

## Efecto de la inclusión de fracciones del cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* en la fermentación ruminal *in vitro* de pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*)

Yoandra Marrero<sup>1</sup>, Elizabeth Martín<sup>2</sup>, D. Rodríguez<sup>2</sup> y Juana Galindo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Ciencia Animal, Apartado Postal 24, San José de las Lajas, La Habana

<sup>2</sup> Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA).

Correo electrónico: ymarrero@ica.co.cu

Se empleó la técnica de producción de gas *in vitro* para determinar el efecto de *Saccharomyces cerevisiae* en el valor nutritivo de la MS y la FDN de pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*). Se evaluaron tres formas de inclusión de la levadura: 1) medio de cultivo inoculado con *S. cerevisiae*, 2) granulado de la centrifugación del medio de cultivo inoculado, 3) sobrenadante de la centrifugación del medio de cultivo inoculado. Se incluyó además, un control sin levadura. Se realizó análisis de varianza, según diseño completamente aleatorizado con cuatro tratamientos para el indicador producción de gas y según diseño bloques al azar para las medidas de pH, degradabilidad de MS y FDN y conteo de poblaciones microbianas ruminales (bacterias totales, celulolíticas y hongos celulolíticos). La producción de gas se midió cada 10 min. y el resto de los indicadores a las 24 h. Se llevaron a cabo cuatro réplicas. Se obtuvo incrementos en el número de bacterias celulolíticas y totales tras la inclusión de *S. cerevisiae* en su medio de cultivo ( $7.87 \times 10^8$  y  $19.7 \times 10^8$  ufc·mL<sup>-1</sup> respectivamente), con respecto al control ( $7.5 \times 10^8$  y  $4.6 \times 10^8$  ufc·mL<sup>-1</sup>), que generó una respuesta positiva en la tasa de degradación de la fibra *in vitro*, y como consecuencia en la producción de gas acumulada. Sin embargo, la inclusión de granulado de levadura mostró efecto positivo cuando se empleó la fracción materia seca y no en la FDN; el sobrenadante del cultivo de levadura causó efectos deletéreos en todas las variables de respuesta. Los resultados permiten afirmar que cuando se incluye *S. cerevisiae*, tanto en su medio de cultivo como en forma de granulado, se favorecen los procesos fermentativos *in vitro* que ejercen poblaciones de bacterias viables totales y celulolíticas en la MS y FDN de *C. nlemfuensis*, lo que se refleja en aumento de su degradabilidad.

Palabras clave: rumen, microorganismos, producción de gas, levadura

La utilización de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como aditivo en dietas fibrosas para rumiantes produce mejoras en la eficiencia de utilización y disponibilidad de los nutrientes (Angeles *et al.* 1995 y Newbold *et al.* 1998) e incrementos en la digestión ruminal de la MS, MO y FDN, tanto *in vivo* como *in vitro* (Williams 1991, Wohlt *et al.* 1998, y Biricik y Turkman 2001) y en la degradabilidad de FDA y nitrógeno (Doreau y Jouany 1998). Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales esta levadura ejerce su acción en el rumen, no han quedado debidamente esclarecidos.

Se conoce que la cuantificación de la producción del gas en fermentaciones *in vitro* se utiliza para determinar la digestibilidad y la cinética de la fermentación ruminal de los alimentos (Theodorou *et al.* 1994, Schofield y Pell 1995 a y b y Pulido 1997), lo que unido a las ecuaciones de regresión múltiple y los componentes nutricionales del sustrato (Kamalak *et al.* 2004 y Posada y Noguera 2005) propician con bastante precisión la estimación de la degradabilidad *in vivo* y la digestibilidad aparente de la materia seca de forrajes (Blummel y Orskov 1993 y Blummel *et al.* 1997). Finalmente, no se debe perder de vista el ajuste de los perfiles acumulados de gas a una ecuación apropiada que permite resumir la información cinética (Groot *et al.* 1996, Williams 2000 y Noguera *et al.* 2004). Estas herramientas son de gran ventaja para la evaluación del efecto de una mayor cantidad de sustratos en la fermentación ruminal, con el consecuente ahorro de tiempo y de recursos.

A pesar de lo referido anteriormente, son escasos los estudios que incluyen el efecto de aditivos microbianos activadores, como lo son las levaduras, en la cantidad total de gas producida y la cinética de la fermentación ruminal, durante la fermentación de los forrajes.

Este trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto de diferentes fracciones del cultivo de *S. cerevisiae* en la fermentación ruminal de pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*).

### Materiales y Métodos

Este estudio se llevó a cabo en los Laboratorios de Microbiología Molecular y de Química del Programa de Fisiología y Nutrición Animal de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA), en su sede situada en Tibaitatá, Bogotá.

*Procedimientos, tratamientos y diseño.* Para desarrollar el experimento se utilizó la técnica de producción de gas *in vitro*. Las incubaciones se llevaron a cabo en botellas de vidrio de 50 mL, selladas con tapón de butilo y agrafe. Estas se colocaron en incubadora del equipo automático de medición de la producción de gas a 39 °C, diseñado por Pell *et al.* (1993) y Schofield (1996).

Se evaluaron tres formas de inclusión de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*: 1) medio de cultivo inoculado con *S. cerevisiae*, 2) granulado de la centrifugación del medio de cultivo inoculado y 3) sobrenadante de la centrifugación del medio de cultivo inoculado. Además, se incluyó un control sin levadura.

