

## Efecto de un hidrolizado enzimático de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* en la población microbiana ruminal con sustrato de *Pennisetum purpureum*, vc. Cuba CT- 115 en condiciones *in vitro*.

Juana Galindo<sup>1</sup>, A. Díaz<sup>2</sup>, Niurca González<sup>1</sup>, Areadne Sosa<sup>1</sup>, Yoandra Marrero<sup>1</sup>, Ana I. Aldana<sup>1</sup>, Onidia Moreira<sup>1</sup>, R. Bocourt<sup>1</sup>, Verena Torres<sup>1</sup>, Lucía Sarduy<sup>1</sup> y Aida Noda<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Universidad de Matanzas, Autopista a Varadero, km 3.5, Matanzas, Cuba

Correo electrónico: jgalindo@ica.co.cu

Para evaluar el efecto de un hidrolizado enzimático de levadura *Saccharomyces cerevisiae* en la población microbiana ruminal, se condujo un experimento en condiciones *in vitro*. Se utilizó la técnica de cultivo sumergido con agitación mecánica, en un baño a 39 °C. Los tratamientos correspondieron a los niveles de hidrolizado que se emplearon, y fueron: A) 0 (control), B) 75 mL/kg de concentrado/d y C) 100 mL/kg de concentrado/d. Como sustrato a fermentar se utilizó *Pennisetum purpureum* vc. Cuba CT- 115, de 112 d de rebrote. Los muestreos se efectuaron antes de incubar (hora 0) y a las 4 y 8 h después de iniciada la fermentación. La población de bacterias viables totales fue 20.89, 22.37 y 50.47 x 10<sup>11</sup> ufc/mL, para los tratamientos A, B y C, respectivamente. Se encontró interacción significativa entre los tratamientos y diferentes tiempos de fermentación para las bacterias celulolíticas. Sus mayores poblaciones se encontraron a las 4 h después de iniciada la fermentación en los tratamientos donde se suministró 75 y 100 mL/kg de concentrado/d. No hubo efecto del hidrolizado en la población de bacterias proteolíticas, hongos y pH del rumen. Se concluye que el hidrolizado de *Saccharomyces cerevisiae* incrementa la población total de bacterias del rumen y es capaz de activar la población de bacterias celulolíticas en las horas de máxima fermentación. Esto puede contribuir a una mayor degradación de la fibra en los rumiantes

Palabras clave: hidrolizado, *Saccharomyces cerevisiae*, bacterias, rumen

Pérez (2000) obtuvo y caracterizó un hidrolizado de levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, a partir de crema de destilería con la utilización de un crudo enzimático de la cepa de *Bacillus subtilis* e informó el efecto que produce en la fisiología digestiva de pollos de ceba. Refirió además, que los hidrolizados de levaduras son capaces de producir efectos prebióticos en los animales monogástricos, debido a la presencia de sustancias activas, que son componentes estructurales de la pared celular, entre las que se destacan los oligosacáridos de glucano y manano.

En los animales rumiantes, estas sustancias y diferentes productos de similar o diferente origen, se incluyen en el nombre genérico de aditivos zootécnicos (Caja *et al.* 2003). Entre estos se destacan: antibióticos ionóforos (Ipharraguerre y Clark 2003, Galindo *et al.* 2003 y Guan *et al.* 2006), ácidos orgánicos (Nisbet y Martín 1990, Carro y Ranilla 2003 y Carro *et al.* 2006), extractos vegetales (Cardozo *et al.* 2004, Cardozo *et al.* 2005 y Busquet *et al.* 2006) y enzimas (Beauchemin and McGinn 2005, Colombatto *et al.* 2003 y Dean *et al.* 2005), los que incrementan la eficiencia de utilización digestiva de los alimentos.

Sin embargo, en Cuba no se han realizado trabajos que permitan evaluar el efecto de un hidrolizado enzimático de levadura en animales rumiantes. Surge así la necesidad de iniciar un conjunto de investigaciones que posibiliten dilucidar sus potencialidades para estos propósitos. Este trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de la inclusión de un hidrolizado enzimático de levadura *Saccharomyces cerevisiae* en la población microbiana ruminal en condiciones *in vitro*.

