

## Efecto de preparados con levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y LEVICA-25 viables en los metanógenos y metanogénesis ruminal *in vitro*

Juana Galindo, Yoandra Marrero, Niurca González, Areadne Sosa, Ana L. Miranda, Ana I. Aldana, Onidia Moreira, R. Bocourt, Denia Delgado, Verena Torres, Lucía Sarduy y Aida Noda  
 Instituto de Ciencia Animal, Apartado Postal 24, San José de las Lajas, La Habana, Cuba  
 Correo electrónico: jgalindo@ica.co.cu

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de preparados con levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y LEVICA -25 viables, en los metanógenos y metanogénesis ruminal *in vitro*. El experimento se condujo mediante la técnica de cultivo sumergido. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado. Los tratamientos fueron: A) control, B) *Saccharomyces cerevisiae* y C) LEVICA 25. Los muestreos se efectuaron antes de incubar (hora 0) y a las 4, 8, 12 y 24 h después de iniciada la fermentación. Como sustrato a fermentar se utilizó el pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*). *Saccharomyces cerevisiae* y LEVICA 25 redujeron la población de metanógenos. Sus poblaciones a las 4 h fueron 268; 56.33 y 49.33 x 10<sup>-10</sup> ufc mL<sup>-1</sup> para el control, *S. cerevisiae* y LEVICA 25, respectivamente. La producción de metano en el rumen a las 24 h de fermentación fue 78.97; 45.21 y 21.52 µL para el tratamiento control de pasto estrella, *S. cerevisiae* y LEVICA 25, respectivamente. *S. cerevisiae* incrementó en 1.75 veces la población de bacterias celulolíticas y LEVICA 25 multiplicó por 2.25 la población de viables totales. El número de protozoos fue 12.55; 16.30 y 17.55 x 10<sup>-5</sup> células mL<sup>-1</sup> para los tratamientos A, B y C, respectivamente. Se concluye que los preparados con levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y LEVICA -25 reducen los metanógenos y la metanogénesis ruminal, lo que brinda la posibilidad de utilizarlos para mejorar la eficiencia de utilización de la energía en rumiantes, lo que pudiera contribuir a mitigar el impacto de estos gases al medio.

Palabras clave: *Saccharomyces cerevisiae*, LEVICA 25, metanógenos, rumen, metano, energía

Los rumiantes producen aproximadamente 97 % del metano generado por los animales domésticos. El sitio principal de formación de metano es el rumen y se produce como una consecuencia inevitable de la fermentación de los carbohidratos por los microorganismos que habitan en ese reservorio (Johnson *et al.* 2000).

Este gas es uno de los que más contribuye al efecto invernadero. Es el responsable del 18 % de este fenómeno (Moss *et al.* 2000 y Beauchemin y McGinn 2005). Se emite a la atmósfera mediante la eructación, y la cantidad que se libera depende del volumen y tipo de alimento que consumen los animales. Su producción es menor en dietas bajas en fibra (Gil 2004).

La emisión de metano, no solo constituye un problema ecológico, también representa gran pérdida de la energía del alimento y disminuye la productividad de los animales (Johnson *et al.* 2000 y Anderson *et al.* 2003). Se estima que más de 10 % de la energía bruta que contienen los alimentos se pierde en forma de metano.

Se ha demostrado que las prácticas de alimentación que aumentan el consumo y la velocidad de digestión o acortan el tiempo de permanencia de los alimentos en el rumen, disminuyen la producción de metano por unidad de forraje digerido. Al respecto, la utilización de preparados microbianos con levaduras viables puede ser una opción atractiva, debido a su importante función como manipuladoras de la fermentación ruminal.

Resultados recientes de Marrero (2005), obtenidos en el Instituto de Ciencia Animal de Cuba, corroboran la acción de las levaduras como activadoras de la fermentación ruminal. En las condiciones de

alimentación con dietas fibrosas de baja calidad, aún no se ha evaluado el efecto particular de las levaduras en la población de metanógenos y de metano. La experiencia que se obtuvo al manejar estas cepas de levaduras en el rumen indicó que las mismas actúan de alguna manera en el metabolismo energético de los animales rumiantes.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de preparados con levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y LEVICA -25 viables en los metanógenos y metanogénesis ruminal *in vitro*.

### Materiales y Métodos

*Tratamientos experimentales.* Se evaluaron tres tratamientos: A) pasto estrella (control); B) *Saccharomyces cerevisiae*, y C) LEVICA 25.