Se realizó análisis de varianza, según diseño completamente aleatorizado, con cuatro tratamientos para el indicador producción de gas. Se aplicó un diseño bloques al azar para las medidas de pH, degradabilidad de MS, FDN y conteo de poblaciones microbianas ruminales (bacterias totales, celulolíticas y hongos celulolíticos). La producción de gas se midió cada 10 min. El resto de los indicadores se midió a las 24 h. Se llevaron a cabo cuatro réplicas.

El comportamiento de la producción de gas en los diferentes horarios se ajustó mediante el modelo no lineal de Gompertz ( $y=a*\exp(-\exp(b-cx))$ ). Se efectuó la comparación entre tratamientos para los valores estimados de producción de gas por medio de un modelo de clasificación simple. El sistema estadístico utilizado fue SPSS<sup>+</sup> (Visauta 1998)

**Recolección del líquido de rumen filtrado.** El líquido de rumen se recolectó de un toro Holstein, castrado, con tres años de edad y una cánula ruminal. El animal se sometió a pastoreo rotacional en pradera de kikuyo (*Pennisetum clandestinum*), y se le suministró sal mineralizada como suplemento. La extracción del líquido ruminal se realizó una hora después del pastoreo y el animal estuvo en ayuno previo. El contenido fue puesto en termo a 39 °C. Posteriormente, se filtró por cuatro capas de gasa y vertió en una botella de ámbar con gasificación constante de CO<sub>2</sub>. El líquido de rumen filtrado (LRF) se utilizó como mezcla de microorganismos viables para las incubaciones.

**Preparación del inóculo.** La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* en estudio se obtuvo del Banco de cepas del Departamento de Microbiología de la Subdirección de Biotecnología del Instituto Cubano de Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA) con la denominación L/25-7-13. La misma se reactivó y mantuvo en medio YM (Sigma-Aldrich); el pH del medio se ajustó a 4.5. Después de 15 h de crecimiento, el medio se retiró de la incubadora, se realizó el conteo de células en cámara de Neubauer y se ajustó a una concentración de  $7 \times 10^7$  células/mL, lo que se corresponde con 1.47 g/L en base seca. El medio que contenía la levadura viable se centrifugó a 12 000 rpm durante 15 min., para asegurar la separación de la fracción celular del medio y se mantuvo la viabilidad de la levadura. El granulado se resuspendió en medio de dilución para microorganismos anaeróbicos. De esta manera se obtuvieron las tres formas a partir del cultivo de levadura, de las cuales se tomó una alícuota de 1 mL para las incubaciones.

**Sustrato.** Se utilizó como sustrato 100 mg de la gramínea perenne *Cynodon nlemfuensis* (pasto estrella), molida a tamaño de partícula de 2 mm. De este se evaluaron dos fracciones: materia seca y FDN. La composición química fue 14.65; 67.33; 40.17 y 3.92% para la PC, FDN, FDA y lignina, respectivamente. Los

análisis bromatológicos se realizaron según la metodología descrita por la AOAC (1995).

**Muestras y análisis.** El pH se midió a las 24 h de incubación, inmediatamente después de abiertas las botellas. Se tomó una alícuota de cada una para realizar la siembra de poblaciones microbianas. Al contenido remanente dentro de la botella se le adicionó 10 mL de la solución detergente que se emplea en la determinación de FDN, y se introdujo la misma en baño de María a 92°C durante una hora, con el objetivo de remover la biomasa de hongos o de la mezcla de microorganismos adheridos al sustrato. El contenido de cada botella se depositó en bolsas pequeñas de nailon, previamente pesadas, y se lavó con agua destilada caliente para eliminar la solución detergente. Posteriormente, las muestras se lavaron con etanol absoluto al 70 % y se secaron en estufa 60°C durante 48 h. El cálculo del porcentaje de FDN se determinó por la diferencia de peso de las bolsas con el residuo y con el peso inicial.

**Análisis microbiológico.** Se utilizó la técnica de cultivo en tubos roll (Hungate 1970). La siembra de bacterias viables totales y celulolíticas se efectuó en los medios de cultivo de Caldwell y Bryant (1966), modificados por Elías (1971).

## Resultados

Las figuras 1 y 2 muestran los resultados modelados de las producciones de gas para MS y FDN, respectivamente. En todos los tratamientos, la producción de gas acumulada por los microorganismos ruminales se incrementó rápidamente durante el tiempo de incubación, tanto para MS como para FDN. La adición del producto completo de levadura causó marcado incremento en la producción de gas, indicando aumento en la actividad microbiana en la MS y FDN de *C. nlemfuensis*.

En la respuesta a la MS (figura 1), se encontraron diferencias ( $P < 0.05$ ) en este tratamiento con respecto al resto, con producción de gas de 18.74 mL/g de MS. Es importante señalar que en el tratamiento con sobrenadante la producción de gas fue menor que el control, lo que pudiera denotar la presencia de algún compuesto generado en el medio de cultivo de crecimiento de la levadura (sobrenadante) que afectó la fermentación ruminal de la MS del sustrato.

Sin embargo, en la figura 2, que muestra la respuesta a la FDN, se puede observar que no existieron diferencias entre el control y el tratamiento con sobrenadante. Si se tiene en cuenta que la FDN presenta los componentes estructurales de la fibra del sustrato, se podría suponer que la fermentación de estas fracciones no se afecta en presencia de los componentes del sobrenadante, por lo que se deben conducir estudios más profundos para determinar las causas de estos efectos en la producción de gas.