### Materiales y Métodos

*Tratamientos experimentales.* Se evaluaron tres tratamientos, según diseño completamente aleatorizado, en arreglo factorial 3 x 3. Los tratamientos se diseñaron a partir de la inclusión de dos niveles de hidrolizado enzimático de levadura *Saccharomyces cerevisiae* y un control: A) control, B) 75 mL/kg de concentrado/d y C) 100 mL/kg de concentrado/d.

El hidrolizado enzimático de levadura *Saccharomyces cerevisiae* se obtuvo a partir de la metodología descrita por Pérez (2000). Su composición química fue: 15-20 % de materia seca, 40 % de proteínas, 16 % de cenizas, 84 % de materia orgánica, 15 % de ácidos nucleicos, 25% de polisacáridos, 15 % de lípidos y 5 % de compuestos hidrosolubles, como nucleótidos, aminoácidos, vitaminas y minerales.

El hidrolizado de levadura *S. cerevisiae* empleado en este estudio tenía una concentración de oligosacáridos de glucanos de 3.34 % ± 0.35. A partir de esta información, se seleccionaron las dosis de 75 y 100 mL/kg de concentrado/d. Estas dosis equivalen, aproximadamente, a 97.5 y 130 mg de β (1,3) glucano/kg de concentrado, respectivamente. La dieta experimental consistió en *Pennisetum purpureum* clon Cuba CT-115, de 112 d de rebrote.

Para la preparación de *P. purpureum* vc. Cuba CT-115, se recolectaron, aproximadamente, 2 kg de tallos y hojas de 25 plantas tomadas al azar, realizando el corte a 20 cm del suelo. 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). La MS fue de 23.5 y su contenido en base a MS fue 7.25; 68.70; 40.24; 6.98; 28.40; 0.56 y 0.29% de PB, FDN, FDA, lignina, celulosa, calcio y fósforo, respectivamente.

**Procedimiento experimental.** Se utilizó la técnica de cultivo sumergido, con agitación mecánica, en un baño de temperatura controlada a 39 °C. En el mismo se colocaron 18 frascos de fermentación de 250 mL de capacidad, y dentro de estos se introdujeron los alimentos a evaluar y 100 mL de una mezcla líquida, integrada por fluido de rumen y solución amortiguadora, en una relación de una parte de líquido ruminal, dos partes de solución amortiguadora.

El inóculo ruminal se obtuvo a partir de dos toros mestizos estabulados y 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 recolectó a través de la cánula, con la ayuda de una bomba de vacío. Se conservó en un termo herméticamente cerrado hasta su traslado al laboratorio, donde se filtró a través de muselina.

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

Los muestreos se efectuaron a las 0 (antes de incubar), 4 y 8 h después de iniciada la fermentación. Para ello se retiraron de la incubación los frascos que correspondían a cada uno de los tiempos de muestreo. Se replicó seis veces en tiempo.

**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, proteolíticas y hongos anaerobios.

La siembra de bacterias viables totales, proteolíticas y celulolíticas se efectuó en los medios de cultivo de Caldwell y Bryant (1966), modificado por Elías (1971) y Galindo (1988). Para la determinación de la población de hongos anaerobios se utilizó el medio de cultivo de Joblin (1981). 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. El pH del líquido ruminal se midió en pH- metro digital, marca WPA.

**Tratamiento estadístico a los conteos de microorganismos.** El tratamiento estadístico se efectuó de acuerdo con el diseño experimental, con el propósito de identificar interacción entre los tratamientos (dosis de hidrolizado y los tiempos de fermentación, horas de muestreo). Se utilizó la dócima de Duncan para  $P < 0.05$  en los casos necesarios.

Los conteos de microorganismos se transformaron según  $\ln N$ , para garantizar las condiciones de norma-

lidad en la curva de crecimiento. Para el análisis se aplicó la fórmula  $(K+N) \cdot 10^x$ , donde:

$K$  = constante que representa el logaritmo de la dilución donde se inocularó el microorganismo

$N$  = logaritmo del conteo de colonias, determinado como  $\text{ufc} \times \text{mL}^{-1}$ ,  $\text{uft} \times \text{mL}^{-1}$ , ó células  $\times \text{mL}^{-1}$

10 = base de los logaritmos

$X$  = dilución a la cual se efectuó la inoculación

## Resultados

No se encontró interacción significativa entre los tratamientos y las horas de muestreo en las medidas de bacterias viables totales, proteolíticas, hongos y pH del rumen. La inclusión de 100 mL/kg de concentrado/d de hidrolizado de levadura *Saccharomyces cerevisiae* incrementó ( $P < 0.05$ ) la población de bacterias viables totales (tabla 1), al alcanzar el valor de  $50.41 \times 10^{11}$  ufc/mL.

