,25	6,75	8,08
12	10,50	7,75	4,50	7,58
24	11,50	4,75	3,00	6,42
Promedio	10,42	6,92	4,75	7,36

C: Control S: Saccharomyces L: Levica

t Duncan 3,20 3,34
D. Estándar 0,198
L.S. Duncan **0,63** **0,66**

SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN DUNCAN: TRATAMIENTOS DENTRO DE TIEMPO

8		
C	S	L
9,25a	8,25b	6,75c

12		
C	S	L
10,50a	7,75b	4,50c

24		
C	S	L
11,50a	4,75b	3,00c

SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN DUNCAN: TIEMPO DENTRO DE TRATAMIENTOS

C		
24	12	8
11,50a	10,50b	9,25c

S		
8	12	24
8,25a	7,75a	4,75b

L		
8	12	24
6,75a	4,50b	3,00c

Anexo 2. Análisis de varianza de los indicadores de la población microbiana ruminal *in vitro* por efecto de preparados microbianos con levaduras viables.

a. BACTERIAS VIABLES TOTALES (1×10^{11} UFC/ml)

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F Ca1	Pr > F
---------------------	----	----	----	-------	--------

Total	35	168284.8222			
L	2	6069.5356	3034.7678	1253.27	<.0001
H	2	117026.6689	58513.3344	24164.3	<.0001
L*H	4	45123.2378	11280.8094	4658.64	<.0001
Error	27	65.3800	2.4215		

%CV DS MM
1.433910 1.556111 108.5222

Horas de Fermentación	Levadura			Promedio
	Control	Saccharomyces	Levica	
8	72,00	66,00	18,00	52,00
12	112,95	78,50	69,50	86,98
24	264,25	169,50	126,00	186,58
Promedio	149,73	104,67	71,17	108,52

C: Control S: Saccharomyces L: Levica

t Duncan 2,91 3,05
D. Estándar 0,449
L.S. Duncan **1,30** **1,37**

SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN DUNCAN: TRATAMIENTOS DENTRO DE TIEMPO

8			12			24		
C	S	L	C	S	L	C	S	L
72,00a	66,00b	18,00c	112,95a	78,50b	69,50c	264,25a	169,50b	126,00c

SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN DUNCAN: TIEMPO DENTRO DE TRATAMIENTOS

C			S			L		
24	12	8	24	12	8	24	12	8
264,25a	112,95b	72,00c	169,50a	78,50b	66,00c	126,00a	69,50b	18,00c

b. BACTERIAS CELULOLÍTICAS (1×10^4 UFC/ml)

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F Ca1	Pr > F
Total	35	7742.305556			
L	2	4649.055556	2324.527778	2109.66	<.0001
H	2	835.055556	417.527778	378.93	<.0001
L*H	4	2228.444444	557.111111	505.61	<.0001
Error	27	29.750000	1.101852		

%CV DS MM
3.317725 1.049691 31.63889

Horas de Fermentación	Levadura			Promedio
	Control	Saccharomyces	Levica	
8	26,00	27,00	30,00	27,67
12	14,00	30,00	42,50	28,83
24	13,50	37,25	64,50	38,42
Promedio	17,83	31,42	45,67	31,64

C: Control S: Saccharomyces L: Levica

t Duncan 2,91 3,05
D. Estándar 0,303
L.S. Duncan **0,88** **0,92**

SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN DUNCAN: TRATAMIENTOS DENTRO DE TIEMPO

8		
L	S	C
30,00a	27,00b	26,00c

12		
L	S	C
42,50a	30,00b	14,00c

24		
L	S	C
64,50a	37,25b	13,50c

SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN DUNCAN: TIEMPO DENTRO DE TRATAMIENTOS

C		
8	12	24
26,00a	14,00b	13,50b

S		
24	12	8
37,25a	30,00b	27,00c

L		
24	12	8
64,50a	42,50b	30,00c

c. BACTERIAS METANOGENICAS (1x10⁹ UFC/ml)

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F Ca1	Pr > F
Total	35	213238.9156			
L	2	97774.56889	48887.28444	11656.3	<.0001
H	2	26657.48722	13328.74361	3177.99	<.0001
L*H	4	88693.61944	22173.40486	5286.84	<.0001
Error	27	113.2400	4.1941		

%CV DS MM
 2.255169 2.047944 90.81111

Horas de Fermentación	Levadura			Promedio
	Control	Saccharomyces	Levica	
8	81,00	72,50	66,53	73,34
12	112,00	54,53	43,03	69,85
24	300,00	48,48	39,25	129,24
Promedio	164,33	58,50	49,60	90,81

C: Control **S:** Saccharomyces **L:** Levica

t Duncan 2,91 3,05
 D. Estándar 0,591
 L.S. Duncan **1,72** **1,80**

SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN DUNCAN: TRATAMIENTOS DENTRO DE TIEMPO

8		
C	S	L
81,00a	72,50b	66,53c

12		
C	S	L
112,00a	54,53b	43,03c

24		
C	S	L
300,00a	48,48b	39,25c

SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN DUNCAN: TIEMPO DENTRO DE TRATAMIENTOS

C		
24	12	8
300,00a	112,00b	81,00c

S		
8	12	24
72,50a	54,53b	48,48c

L		
8	12	24
66,53a	43,03b	39,25c

d. DENSIDAD DE PROTOZOARIOS (1x10⁵ especímenes/ml)

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F Ca1	Pr > F
Total	35	2073.409722			
L	2	1270.597222	635.298611	509.18	<.0001
H	2	12.847222	6.423611	5.15	0.0128
L*H	4	756.277778	189.069444	151.54	<.0001
Error	27	33.687500	1.247685		

%CV DS MM
 6.608371 1.116998 16.90278

Horas de Fermentación	Levadura			Promedio
	Control	Saccharomyces	Levica	
8	19,13	16,50	14,88	16,83
12	21,50	14,50	12,63	16,21
24	34,88	11,25	6,88	17,67
Promedio	25,17	14,08	11,46	16,90

C: Control S: Saccharomyces L: Levica

t Duncan 2,91 3,05
 D. Estándar 0,322
 L.S. Duncan 0,94 0,98

SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN DUNCAN: TRATAMIENTOS DENTRO DE TIEMPO

8			12			24		
C	S	L	C	S	L	C	S	L
19,13a	16,50b	14,88c	21,50a	14,50b	12,63c	34,88a	11,25b	6,88c

SEPARACIÓN DE MEDIAS SEGÚN DUNCAN: TIEMPO DENTRO DE TRATAMIENTOS

C			S			L		
24	12	8	8	12	24	8	12	24
34,88a	21,50b	19,13c	16,50a	14,50b	11,25c	14,88a	12,63b	6,88c