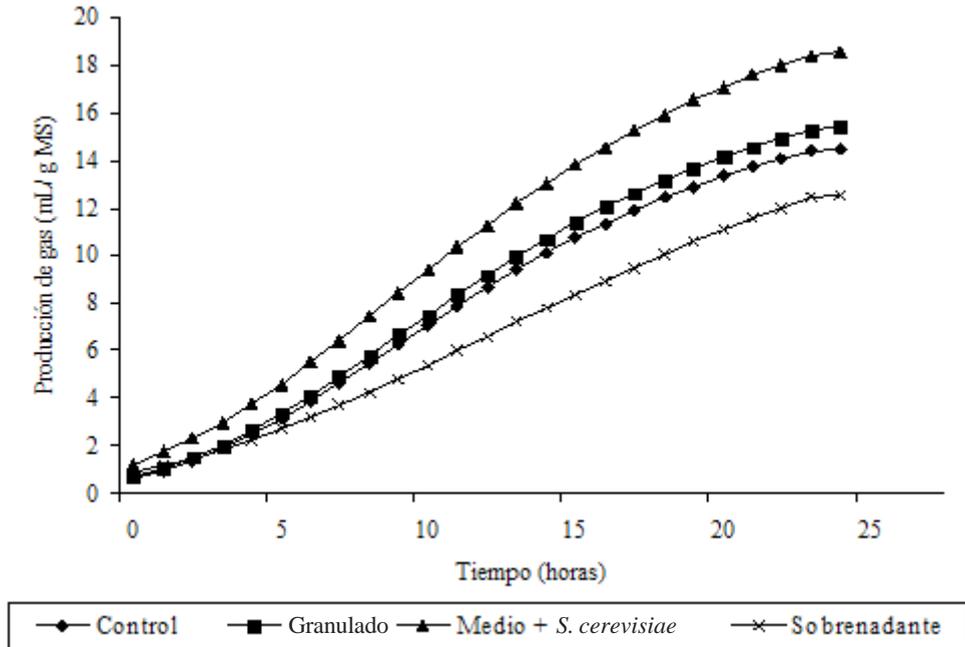


Figura 1. Efecto de la inclusión de *S.cerevisiae* en la producción de gas acumulado con MS de *C. nlemfuensis* como sustrato modelado a través de Gompert .

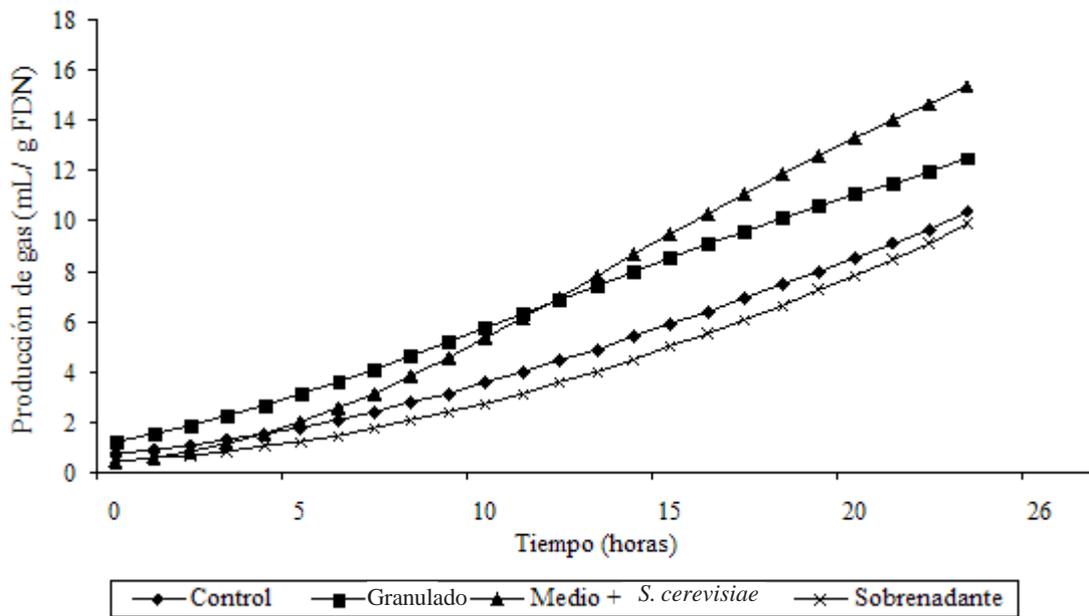


Figura 2. Efecto de la inclusión de *S.cerevisiae* en la producción de gas acumulado con FDN de *C. nlemfuensis* como sustrato modelado a través de Gompertz.

Las tablas 1 y 2 muestran los parámetros que se calcularon a partir de la función exponencial Gompertz para la curva de producción de gas acumulada por la mezcla de microorganismos ruminales en las diferentes formas de inclusión de *S. cerevisiae* sobre la MS y FDN de *C. nlemfuensis*, respectivamente. Cuando se adicionó la levadura y su medio de cultivo en la MS de *C. nlemfuensis*, la fase lag de la curva fue la más baja con respecto al resto de los tratamientos (tabla 1), así también la producción de gas al punto de inflexión fue superior. Esto se puede interpretar como adaptación más rápida de la mezcla de microorganismos ruminales al sustrato. Igual-

mente, este tratamiento presenta la mayor tasa de producción de gas durante la incubación (0.983 mL/h).