No se encontró efectos, debido a la inclusión del hidrolizado de levadura *S. cerevisiae* en las poblaciones de bacterias proteolíticas y hongos ruminales. La población de bacterias proteolíticas fue de 22.26, 19.48 y  $17.59 \times 10^7$  ufc/mL para los tratamientos control, 75 y 100 mL/kg de concentrado/d de hidrolizado, respectivamente.

El pH del rumen se mantuvo en valores superiores a 7, sin diferencias entre los tratamientos experimentales.

Tabla 1. Efecto de diferentes dosis de un hidrolizado enzimático de levadura *S. cerevisiae* (mL/kg de concentrado/d) en algunas poblaciones microbianas y el pH ruminal en *in vitro*

Medidas	0	75 mL	100 mL	EE ± Sign
Bacterias viables totales, $10^{11}$ ufc/mL	2.33 <sup>a</sup> (20.89)	2.43 <sup>a</sup> (22.37)	3.26 <sup>b</sup> (50.41)	0.27*
Hongos, $10^5$ uft/mL	1.50 (10.59)	2.22 (20.81)	1.99 (11.59)	0.26
Bacterias proteolíticas, $10^7$ ufc/mL	2.17 (22.26)	2.59 (19.48)	2.52 (17.59)	0.25
pH	7.39	7.36	7.34	0.13

Datos transformados según  $\log X$

Valores entre paréntesis corresponden a las medias originales

<sup>a,b</sup> Medias con letras diferentes difieren a  $P < 0.05$  (Duncan 1955)

\*  $P < 0.05$

Al hacer un análisis acerca del efecto del tiempo de fermentación en las poblaciones de bacterias viables totales, proteolíticas y hongos del rumen, así como del pH, se demostró que la población de bacterias viables totales se incrementó desde las 4 h después de iniciada la fermentación, y no difirió con la población que se encontró a las 8 h (tabla 2).

Las bacterias proteolíticas y el pH del líquido ruminal no se modificaron de manera significativa en el tiempo de fermentación.

Tabla 2. Efecto del tiempo de fermentación, horas, en algunos microorganismos de la población microbiana ruminal y el pH en dietas con hidrolizado enzimático de levadura *S. cerevisiae* en condiciones *in vitro*

Medidas	Tiempo de fermentación, h			EE ± Sign
	0	4	8	
Bacterias viables totales, 10 <sup>11</sup> ufc/mL	1.73 <sup>a</sup> (16.70)	3.20 <sup>b</sup> (38.37)	3.09 <sup>b</sup> (38.59)	0.27***
Bacterias proteolíticas, 10 <sup>7</sup> ufc/mL	2.18 (15.89)	2.64 (24.78)	2.47 (18.67)	0.25
Hongos, 10 <sup>5</sup> uft/mL <sup>-1</sup>	1.89 <sup>ab</sup> (12.74)	2.46 <sup>b</sup> (20.56)	1.36 <sup>a</sup> (9.70)	0.26*
pH	7.17	7.40	7.52	0.13

<sup>a, b, c</sup> Medias con letras diferentes difieren a P < 0.05 (Duncan 1955)

\*\*\* P < 0.001; Datos transformados según log X

Valores entre paréntesis corresponden a las medias originales

Los hongos presentaron su mayor población a las 4 h (20.56 10<sup>5</sup> uft/mL), para reducir su número a las 8 h (9.70 10<sup>5</sup> uft/mL). La población de este grupo microbiano presentó valores intermedios antes de iniciar la fermentación (hora 0).