Para la preparación de la dieta vegetal se recolectó, aproximadamente, 1 kg de pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*), semejando el pastoreo que hacen los animales. El material recolectado se secó en estufa a 60 °C durante 48 h. Se molió hasta alcanzar tamaño de partícula de 1 mm. Su composición química se determinó según AOAC (1995) y fue (% de MS): 7.26; 74.57; 10.11; 0.42 y 0.18 de PB, FDN, ceniza, calcio y fósforo, respectivamente.

La cepa *Saccharomyces cerevisiae* (L- 25-7-13), procedía del banco de cepas del Instituto Cubano de Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA).

LEVICA - 25 es una cepa de levadura que no pertenece al género *Saccharomyces*. Se aisló del rumen de toros Holstein que recibieron en su ración un preparado microbiano con levaduras y Lactobacilos viables (Marrero 2005).

*Procedimiento experimental.* El experimento se condujo en condiciones *in vitro*, para lo cual se aplicó la técnica de Theodorou *et al.* (1994), donde se utilizan botellas de 100 mL selladas para incubar las muestras de alimento en líquido ruminal y un medio amortiguador.

En cada botella se introdujeron 20 mL de la mezcla integrada por líquido de rumen y solución amortiguadora en una relación de una parte de líquido ruminal, dos partes de solución amortiguadora.

El inoculo ruminal se obtuvo a partir de dos búfalos canulados en rumen, los que se encontraban en pastoreo de pasto estrella, con libre acceso al agua. Se suplementaron con 1 kg/d de pienso comercial. La muestra de líquido ruminal se recolectó mediante la cánula, con la ayuda de una bomba de vacío. Se conservó en un termo herméticamente cerrado hasta su traslado al laboratorio, donde posteriormente se filtró a través de muselina. Para conformar la mezcla a fermentar, se utilizó el líquido ruminal de los dos búfalos, con el propósito de eliminar el efecto animal.

Los frascos de fermentación que contenían el material a evaluar (BS) se esterilizaron previamente a 121 °C y 1.5 atm, durante 15 min. El procedimiento se realizó en atmósfera de CO<sub>2</sub>, con el propósito de garantizar las condiciones de estricta anaerobiosis.

La tabla 1 muestra el procedimiento que se empleó para la preparación de los tratamientos experimentales. La concentración en levaduras vivas en ambos preparados fue del orden de 10<sup>7</sup> células mL<sup>-1</sup>.

Tabla 1. Procedimiento para la preparación de los tratamientos experimentales

Tratamiento	Pasto estrella, g	Líquido rumen, mL	Solución amortiguadora, mL	Preparado levadura, mL	Total, mL
Control	0.2	4.0	16.0	-	20.0
Control + <i>S. cerevisiae</i>	0.2	4.0	12.0	4.0	20.0
Control + LEVICA -25	0.2	4.0	12.0	4.0	20.0
Blanco	-	4.0	16.0	-	20.0

Los muestreos para la determinación de las poblaciones de bacterias viables totales, celulolíticas y metanogénicas, se efectuaron antes de incubar (hora 0), a las 4 y 8 h después de iniciada la fermentación. Para la determinación de los indicadores de la fermentación y la población de protozoos, los muestreos se hicieron a las 0; 4; 8; 12 y 24 h. Se replicó cuatro veces en tiempo, según la metodología descrita por Torres *et al.* (2003). El pH se midió en pH- metro digital marca WPA.

*Técnicas de cultivo y conteo de microorganismos.* Se utilizó la técnica de cultivo de Hungate (1970) en tubos rodados y en condiciones de anaerobiosis estricta para determinar las poblaciones de bacterias viables totales, celulolíticas y metanogénicas.

La siembra de bacterias viables totales y celulolíticas se efectuó en los medios de cultivo de Caldwell y Bryant (1966), modificados por Elías (1971) y Galindo (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. El medio de cultivo fue descrito según Anderson y Horn (1987). El número de unidades formadoras de colonia y de talo se determinó con una lupa, por conteo visual de aparición de las colonias en los tubos rodados.

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. Posteriormente, 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%.

La población de levaduras viables se determinó mediante el método de Paiting y Kirsop (1990). El diseño experimental que se utilizó fue completamente aleatorizado en arreglo factorial 3 x 3, (tres tratamientos y tres horas de muestreo) para los indicadores microbiológicos, y 3 x 5 (tres tratamientos, cinco tiempos de muestreo) para los fermentativos (pH, producción de gas, metano).

*Tratamiento estadístico a los conteos de microorganismos.* Se utilizó el análisis de varianza multivariado, según Torres *et al.* (2003) para el análisis de la interacción de los tratamientos con los tiempos de fermentación.

Se aplicó la dócima de Duncan para P < 0.05 en los casos necesarios. Los análisis estadísticos se realizaron

con los paquetes estadísticos SPSS<sup>+</sup> (Visauta 1998) y Info Stat (2002).