La degradación de la FDN de *C. nlemfuensis* en el tratamiento que incluía la levadura en su medio produjo la mayor tasa de producción de gas y mayor cantidad de éste al punto de inflexión, mientras que la adición de granulado disminuyó la fase lag, lo que resultó una menor hora al punto de inflexión.

Los efectos de la adición de *S. cerevisiae* en el pH y porcentaje de degradación de la MS y FDN de *C. nlemfuensis* se presentan en las tablas 3 y 4. La inclusión de la levadura en su medio incrementó ( $P < 0.001$ ) la degradación de la materia seca de *C. nlemfuensis* en

Tabla 1. Parámetros de la función exponencial Gompertz para la curva de producción de gas acumulada en la degradación *in vitro* de MS de *C. nlemfuensis* con diferentes formas de inclusión de *S. cerevisiae*

Parámetro	Tratamiento			
	Control	Granulado	Medio + <i>S.cerevisiae</i>	Sobrenadante
Hora al punto de inflexión	8.892	8.990	8.642	11.979
mL de gas al punto de inflexión	6.161	6.612	8.055	6.574
Tasa máxima de producción de gas	0.816	0.857	0.983	0.602
Fase Lag (h)	1.344	1.279	0.445	1.058

Tabla 2. Parámetros de la función exponencial Gompertz para la curva de producción de gas acumulada en la degradación *in vitro* de FDN de *C. nlemfuensis* con diferentes formas de inclusión de *S. cerevisiae*

Parámetro	Tratamiento			
	Control	Granulado	Medio + <i>S.cerevisiae</i>	Sobrenadante
Hora al punto de inflexión	20.442	11.715	13.163	25.083
mL de gas al punto de inflexión	8.766	6.674	7.931	11.002
Tasa máxima de producción de gas	0.541	0.564	0.848	0.636
Fase Lag (h)	4.241	0.116	3.806	7.789

6.35 percentiles con respecto al tratamiento control, después de 24 h de incubación. El pH mostró los valores más bajos en el tratamiento con sobrenadante (6.60). Aunque se mantuvo por debajo de 6.8 en todos los casos, cuando se incluyó el granulado el pH estuvo más cercano a la neutralidad. Los efectos de la adición de *S.cerevisiae* en el porcentaje de degradación de la FDN de *C. nlemfuensis* muestran que la inclusión de la levadura en su medio incrementó ( $P < 0.05$ ) la misma en 7.42 percentiles, con respecto al tratamiento control, después de 24 h de incubación. La adición del granulado incrementó en tres puntos el porcentaje de degradación, pero no se encontró diferencia con respecto al sobrenadante y el control. A diferencia de la degradación de la MS, el pH tuvo igual comportamiento en todos los casos y se mantuvo aproximadamente en 6.6.

Las figuras 3 y 4 muestran los conteos de bacterias viables totales y celulolíticas determinados a las 24 h después de la incubación de MS y FDN de *C. nlemfuensis*. Con respecto al tratamiento control ( $2.3 \times 10^8$  ufc/mL), la adición de *S.cerevisiae* con diferentes variantes en la MS de *C. nlemfuensis* produjo un estímulo ( $P < 0.05$ ) en el número de bacterias totales ( $4.1 \times 10^8$  ufc/mL), cuando se adicionó la levadura en su medio.

El tratamiento con el granulado incrementó el número de bacterias totales ( $3.0 \times 10^8$  ufc/mL), pero no se encontraron diferencias con respecto a los otros tratamientos. El número de bacterias celulolíticas se incrementó por la adición de la levadura y su medio de cultivo por casi tres veces ( $P < 0.05$ ), con respecto al tratamiento control ( $1.7 \times 10^8$  ufc/mL vs.  $0.6 \times 10^8$  ufc/mL).

Tabla 3. Efecto de la inclusión de *S.cerevisiae* en el pH y la degradación ruminal de la MS *in vitro* de *C. nlemfuensis*

Medidas	Tratamiento				EE(±) Sign.
	Control	Granulado	Medio + <i>S.cerevisiae</i>	Sobrenadante	
pH	6.67 <sup>ab</sup>	6.74 <sup>b</sup>	6.66 <sup>ab</sup>	6.60 <sup>a</sup>	0.03*
Porcentaje de degradación de la MS	62.41 <sup>a</sup>	63.65 <sup>a</sup>	68.76 <sup>b</sup>	60.85 <sup>a</sup>	1.09***

<sup>ab</sup> Letras diferentes dentro de la misma fila difieren a  $P < 0.05$  (Duncan 1955)