Se encontró interacción significativa (P < 0.01) entre los tratamientos y tiempos de fermentación en la población de bacterias celulolíticas del rumen. La figura 1 muestra los efectos. Como se puede observar, a las 4 h después de iniciada la fermentación, se encontraron las mayores poblaciones de bacterias celulolíticas en los tratamientos donde se suministró 75 y 100 mL/kg de concentrado/d. De igual manera, esta población se incrementó a las 8 h, cuando se utilizó la dosis de 75 mL/kg de concentrado/d; pero el suministro de la dosis de 100 mL/kg de concentrado/d produjo un descenso de este grupo microbiano, aspecto que se debe considerar en futuras investigaciones.

### Discusión

Es evidente que el hidrolizado enzimático de levadura *Saccharomyces cerevisiae* ejerce efecto activador de las poblaciones de bacterias viables totales y celulolíticas del rumen en condiciones *in vitro*. Resultados similares mostraron Marrero (2005) y Marrero *et al.* (2008), al evaluar levaduras viables, al igual que Sosa (2006) cuando estudió el efecto del hongo conidial *Aspergillus oryzae* en dietas fibrosas para rumiantes. Estos resultados también coinciden con los informes de otros autores como Newbold *et al.* (1991), Varel *et al.* (1993) y Varel y Kreikemeier (1994).

En la literatura se informa que las poblaciones de bacterias viables totales se incrementan cuando se emplean cepas de levaduras como aditivos en dietas para rumiantes (Martin y Nisbet 1992). Esto puede tener su origen en que las levaduras proveen de varios factores de crecimiento a las bacterias ruminales, como las vita-

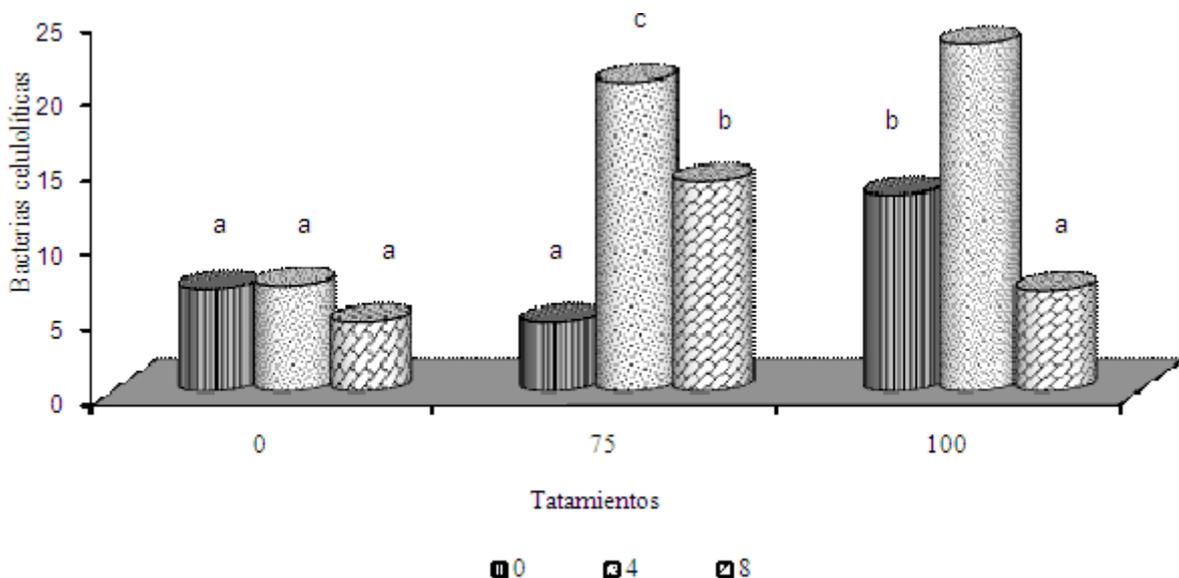


Figura 1. Efecto del nivel de un hidrolizado enzimático de levadura *S. cerevisiae* (mL/kg de concentrado/d) y el tiempo de fermentación en la población de bacterias celulolíticas ruminales, 10<sup>7</sup> ufc/mL  
EE ± 0.33\*\*\* (0, 4 y 8 h)

minas del complejo B, los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y de cadena ramificada, las provitaminas y los micronutrientes (Wiedmier *et al.* 1987, Beharka y Nagaraja 1991, Newbold *et al.* 1995 y Dawson y Girad 1997).