Los conteos de microorganismos se transformaron según Log N, para garantizar las condiciones de normalidad en la curva de crecimiento. Para el análisis se aplicó la fórmula (K+N).10<sup>x</sup>, donde:

K = constante que representa el logaritmo de la dilución en la cual se inoculó el microorganismo

N = logaritmo del conteo de colonias, determinado como ufc mL<sup>-1</sup>, uft mL<sup>-1</sup>, o células mL<sup>-1</sup>

10 = base de los logaritmos

X = dilución a la que se efectuó la inoculación

## Resultados

Se encontró interacción significativa (P < 0.01) entre los tratamientos y tiempos de muestreo, para la medida de bacterias viables totales. En la figura 1 se muestra el efecto de *Saccharomyces cerevisiae* y LEVICA 25,

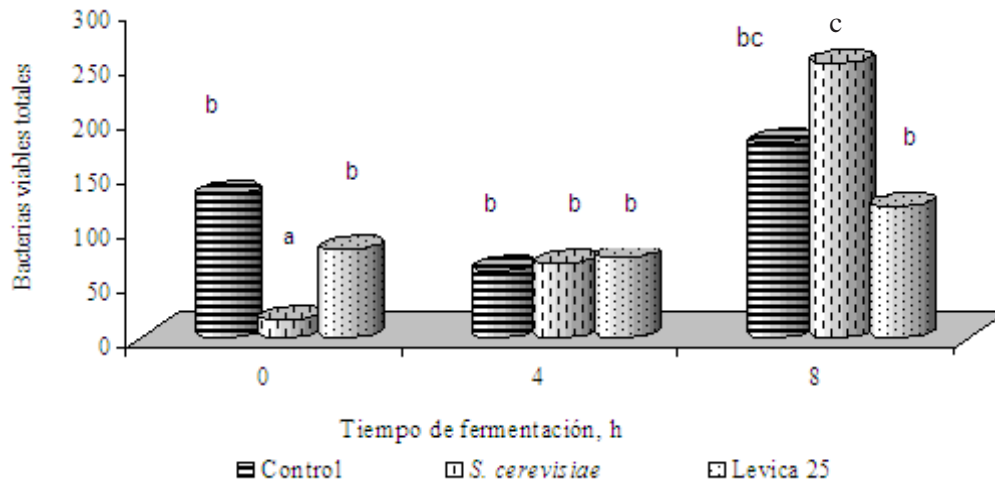


Figura 1. Efecto de las levaduras y el tiempo de fermentación en la población de bacterias viables totales del rumen *in vitro*, 10<sup>11</sup> ufc mL<sup>-1</sup>, EE ±0.30 \*\*\*

así como del tiempo de fermentación en la población de bacterias viables totales del rumen *in vitro*.

Antes de incubar (hora 0), las poblaciones de bacterias viables totales fueron superiores en el tratamiento control y en el que se incluyó LEVICA 25, con respecto al preparado con *S. cerevisiae*. A la hora 4 se comenzó a observar el efecto de los preparados microbianos, sin diferencias entre *S. cerevisiae* y LEVICA 25 con respecto al control.

Sin embargo, a las 8 h el preparado con *S. cerevisiae* propició las mayores poblaciones de bacterias viables totales, incluso cuando se utilizó el aditivo con LEVICA 25 las poblaciones de bacterias viables fueron menores que en el tratamiento sin aditivo, aunque no presentaron diferencias estadísticas.

Se encontró interacción significativa ( $P < 0.001$ ) entre los tratamientos (nivel) y los tiempos de muestreo para el indicador metanógenos. Al respecto, la figura 2 muestra que la población de bacterias metanogénicas se redujo, cuando se utilizaron los

preparados microbianos con las levaduras *S. cerevisiae* y LEVICA 25 en todas las horas de muestreo, excepto antes de fermentar (hora 0). Se pudo apreciar que a las 4 h después de iniciada la fermentación, no hubo diferencias entre las dos levaduras que se emplearon. A las 8 h, *S. cerevisiae* ejerció mayor disminución de este grupo microbiano en relación a LEVICA 25.

No se encontró interacción significativa entre los tratamientos y las horas de muestreo, para el caso particular de las bacterias celulolíticas. La utilización de preparados microbianos con las levaduras viables aumentó la población de bacterias celulolíticas del rumen (figura 3). *S. cerevisiae* incrementó en 1.75 veces esta población, mientras que LEVICA 25 multiplicó por 2.25 el número total de bacterias celulolíticas del rumen.