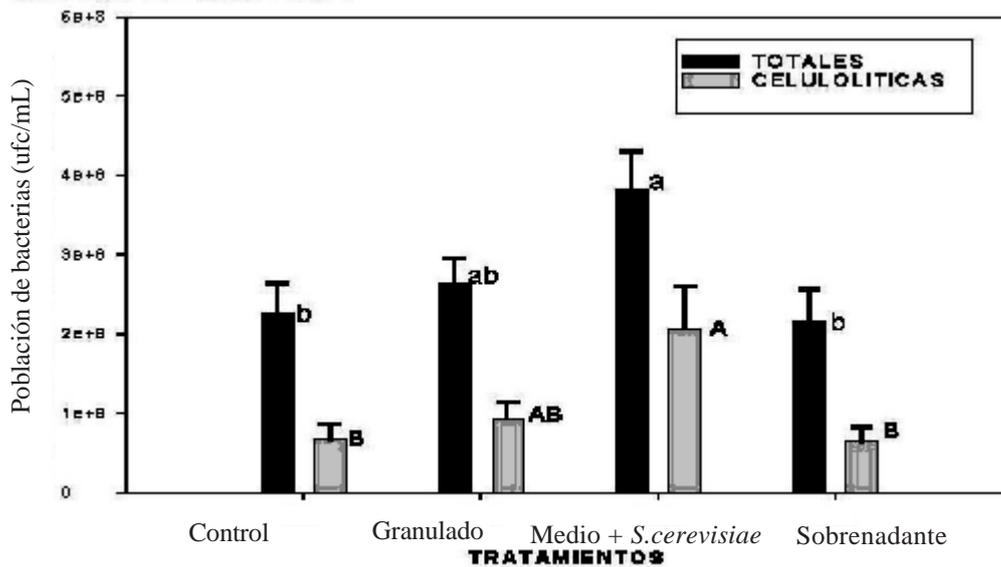
\*  $P < 0.05$  \*\*\*  $P < 0.001$

Tabla 4. Efecto de la inclusión de *S.cerevisiae* en el pH y la degradación ruminal de la FDN *in vitro* de *C. nlemfuensis*

Medidas	Tratamiento				EE(±) Sign.
	Control	Granulado	Medio + <i>S.cerevisiae</i>	Sobrenadante	
pH	6.62	6.60	6.68	6.66	0.045
Porcentaje de degradación de la FDN	46.49 <sup>a</sup>	49.34 <sup>ab</sup>	53.91 <sup>b</sup>	46.88 <sup>a</sup>	1.908*

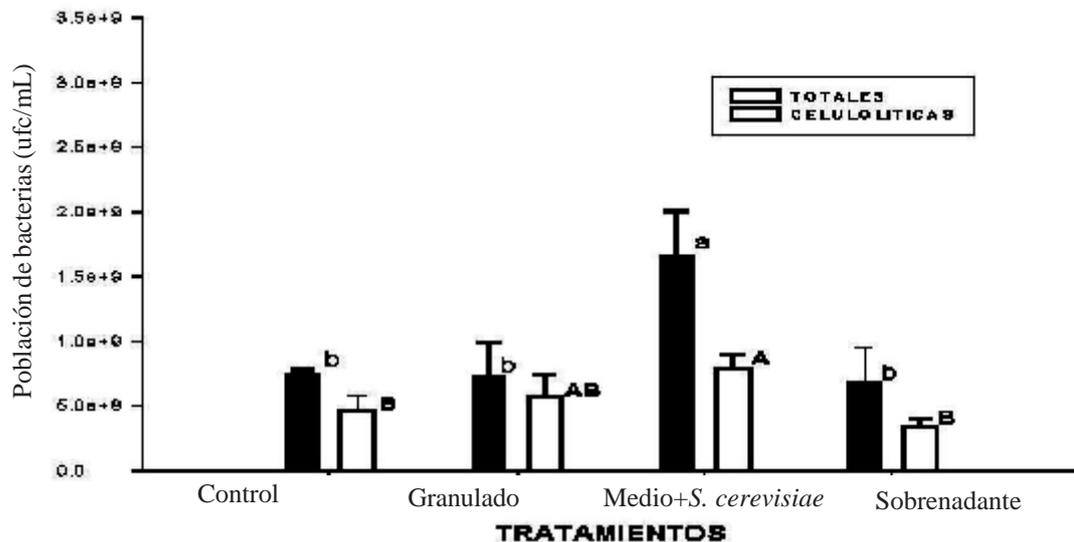
<sup>ab</sup> Letras diferentes dentro de la misma fila difieren a  $P < 0.05$  (Duncan 1955)

$P < 0.05$



<sup>ab</sup> Medias con letras diferentes difieren a P < 0.05

Figura 3. Efecto de la inclusión de *S.cerevisiae* en la población de bacterias totales y celulolíticas en la fermentación *in vitro* de MS de *C. nlemfuensis* ( $\times 10^8$  ufc/mL)



<sup>ab</sup> Medias con letras diferentes difieren a P < 0.05

Figura 4. Efecto de la inclusión de *S.cerevisiae* en la población de bacterias totales y celulolíticas en la fermentación *in vitro* de FDN de *C. nlemfuensis* ( $\times 10^8$  ufc/mL)

En la figura 4 se puede comprobar un aumento ( $P < 0.05$ ) en el número de bacterias totales ( $19.7 \times 10^8$  ufc/mL) en el tratamiento de la levadura en su medio, cuando se compara con el tratamiento control ( $7.5 \times 10^8$  ufc/mL). No hubo diferencia entre el tratamiento con granulado, sobrenadante y control ( $7.33$ ,  $6.92$  y  $7.5 \times 10^8$  ufc/mL, respectivamente). El número de bacterias celulolíticas se incrementó por la adición de la levadura en su medio por casi dos veces ( $P < 0.05$ ) comparado con el tratamiento control ( $7.87 \times 10^8$  vs.  $4.57 \times 10^8$  ufc/mL).

### Discusión

Los resultados de los indicadores estudiados se relacionan estrechamente, lo que permite integrarlos y dar una explicación más completa de las respuestas que

se obtuvieron después de la inclusión de diferentes fracciones del cultivo de *S. cerevisiae* en la fermentación ruminal de *Cynodon nlemfuensis*.