Los resultados que se alcanzaron en las poblaciones de bacterias proteolíticas pudieran ser objeto de investigaciones futuras. Al respecto, se debe considerar que la proteólisis ruminal es resultado de la acción de las proteasas microbianas sobre las proteínas. Esta facultad se atribuye, generalmente, a la mezcla total de bacterias del rumen (Galindo 1988), ya que las bacterias proteolíticas solamente comprenden del 12 al 43 % del total de la población bacteriana en el rumen.

Entre las bacterias de mayor actividad proteolítica se encuentran especies que presentan una alta capacidad para degradar la fibra o algunos de sus componentes como hemicelulosa y pectina, entre ellas *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Fibrobacter succinógenes* (Russell *et al.* 1981, Hazlewood *et al.* 1983 y Nava y Díaz 2003). Otras bacterias importantes en la proteólisis ruminal son *Bacteroides ruminicola* y *Streptococcus bovis* (Galindo 2009).

Es importante destacar que desde el punto de vista biológico, la mayor población de hongos celulolíticos que se encontró, cuando se suministraron 75 mL/kg de concentrado/d de hidrolizado de levaduras, pudiera duplicar la degradación de la fracción fibrosa en el rumen, ya que tienen capacidad enzimática para penetrar alimentos fibrosos a través de los estomas, colonizar los tejidos altamente lignificados de los forrajes tropicales y solubilizar las partes lignificadas de las paredes celulares de las plantas. Sus celulasas se consideran las más activas en la degradación de la celulosa cristalina (Akin *et al.* 1983 y Akin *et al.* 1989).

Todo esto hace que el incremento sea de gran utilidad en la degradación de forrajes de baja calidad. Al respecto, se ha demostrado que los hongos anaeróbicos del rumen poseen diferentes enzimas que pueden degradar los carbohidratos contenidos en las paredes celulares de los vegetales, como la celulosa y hemicelulosa, y su acción es mayor a las bacterias (Dehority y Tirabasso 2000).

Aunque no se han informado evidencias acerca de que los hongos anaeróbicos del rumen pueden utilizar lignina como fuente de carbono, estos organismos disolvieron hasta 16 % de la lignina contenida en la paja y heno de trigo en condiciones *in vitro* (Heath *et al.* 1983 y Orpin 1984). Además, pueden degradar y debilitar los tejidos lignificados de diferentes forrajes fertilizados con azufre (Akin *et al.* 1983).

La información que se obtuvo en este trabajo con respecto a la población de bacterias celulolíticas demuestra que el hidrolizado de levaduras que se evaluó puede activar la flora celulolítica en las horas de máxima fermentación de la fibra. Son diversos los estudios *in vivo* donde se observan aumentos en las poblaciones de bac-

terias celulolíticas, incluso en mayor proporción que las bacterias viables totales, cuando se incluyen levaduras como aditivos (Wiedmeier *et al.* 1987, Harrison *et al.* 1988, Martin y Nisbet 1992, Wallace y Newbold 1993 y Dawson y Girad 1997).

El aumento en la población de bacterias y hongos celulolíticos en el rumen puede explicar el incremento en la digestibilidad de materia seca y fibra ácido detergente, así como en la tasa de degradación de fibra que se ha verificado en animales que reciben levaduras (Offer 1990). Es muy probable que los componentes de su pared también ejerzan efectos estimuladores por determinados mecanismos que deben ser objeto de estudio en investigaciones futuras.

Wallace (1994), al desarrollar un estudio detallado acerca de la manipulación de la fermentación ruminal mediante la utilización de aditivos alimenticios microbianos y anti microbianos, informó que estas sustancias incrementan en 50-100 % la población de bacterias viables totales en el rumen. Esto, unido a la activación de la población de bacterias celulolíticas y a las que utilizan ácido láctico, explica la mejora en la degradabilidad de la fibra y mejoran el ambiente ruminal.

Informaciones obtenidas a partir de investigaciones desarrolladas por Carro y Ranilla (2002) demuestran que los aditivos de origen microbiano, dentro de los cuales se puede incluir al hidrolizado enzimático de levaduras, provocan modificaciones en la población microbiana ruminal y sus patrones fermentativos. Esto se traduce en aumentos de la producción de propiónico, disminución de la producción ruminal de metano, de ácido láctico, así como en la disminución de la degradación proteica y en la desaminación de los aminoácidos. Todos estos cambios incrementan la eficiencia del metabolismo energético y nitrogenado en el rumen y en el animal, lo que se traduce en beneficios económicos y medio ambientales.