En la tabla 2 se muestra que el pH se mantuvo entre los valores 6.34-6.68, que se consideran normales para la fermentación de dietas fibrosas de baja calidad. *S. cerevisiae* no modificó el pH del rumen, mientras que

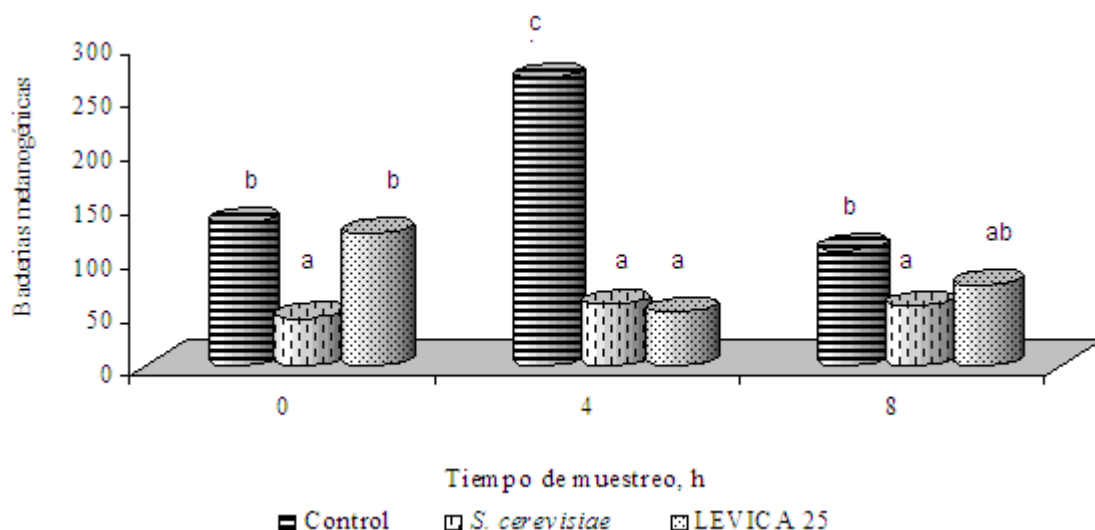


Figura 2. Efecto de las levaduras y el tiempo de fermentación en la población de metanógenos (10<sup>10</sup> ufc mL<sup>-1</sup>), EE ±0.26\*\*\*

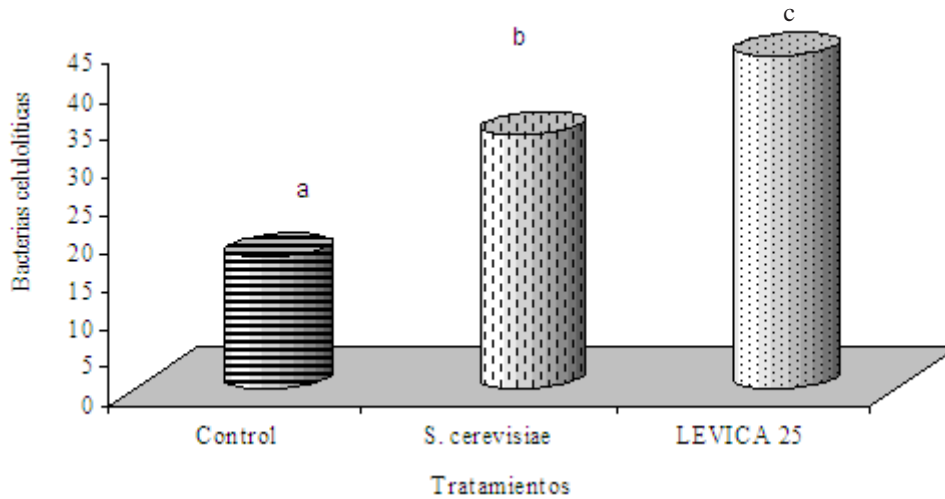


Figura 3. Efecto de *S. cerevisiae* y LEVICA 25 en la población de bacterias celulolíticas *in vitro*, 10<sup>6</sup> ufc mL<sup>-1</sup>, EE ± 0.16\*\*

Tabla 2. Efecto de *S. cerevisiae* y LEVICA en la población de protozoos y pH del rumen *in vitro*

Indicador	Control	<i>S. cerevisiae</i>	LEVICA 25	EE (±)	Sig.
Protozoos, 10 <sup>5</sup> células mL <sup>-1</sup>	2.46 <sup>a</sup> (12.55)	2.75 <sup>b</sup> (16.30)	2.81 <sup>b</sup> (17.55)	0.05***	
pH	6.68 <sup>b</sup>	6.63 <sup>b</sup>	6.34 <sup>a</sup>	0.04***	

<sup>a, b</sup> Medias con letras diferentes dentro de una misma fila, difieren a  $P < 0.05$  (Duncan, 1955). Datos transformados según Ln X; medias originales entre paréntesis \*\*\*  $P < 0.001$

LEVICA 25 lo redujo. Este efecto debe considerarse en estudios futuros, donde se incluya esta levadura.