Es necesario señalar que están disponibles varios modelos para la parametrización de los perfiles de degradación (Beuvinck y Kogut 1993), todos con ventajas y desventajas de ajuste estadístico, dependiendo de las condiciones experimentales y del tipo de sustrato. Esto hace necesaria su evaluación, con el propósito de escoger el más apropiado para cada situación, y no la utilización indiscriminada de un único modelo (Noguera *et al.* 2004). La selección del modelo no solo debe tener en cuenta consideraciones matemáticas, sino también el significado biológico de los parámetros (Williams 2000).

Teniendo en cuenta lo anterior, en el presente estudio se escogió el modelo no lineal de Gompertz por ser esta

función, junto a la logística, la que más se utiliza para modelar el crecimiento microbiano en función del tiempo (Gibson *et al.* 1987). La diferencia radica en que aunque las dos son sigmoidales, la función logística es simétrica alrededor del punto de tasa máxima de crecimiento, mientras que la Gompertz es asimétrica.

Con la aplicación de este modelo se encontró aumento en la producción de gas acumulada y la disminución de la fase lag con la inclusión del cultivo de *S.cerevisiae*. Este resultado coincide con lo informado por Rodríguez *et al.* (2004), cuando incluyeron 20 % de cultivo de la misma cepa en el medio de fermentación de leguminosas arbustivas. Sin embargo, estos autores obtuvieron que los efectos de la inclusión de la levadura en la producción de gas por intervalos de tiempo se manifiestan significativamente a las 3 y 6 h post-incubación, y después desaparecen en el tiempo. Esto no coincide con los resultados del presente estudio donde el tiempo al punto de inflexión supera las 8 h para la MS de *C. nlemfuensis*.

Con respecto a este comportamiento, López *et al.* (1998) indicaron que los henos de leguminosas se degradan a una tasa más alta y con mayor rapidez que los henos con alta participación de gramíneas, debido a las características y composición de su fibra. La técnica de producción de gas permite encontrar diferencias entre los sustratos fibrosos que se generan por su madurez, condiciones de crecimiento, especie o cultivar y métodos de preservación (Williams 2000).

Los resultados que se encontraron en este estudio para la degradabilidad de la MS y FDN de *C. nlemfuensis* mostraron que la primera estuvo, aproximadamente, 14 % por encima de la segunda en todos los tratamientos. Este resultado es lógico, si se considera que la FDN contiene solo los constituyentes de la pared celular del vegetal (celulosa, hemicelulosa y lignina), cuya degradación es más baja que la de las fracciones solubles que componen la MS (van Soest 1994).

El aumento de la degradabilidad, tanto para la MS como la FDN de *C. nlemfuensis*, cuando se adicionó la levadura en su medio, coincide con los resultados de Biricik y Turkman (2001), cuando compararon la digestibilidad *in vitro* de MS y FDN de diferentes forrajes, tras la adición de *S.cerevisiae* y encontraron aumento en ambos indicadores. Este resultado se relaciona estrechamente con el incremento en el número de bacterias celulolíticas y totales, registrado después de la inclusión de células vivas de *S. cerevisiae* en su medio de cultivo. Además, permite explicar la respuesta positiva en la tasa de degradación de la fibra *in vitro* y en la producción de gas acumulada.

Este efecto en las poblaciones microbianas ruminales coincide con los resultados de Marrero *et al.* (2006) en un estudio *in vitro* con la misma cepa de levadura, donde indicaron que aunque el medio de cultivo de la levadura (tratamiento con sobrenadante) favorece el crecimiento de la microbiota ruminal, su efecto no es tan estimulante

como cuando la célula de la levadura se incluye en su medio. Lo anterior ratifica lo que proponen Girard y Dawson (1995) acerca de que los suplementos que contienen células no viables no son capaces de estimular el crecimiento microbiano.

Al igual que en estos resultados, Newbold (1995) y Lila *et al.* (2004) encontraron aumentos en las poblaciones de bacterias celulolíticas cuando se incluye levadura *S. cerevisiae*. Esta respuesta, unida al aumento de las bacterias viables totales, es una de las que con mayor frecuencia se repite (Newbold *et al.* 1998 y Chaucheyras y Fonty 2001).

Los anteriores resultados se explican con algunos mecanismos propuestos por varios autores, que se refieren a la acción estimuladora de *S.cerevisiae* en el ecosistema ruminal. Estos plantean el abastecimiento, por parte de la levadura, de ácidos orgánicos o vitaminas que estimulan el crecimiento bacteriano (Martin y Nisbet 1992 y Chaucheyras *et al.* 1995) y la producción de pequeños péptidos estimulantes (Dawson y Girard 1997). Por su parte, Koul *et al.* (1998) y van Veuuren (2003) afirmaron que la mayor parte de la actividad estimuladora de estos microorganismos está asociada a la célula viva.

Con respecto a las respuestas que se observaron en los valores de pH en el tratamiento con sobrenadante en la incubación de MS de *C. nlemfuensis*, se debe tener en cuenta que el pH del medio caldo extracto de malta oscila en  $5.4 \pm 0.2$ . Debe considerarse además, que los metabolitos de excreción de la levadura pudieron provocar la disminución del pH. El hecho de que, en el tratamiento con granulado, el valor de pH se encuentre más cerca de la neutralidad se debe a la mayor proporción de solución buffer que se empleó para resuspender el mismo después de la centrifugación. Estos valores de pH pudieron influir en que en el tratamiento con sobrenadante no se encontraran efectos en las poblaciones de microorganismos ruminales, debido a que los mismos son muy sensibles a cambios en el pH, particularmente las bacterias celulolíticas (Grant y Mertens 1992).