Los resultados que se presentan en este trabajo constituyen un valioso aporte, no solamente en el plano relacionado con la aplicación práctica de técnicas manipuladoras de la fermentación microbiana ruminal, sino que trazan procedimientos para la evaluación de posibles candidatos a productos activadores de la fermentación microbiana ruminal basados en hidrolizados de microorganismos.

A partir de los resultados que se alcanzaron en este estudio, se concluye que el hidrolizado enzimático de levadura *Saccharomyces cerevisiae* ejerce efecto estimulador de la población microbiana ruminal en condiciones *in vitro*.

## Referencias

- Akin, D.E., Gordon, G.L.R. & Hogan, J.P. 1983. Rumen bacterial and fungal degradation of digitaria pentzii grown with or without sulfur. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 738
- Akin, D.E., Lyon, C.E. Windham, W. R. & Rigsby, L.L. 1989. Physical degradation of lignified stem tissues by ruminal fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:611

- 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
- Beharka, A.A. & Nagaraja, T.G. 1991. Effects of *Aspergillus oryzae* extract (AMAFER) on ruminal fibrolytic bacteria and *in vitro* degradation. Biennial Conference on Rumen Function. Chicago, IL. p. 32
- Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A. & Kamel, C. 2006. Plant extracts affect *in vitro* rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 89:761
- Caja, G., González, E., Flores, C., Carro, M. D. & Albanell, E. 2003. Alternativas a los antibióticos de uso alimentario en rumiantes: probióticos, enzimas y ácidos orgánicos. En: XIX Curso de Especialización FEDNA. pp. 183-212.
- Caldwell, D.R. & Bryant, M.P. 1966. Medium without fluid for non selective enumeration and isolation of rumen bacteria. *Appl. Microb.* 14:794
- Cardozo, P.W., Calsamiglia, S., Ferret, A. & Kamel, C. 2004. Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. *J. Anim. Sci.* 82:3230
- Cardozo, P.W., Calsamiglia, S., Ferret, A. & Kamel, C. 2005. Screening for the effects of natural plant extracts at different pH on *in vitro* rumen
- Carro, M.D. & Ranilla, M.J. 2002. Los aditivos antibióticos promotores del crecimiento de los animales: situación actual y posibles alternativas. Available: <www.exopol.com> [Consulted: July 2008]
- Carro, M.D. & Ranilla, M.J. 2003. Influence of different concentrations of disodium fumarate on methane production and fermentation of concentrate feeds by rumen microorganisms *in vitro*. *Br. J. Nutr.* 90:617
- Carro, M.D., Ranilla, M.J., Giráldez, F.J. & Mantecón, A. R. 2006. Effects of malate on diet digestibility, microbial protein synthesis, plasma metabolites, and performance of growing lambs fed a high-concentrate diet. *J. Anim. Sci.* 84:405
- Colombatto, D., Hervás, G., Yang, W.Z. & Beauchemin, K.A. 2003. Effects of enzyme supplementation of a total mixed ration on microbial fermentation in continuous culture, maintained at high and low pH. *J. Anim. Sci.* 81:2617
- 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
- Dean, D.B., Adesogan, A.T., Krueger, N. & Littell, R.C. 2005. Effect of fibrolytic enzymes on the fermentation characteristics, aerobic stability, and digestibility of Bermuda grass silage. *J. Dairy Sci.* 88:994
- Dehority, D.B. & Tirabasso, P. 2000. Antibiosis between ruminal bacteria and ruminal fungi. *App. Environ. Microbiol.* 66:2921
- Duncan, D.E. 1955. Multiple ranges and multiple F. test. *Biometrics.* 11:1
- Elías, A. 1971. The rumen bacteria of animals fed on a high molasses-urea diet. Thesis Ph.D, Aberdeen