Tanto *S. cerevisiae* como LEVICA 25 incrementaron la población de protozoos del rumen.

La población de bacterias celulolíticas no se modificó en el tiempo de fermentación, como se muestra en la tabla 3.

La población de protozoos se incrementó en las horas de máxima fermentación microbiana, es decir a las 4, 8 y 12 h. Hacia las 24 h, el comportamiento fue igual que antes de iniciar la fermentación.

El pH del rumen no se modificó a las 4 y 8 h, en relación a la hora 0 (antes de iniciar la fermentación). A las 12 h, el pH se redujo de manera significativa ( $P < 0.001$ ), y continuó su reducción a las 24 h. Al respecto, se debe destacar que el pH se redujo desde 6.77 hasta 6.17.

La inclusión de preparado microbiano con LEVICA 25 incrementó la producción de gas *in vitro* (tabla 4). *S. cerevisiae* produjo valores de gas intermedios entre el control y LEVICA 25.

La producción de gas se modificó con respecto al tiempo de fermentación y se encontraron los mayores valores a las 24 h de fermentación.

A las 4 h, en condiciones de fermentación *in vitro*, la producción de metano fue 78.97; 45.21 y 21.52  $\mu\text{L}$  para el tratamiento control de pasto estrella, *S. cerevisiae* y LEVICA 25, respectivamente. Esto demuestra las potencialidades de las levaduras como manipuladoras de la fermentación ruminal y reductoras de la metanogénesis en ese órgano (tabla 5). El tiempo de fermentación tuvo su influencia en la producción de metano en rumen, la cual se incrementó a partir de las 8 h, sin diferencias entre las 12 y 24 h.

Tabla 3. Efecto del tiempo de fermentación en la población de bacterias celulolíticas, protozoos y pH del rumen *in vitro*.

Indicador	Tiempo, h					EE (±)	Sig
	0.0	4.0	8.0	12.0	24.0		
Bacterias celulolíticas, 10 <sup>6</sup> ufc mL <sup>-1</sup>	3.38 (38.56)	3.05 (27.33)	3.14 (28.56)	-	-	0.16	
Protozoos, 10 <sup>5</sup> células mL <sup>-1</sup>	2.50 <sup>a</sup> (12.79)	2.84 <sup>b</sup> (17.67)	2.93 <sup>b</sup> (19.63)	2.76 <sup>b</sup> (16.33)	2.34 <sup>a</sup> (10.92)	0.07***	
pH	6.77 <sup>c</sup>	6.61 <sup>c</sup>	6.78 <sup>c</sup>	6.41 <sup>b</sup>	6.17 <sup>a</sup>	0.05***	

<sup>a, b, c</sup> Medias con letras diferentes dentro de una misma fila, difieren a  $P < 0.05$  (Duncan 1955). Datos transformados según Ln X; medias originales entre paréntesis \*\*\*  $P < 0.001$

Tabla 4. Efecto de las levaduras y el tiempo de fermentación en la producción de gas *in vitro* a las 24 h de fermentación, mL g MS<sup>-1</sup>

Tratamientos				
Control	<i>S. cerevisiae</i>	LEVICA 25	-	EE (±) Sig
27.51 <sup>a</sup>	37.08 <sup>ab</sup>	55.01 <sup>b</sup>	-	5.96*
Tiempo, h				
4.0	8.0	12.0	24.0	
10.55 <sup>a</sup>	31.68 <sup>ab</sup>	45.57 <sup>b</sup>	71.67 <sup>c</sup>	6.89 ***

<sup>a, b, c</sup> Medias con letras diferentes dentro de una misma fila difieren a P < 0.05 (Duncan 1955). \* P < 0.05 \*\*\* P < 0.001

Tabla 5. Efecto de las levaduras y el tiempo de fermentación en la producción de metano *in vitro* a las 24 h de fermentación, l

Tratamientos				
Control	<i>S. cerevisiae</i>	LEVICA 25		EE (±) Sig
78.97 <sup>c</sup>	45.21 <sup>b</sup>	21.52 <sup>a</sup>		6.74**
Tiempo, h				
4.0	8.0	12.0	24.0	9.32*
13.12 <sup>a</sup>	56.54 <sup>b</sup>	59.61 <sup>b</sup>	64.99 <sup>b</sup>	

<sup>a, b</sup> Medias con letras diferentes dentro de una misma fila difieren a P < 0.05 (Duncan 1955). \* P < 0.05 \*\* P < 0.01

### Discusión

La aplicación de diferentes estrategias orientadas a reducir la metanogénesis ruminal ha alcanzado gran auge en los últimos años (Moss 2002 y Dumitru *et al.* 2003). Entre ellas, son de gran valor las dirigidas a incrementar la eficiencia de utilización digestiva de los alimentos fibrosos para los sistemas de alimentación vacuna de los países tropicales.