La adición de un agente reductor en el medio de incubación permite afirmar que la acción de la cepa de *S.cerevisiae* no está dada por el consumo del oxígeno del medio, que estimula el crecimiento de las bacterias anaeróbicas, como afirman diferentes autores. Para estudiar este mecanismo de acción de las levaduras en el ecosistema ruminal, Newbold *et al.* (1996) utilizaron mutantes con respiración deficiente de las cepas *S.cerevisiae* NCYC 240 y NCYC 1026 que, previamente a la mutación, demostraron su capacidad de aumentar la tasa de desaparición del oxígeno (entre 46 y 89 %) *in vitro* e incrementaron el número de bacterias viables totales y celulolíticas. Dichos mutantes no lograron esta estimulación, lo que propició a que los autores concluyeran que la actividad estimuladora de *S.cerevisiae* se debe a su actividad respiratoria. Sin embargo, los resultados del presente estudio, con una cepa diferente,

demonstraron que la actividad estimuladora está vinculada a la inclusión de la levadura viva y es independiente a la presencia de oxígeno, ya que los medios de fermentación contaban con cisteína como agente reductor, por lo que la levadura ejerció su acción en condiciones de anaerobiosis. Por otra parte, las levaduras en ambientes carentes de oxígeno cambian inmediatamente su metabolismo y obtienen la energía a través de los procesos de fermentación o respiración anaerobia.

Se comprobó que la inclusión de *S. cerevisiae* en su medio de cultivo favorece los procesos fermentativos *in vitro* que llevan a cabo las poblaciones de bacterias viables totales y celulolíticas, en la MS y FDN de *C. nlemfuensis*. Esto se refleja en un aumento en la degradabilidad y, por tanto, en la producción de gas. Los metabolitos, determinados por el crecimiento de la levadura en condiciones anaeróbicas, son los responsables de la estimulación de la microbiota ruminal, aunque aún queda por dilucidar la naturaleza de los mismos.

### Referencias

- AOAC. 1995. Official Method of Analysis. 16<sup>th</sup> Ed. Ass. Off. Agric. Chem. Washington, D.C.
- Ángeles, C.S., Mendoza, G.D., Castrejón, P.F. & Cobos, P.M. 1995. Evaluación de dos cultivos de levadura SC a dosis comercial sobre la población de protozoarios y el metabolismo ruminal en ovinos alimentados con una dieta a base de rastrojos de maíz. Rev. Argentina Prod. Animal. 15:549
- Beuvink, J. M. & Kogut, J. 1993. Modeling gas production kinetics of grass silages incubated with buffered ruminal fluid. J. Animal Sci. 71:1041
- Biricik, H. & Turkmen, I.I. 2001. The effect of *Saccharomyces cerevisiae* on *in vitro* rumen digestibilities of dry matter, organic matter and neutral detergent fibre of different forage:concentrate ratios in diets. Veteriner Fakultesi Dergisi, Uludag University. 20:29
- Blümmel, M., Makkar, H.P.S. & Becker, K. 1997. *In vitro* gas production: a technique revisited. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 77:24
- Blümmel, M. & Orkov, E.R. 1993. Comparison of gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. Anim. Feed Sci. Tech. 40:109
- Caldwell, D.R. & Bryant, M.P. 1966. Medium without fluid for non selective enumeration and isolation of rumen bacteria. Appl. Microb. 14:794
- Chaucheyras, F. & Fonty, G. 2001. Establishment of cellulolytic bacteria and development of fermentative activities in the rumen of gnotobiotically-reared lambs receiving the microbial additive *S. cerevisiae* CNCM I-1077. Reprod Nutr Dev. 41:57
- Chaucheryras, F., Fonty, G., Bertin, G. & Gouet, P. 1995. Effects of live *Saccharomyces cerevisiae* cells on zoospore germination, growth, and cellulolytic activity of the rumen anaerobic fungus, *Neocallimastix frontalis* MCH 3. Curr. Micro. 31:201
- Dawson, K.A. & Girard, I.D. 1997. Biochemical and physiological basis for the stimulatory effects of yeast preparations on ruminal bacteria. En: Biotech. Feed Industry. Eds. T.P. Lyons & K.A. Jacques. University Press, Nottingham, UK. p. 293
- Doreau, M. & Jouany, J.P. 1998. Effect of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on nutrient digestion in lactating dairy cows. J. Dairy. Sci. 81:3214
- Duncan, D. B. 1955. Multiple range and multiple F. tests. Biometrics 11:1
- Elías, A. 1971. The rumen bacteria of animals fed on a high molasses-urea diet. Thesis Ph.D, Aberdeen
- Gibson, A.M., Bratchell, N. & Roberts, T.A. 1987. The effects of sodium chloride and temperature on the rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry. J. Appl. Bacteriol. 62:479
- Girard, I.D. & Dawson, K.A. 1995. Stimulation of ruminal bacteria by different fractions derived from cultures of *Saccharomyces cerevisiae* strain 1026. J. Anim. Sci. 73:264
- Grant, R. J. & Mertens, D. R. 1992. Development of buffer systems for pH control and evaluation of pH effects on fiber digestion *in vitro*. J. Dairy Sci. 75:1581
- Groot, J. C., Cone, J. W., Williams, B. A., Debersaques, F. M. & Lantinga, E.A. 1996. Multiphasic analysis of gas production kinetics for *in vitro* fermentation of ruminant feeds. Animal Feed Sci. Tech. 64:77
- Hungate, P.E. 1970. A roll tube method for cultivation in microbiology. Eds. J.B. Morris, D.B. Ribbons. New York, Academic Press, Inc. p. 117
- Kammal, A., Canbolat, O., Gurbuz, Y., Ozay, O. & Ozkose, E. 2004. Variation in metabolizable energy content of forages estimated using *in vitro* gas production technique. Pakistan J. Biol. Sci. 7:601
- Koul, V., Kumar, U., Sareen, V.K. & Singh, S. 1998. Mode of action of yeast culture (Yea-Sacc 1026) for stimulation of rumen fermentation in buffalo calves. J. Sci. Food. Agric. 77:407
- Lila, Z.A., Mohammed, N., Yasui, T., Kurokawa, Y., Kanda, S. & Itabashi, H. 2004. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* twin of live cells on mixed ruminal microorganism fermentation *in vitro*. J. Dairy Sci. 82:1847
- López, S., Carro, M.D., González, J.S. & Ovejero, F. J. 1998. Comparison of different *in vitro* and *in situ* methods to estimate the extent and rate of degradation of hays in the rumen. Animal Feed Sci. Tech. 73: 99
- Marrero, Y., Galindo, J., Elías, A., Moreira, O. & Cueto, Milbis. 2006. Effect of biological preparations with viable yeasts on the microbial population in rumen and fermentative indicators in cows fed fibrous diets. Cuban Journal of Agricultural Science, 40:321
- Martin, S.A. & Nisbet, D.J. 1992. Effect of direct-fed microbials on rumen microbial fermentation. J. Dairy Sci. 75:1736
- Newbold, C.J. 1995. Microbial feed additives for ruminants. En: Biotechnology in Animal Feeds and Animal feeding. Eds. A. Chesson, R.J. Wallace. VCH Weinheim, Germany. p. 259
- Newbold, C.J., McIntosh, F.M. & Wallace, R.J. 1996. Mode of action of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, as a feed additive for ruminants. Br. J. Nutr. 76: 249
- Newbold, C.J., McIntosh, F.M. & Wallace, R.J. 1998. Changes in the microbial population of a rumen-simulating fermenter in response to yeast culture. Canadian J. Animal Sci. 78:241
- Noguera, R. R., Saliba, E.O. & Mauricio, R.M. 2004. Comparación de modelos matemáticos para estimar los parámetros de degradación obtenidos a través de la técnica de producción de gas. Liv. Res. Rural Dev. 16:86