En el trabajo se evidenció que el empleo de levaduras viables, tanto *S. cerevisiae* como LEVICA – 25, constituye una opción adecuada para inhibir la producción de metano, ya que incrementa la población de bacterias capaces de fermentar los materiales fibrosos en el rumen. Esto contribuirá, sin dudas, a mayor digestibilidad de los materiales fibrosos. En trabajos desarrollados por Marrero (2005) y Marrero *et al.* (2008), al evaluar el efecto de levaduras viables en la población de bacterias celulolíticas en animales que consumieron dietas fibrosas de baja calidad, se informaron resultados similares. Además, estos resultados coinciden con los reportes de Newbold *et al.* (1991) y Carro y Ranilla (2002).

De igual manera, los incrementos en las poblaciones de bacterias viables totales que se obtienen cuando se emplean cepas de levaduras como aditivos en dietas para rumiantes fueron informados por Martin y Nisbet (1992), Wallace y Newbold (1992) y Dawson y Girard 1997. Esto pudiera estar dado porque las levaduras proveen de factores de crecimiento, vitaminas del complejo B, principalmente, y otros micronutrientes que estimulan el crecimiento de las bacterias (Wiedmier *et al.* 1987, Beharka y Nagaraja 1991 y Newbold *et al.* 1995)

Se han utilizado diferentes preparados microbianos con levaduras viables, reconocidos como activadores de la fermentación ruminal (Diamond VXP, BIOSAF, *S. cerevisiae* NCYC 1026 y NCYC 240, entre otros). Estos constituyen una de las vías más empleadas en el mundo para mejorar la eficiencia de utilización de los nutrientes en rumiantes. Al respecto, Dawson (1987) indicó que estos incrementan el número de bacterias celulolíticas y bacterias totales del rumen, así como también la concentración de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) (Beharka y Nagaraja 1991) y el pH ruminal. En la literatura internacional disponible existen incertidumbres con respecto al efecto que ejercen los preparados con levaduras viables en el pH del rumen. Varios autores comprobaron que diferentes cepas de *S. cerevisiae* pueden aumentar el pH (Rader 1999 y Kamra *et al.* 2002) o disminuir su variabilidad en dietas altas en concentrado (Williams *et al.* 1991 y Jeong *et al.* 1998), al parecer por estimulación de las poblaciones que consumen lactato. En general, cuando se utilizan dietas altas en fibra no se encuentran respuestas en el pH, fundamentalmente debido a que en estas dietas el pH se encuentra en valores cercanos a la neutralidad.

Con respecto a la producción de metano y el pH, Thauer y Shima (2006) señalaron que las bacterias anaerobias metanógenas son el principal factor biótico a nivel de rumen que interviene en la producción de metano. Estas utilizan diferentes sustratos, pero los principales son el H<sub>2</sub> y el CO<sub>2</sub>. La eliminación de estos gases, principalmente del H<sub>2</sub>, garantiza la estabilidad del pH, lo que favorece una óptima fermentación ruminal.

La inclusión de células vivas de *S. cerevisiae* L/25-7-13 en su medio de cultivo provocó aumento en la producción de gas acumulada y disminución de la fase lag, así como incremento de la degradabilidad, tanto para la MS como para la FDN de *C. nlemfuensis*, en condiciones *in vitro*. Igualmente, la inclusión de esta levadura en la fermentación de cuatro leguminosas tropicales, *Leucaena leucocephala*, *Acacia cornigera*, *Albizia lebbekoides* y *Enterolobium cyclocarpum*, redujo la fase lag, pero no modificó la razón de colonización de la fibra (Rodríguez *et al.* 2006).

Cuando se inicia el proceso fermentativo, los microorganismos comienzan su etapa de crecimiento y

reproducción, a partir de la disponibilidad de sustratos. Es lógico que entre las 2-8 h, después de iniciada la fermentación, se encuentre la máxima población microbiana y luego, como consecuencia del agotamiento de las fuentes alimenticias, comience la fase de decrecimiento microbiano. No existe una explicación convincente para argumentar el resultado que se obtuvo en este experimento. De cualquier manera, se deben efectuar estudios posteriores que permitan dilucidar el comportamiento que manifestó la población de bacterias celulolíticas durante el tiempo de fermentación.

Los protozoos son microorganismos que tienen gran importancia, ya que son capaces de fermentar los azúcares y almidones en el rumen, además muchos de ellos son celulolíticos. Sin embargo, su alta presencia en el rumen de animales que consumen dietas fibrosas de baja calidad no es conveniente, ya que compiten con el resto de los microorganismos por los principios nutritivos, tienen altos requerimientos de nitrógeno y pudieran empeorar la situación nutricional de los animales (Galindo *et al.* 2009).

Se conoce que los protozoos guardan una relación de endosimbiosis con las bacterias metanogénicas. Cualquier factor que reduzca la población de protozoos, podrá lavar del rumen las bacterias metanogénicas. Todo parece indicar que la reducción en la población de bacterias metanogénicas que produjeron *S. cerevisiae* y LEVICA 25 no guarda relación estrecha con el número total de protozoos.

Se concluye que los preparados con levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y LEVICA -25 reducen los metanógenos y la metanogénesis ruminal, lo que brinda la posibilidad de su empleo para mejorar la eficiencia de utilización de la energía en ruminantes, y puede contribuir a mitigar el efecto de estos gases al medio.

### Agradecimientos

Se agradece a la Organización Internacional de Energía Atómica (OIEA) por el financiamiento de esta investigación, en el marco del Proyecto No. 12667 «Utilización de un suplemento activador de la fermentación microbiana ruminal en el control de la metanogénesis ruminal».

### Referencias

- Anderson, R.C., Callaway, T.R., van Kessel, J.A.S., Jung, Y.S., Edrington, T.S. & Nisbet, D.J. 2003. Effect of select nitro compounds on ruminal fermentation; an initial look at their potential to reduce economic and environmental costs associated with ruminal methanogenesis. *Bioresource Technol.* 90:59
- Anderson, M.A. & Horn, G.M. 1987. Effect of Lasalocic in wheight gain, ruminal fermentation and forage intake of stocker cattle grazing wintwer pasture. *J. Animal Sci.* 65:865
- AOAC. 1995. Official Methods of Analysis. 15<sup>th</sup> Ed. Assoc. Off. Anal. Chem. Arlington, V.A.
- Beauchemin, K.A. & McGinn, S.M. 2005. Methane emissions from feedlot cattle fed barley or corn diets. *J. Anim. Sci.* 83:653
- Revista Cubana de Ciencia Agrícola, Tomo 44, Número 3, 2010.
- Beharka, A.A. & Nagaraja, T.G. 1991. Effects of *Aspergillus oryzae* extract (AMAFER) on ruminal fibrolytic bacteria and *in vitro* degradation. Abstracts of 21 Biennial conference on Rumen Function. Chicago, IL. p.32
- Caldwell, D.R & Bryant, M.P. 1966. Medium without fluid for non selective enumeration and isolation of rumen bacteria. *Appl. Microb.* 14:794
- Carro, M. D. & Ranilla, M. J. 2002. Los aditivos antibióticos promotores del crecimiento de los animales: situación actual y posibles alternativas. Disponible: [www.exopol.com](http://www.exopol.com). Consultado: julio de 2008
- Dawson, K.A. & Girard, I.D. 1997. Biochemical and physiological basis for the stimulatory effects of yeast preparations on ruminal bacteria. En: *Biotechnology in the Feed Industry*. Eds. T.P. Lyons & K.A. Jacques. Nottingham University Press, Nottingham, UK. p. 293
- Duncan, D.E. 1955. Multiple range and multiple F. test. *Biometrics.* 11:1
- Elías, A. 1971. The rumen bacteria of animals fed on a high molasses-urea diet. Tesis PhD, Aberdeen
- Galindo, J. 1988. Efecto de la zeolita en la población de bacterias celulolíticas y su actividad en vacas que consumen ensilaje. Tesis Dr. ICA-Universidad Agraria de La Habana. Cuba
- Galindo, J., González, N. & Delgado, D. 2009. Los árboles como controladores de los metanógenos y producción de metano en el rumen. II Taller Internacional Salud y Producción Animal-II Congreso Cubano de Desarrollo Local. Granma. Cuba
- Galindo, J., Scull, I., Delgado, D., González, N., Marrero Y., Febles, G., Ruiz, T., Sosa, Areadne, Aldana, A.I., Moreira, O., Torres, V., Sarduy, L., Noda, A., Achang, G., Chongo, B. & Pedraza, R. 2006. Efecto de los metabolitos secundarios de árboles, arbustos y otras leguminosas como agentes defaunantes del rumen y su repercusión en el metabolismo energético de los rumiantes. Premio CITMA Provincial. La Habana. Cuba
- Gil, S.B. 2004. Sistema de producción de carne bovina: Engorde intensivo (feedlot). Elementos que intervienen y posibles impactos en el medio. Disponible: <http://www.ingenieroambiental.com/new3informes/feedlot.htm>. Consultado: 4 de agosto de 2004
- Hungate, P.E. 1970. A roll tube method for cultivation in microbiology. Eds. J.B. Morris, D.B. Ribbons. New York. Academic Press, Inc. p117
- Jeong, H.Y., Kim, J.S., Ahn, B.S., Cho, W.M., Kweon, U.G., Ha, J.K. & Chee, S.H. 1998. Effect of direct-fed microbials (DFM) on milk yield, rumen fermentation and microbial growth in lactating dairy cows. *Korean J. Dairy Sci.* 20:247
- Joblin, K.N. 1981. Isolation, enumeration and maintenance of rumen anaerobic fungi in roll tubes. *Appl. Environ. Microb.* p. 1119
- Johnson, D.E., Johnson, K.A., Ward, G.M. & Branine, M.E. 2000. Ruminants and other animals. Chapter 8. En: *Atmospheric Methane: Its Role in the Global Environment*. Eds. M.A.K. Khalil, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg. Germany. pp. 112
- Kamra, D.N., Chaudhary, L.C., Neeta-Agarwal, Singh, R., Pathak, N.N. & Agarwal, N. 2002. Growth performance, nutrient utilization, rumen fermentation and enzyme activities in calves fed on *Saccharomyces cerevisiae* supplemented Diet. *Indian-J. Animal-Sci.* 72: 472