- Pell, A.N., Schofield, P. & Stone, W.C. 1993. Rates of digestion measured *in vitro* computers. Cornell Nutr. Conf. For Fed Manufacturers. pp. 74-81
- Posada, L.S. & Noguera, R.R. 2005. Técnica *in vitro* de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. Livestock Research for Rural Development. 17:4
- Pulido, R G. 1997. Interactions of pasture conditions, concentrate supplementation and milk yield level in relation to dairy cow performance and behaviour. Ph.D. Thesis. University of London. P. 264
- Rodríguez, R., Oramas, A. & Marrero, Y. 2004. Efecto de la adición de *Saccharomyces cerevisiae* en la cinética de fermentación *in vitro* y la colonización de la fibra de cuatro leguminosas arbustivas tropicales. Informe técnico. Instituto de Ciencia Animal. La Habana. Cuba
- Schofield, P. & Pell, A.N. 1995a. Validity of using accumulated gas pressure readings to measure forage digestion *in vitro*: a comparison involving three forages. J. Dairy Sci. 78: 2230
- Schofield, P. & Pell, A.N. 1995b. Measurement and kinetic analysis of the neutral detergent-soluble carbohydrate fraction of legumes and grasses. Journal of Animal Science. 73:3455
- Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McAllan, A.D.B & France, J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds, Anim Feed Sci. Tech. 48:185
- Revista Cubana de Ciencia Agrícola, Tomo 44, Número 2, 2010.
- Van Soest, P.J 1994. Nutritional Ecology of the Ruminant- Cornell University Press, Ithaca, NY. pp. 140-155
- Van Vuuren, A.M. 2003. Role of Probiotics in Animal Nutrition and their link to the demands of European consumers. Internatinal one-day seminar: Lelystad.
- Visauta, B. 1998. Análisis estadístico con SPSS para Window. Estadística multivariada. Vol II. Mc Graw-Hill/ Interamericana de España, S.A.V. p. 358
- Williams, A.G. 1991. The biochemical activities and importance of the ciliated protozoa in the rumen ecosystem. En: Biochemical protozoology. Eds. Coombs, G.H and North, M.J. London. Washington. pp. 61-79
- Williams, B. A. 2000. Cumulative gas-production techniques for forage evaluation. En: Forage Evaluation in Ruminant Nutrition. Eds. Givens, D. I., Owen, E., Omed, H. M. and Axford, R F E. Wallingford (UK). CAB International. 475 pp.
- Wohlt, J.E., Corcione, T.T. & Zajac, P.K. 1998. Effect of yeast on feed intake and performance of cows fed diets based on corn silage during early lactation., J. Dairy Sci. 81:1345

**Recibido: 18 de septiembre de 2008**