- Marrero, Y. 2005. Las levaduras como mejoradoras de la fermentación ruminal de dietas con alto contenido de fibra. Tesis Dr. Instituto de Ciencia Animal. La Habana. Cuba. pp. 117-145
- Marrero, Y., Galindo, J., González, N., Rodríguez, R., Martín, E., Rodríguez, S., Castillo, Y., Ruiz, O., & Berrota, E. 2008. Avances en el desarrollo de levaduras con potencialidades prebióticas para rumiantes. Estrategia latinoamericana: Cuba- Colombia- México. IV Congreso Internacional de Ciencias. Ciudad de Juárez, Chihuahua. México
- Martin, S.A. & Nisbet, D.J. 1992. Effect of Direct-Fed Microbials on Rumen Microbial Fermentation. *J. Dairy Sci.* 75:1736
- Moss, A. R., Jouany, J.P. & Newbold, J. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Ann. Zootech.* 49:231
- Newbold, C.J., Brock, R. & Wallace, R.J. 1991. Influence of autoclaved or irradiated *Aspergillus oryzae* fermentation extract on fermentation in the rumen simulation technique (Rusitec). *J. Agríc. Sci.* 116:159
- Newbold, C. J., Wallace, R. J., Chen, X. B. & McIntosh, F. M. 1995. Different strains of *Saccharomyces cerevisiae* differ in their effects on ruminal bacterial numbers *in vitro* and in sheep. *J. Anim. Sci.* 73: 1811
- Paiting, K. & Kirsop, B. 1990. A quick method for estimating the percentage of cell in a yeast population, using methylene blue staining. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 6: 346
- Rader, V. 1999. Influence of the yeast culture (YEA - SACC-1026) on the rumen metabolism in sheep. *Bulgarian J. Agric. Sci.* 71:275
- Rodríguez, R., Galindo, J. & Marrero, Y. 2006. Optimización de la fermentación ruminal mediante técnicas manipuladoras. Informe técnico. Instituto de Ciencia Animal. CITMA-GEPROP. La Habana. Cuba
- Thauer, R. K. & Shima, S. 2006. Biogeochemistry: Methane and microbes, *Nature* 440:878
- Theodorou, M.K, Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McAllan, A.B. & France, J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminants feed. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 48:185
- Torres, V., Navarro, J. R. & Pérez, T. 2003. Modelos estadísticos para el procesamiento de experimentos con mediciones repetidas en la misma unidad experimental. *Rev. Cubana Cienc. Agríc.* 37:227
- Visauta, B. 1998. Análisis estadístico con SPSS para Window. Estadística multivariada. Vol II. Mc Graw-Hill/ Interamericana de España, S.A.V. p. 358
- Wallace, R. J. & Newbold, C.J. 1992. Probiotics for ruminants. En: *Probiotics, the Scientific Basis*. Ed. R. Fuller. Chapman and Hall. London. pp. 317
- Wiedmeier, R.D., Arambel, M.J. & Walters, J.L. 1987. Effects of yeast culture and A.O. fermentation extract on ruminal characteristics and nutrient digestibility. *J. Dairy Sci.* 70:2063
- Williams, A.G. 1991. The biochemical activities and importance of the ciliated protozoa in the rumen ecosystem. En: *Biochemical protozoology*. Eds. Coombs, G.H., North, M.J. London-Washington. pp. 61-79

**Recibido: 30 de abril de 2009**