- Galindo Blanco, J. 1988. Efecto de la zeolita en la población de bacterias celulolíticas y su actividad en vacas que consumen ensilaje. Thesis Dr. Cs. Vet. Universidad Agraria de La Habana. Cuba
- Galindo, J.L. 2009. Factores que modifican el ecosistema ruminal. Principales grupos y especies microbianas. In: Aspectos bioquímicos y fisiológicos del ecosistema gastro-intestinal en rumiantes. Libro electrónico. Instituto de Ciencia Animal. La Habana. Cuba
- Galindo, J., Elías, A., Palenzuela, T., Pérez, M.C. & Aldana, A.I. 2003. Effect of monensín on the *in vitro* methane production in three ruminal ecological systems. *Cuban J. Agric. Sci.* 37:181
- Guan, H., Wittenberg, K.M., Ominski, K.H. & Krause, D.O. 2006. Efficacy of ionospheres in cattle diets for mitigation of enteric methane. *J. Anim. Sci.* 84:1896
- Harrison, G.A., Hemken, R.W., Dawson, K.A., Harmon, R.J. & Barker, K.B. 1988. Influence of addition of yeast culture supplement to diets of lactating cows on ruminal fermentation and microbial populations. *J. Dairy Sci.* 71:2967
- Hazlewood, G.P., Orpin, C.G., Greenwood, Y. & Black, M.E. 1983. Isolation of proteolytic rumen bacteria by use of selective medium containing leaf fraction 1 protein (ribulosebiphosphate carboxylase). *Appl. Environ. Microbiol.* 45:1780
- Heath, B., Bauchop, T. & Skipp, R.A. 1983. Assignment of the rumen anaerobe neocaltimastix frontalis to the spizellornycetales (chytridiornycetes) on the basis of its polyflagellate zoospores ultrastructure. *Can. J. Bot.* 61:295
- Hungate, P.E. 1970. A roll tube method for cultivation in microbiology. Eds. J.B. Morris, D.B. Ribbons. New York, Academic Press, Inc. 117 pp.
- Ipharraguerre, I.R. & Clark, J.H. 2003. Usefulness of ionophores for lactating dairy cows: a review. *Anim. Feed Sci. Tech.* 106:39
- Joblin, K.N. 1981. Isolation, enumeration and maintenance of rumen anaerobic fungi in roll tubes. *Appl. and Environ. Microb.* 119 pp.
- Marrero Rodríguez, 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
- Marrero, Y., Galindo, J., Torres, V., Rodríguez, Z., Álvarez, E., Aldana A.I., Rodríguez, R., García, R., Bocourt, R., Delgado, D., Martín, E., Moreira, O., Noda, A., Núñez, O., González, M.R., Herrera, F., Cairo, J. & Rodríguez, D. 2008. Avances en el estudio de las levaduras como activadoras de la fermentación ruminal en bovinos que consumen dietas fibrosas. *Revista de Ciencia y Tecnología de la UACJ.* 6:93
- Martin, S.A. & Nisbet, D.J. 1992. Effect of Direct-Fed Microbials on Rumen Microbial Fermentation. *J. Dairy Sci.* 75:1736
- Nava, C. & Díaz, A. 2003. Introducción a la digestión ruminal. Disponible: [http://www.veterin.unam.mx/enlinea/ruminal/digest\\_ruminal.htm](http://www.veterin.unam.mx/enlinea/ruminal/digest_ruminal.htm). Consultado: agosto 2008
- 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. Agr. 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
- Nisbet, D. J. & Martin, S.A. 1991. Effect of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on lactate utilization by the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. *J. Anim. Sci.* 69:4628

- Offer, N.W. 1990. Maximising fiber digestion in the rumen: the role of yeast culture. En: Biotechnology in the Feed Industry Ed. T.P. Lyons. Autech Technical Publications. Nicholasville, Kentucky. pp. 79-96
- Orpin, C. G. 1984. The role of ciliate protozoa and fungi in the rumen digestion of plant cell walls. *Animal Feed Sci. Technology* 10: 121
- Pérez, M. 2000. Obtención de un hidrolizado de crema de levadura de destilería y evaluación de su actividad probiótica. Tesis Dr. Universidad Agraria de La Habana. Cuba
- Russell, J.B., Bottje, W.G. & Cotta, M.A. 1981. Degradation of protein by mixed culture of rumen bacteria: identification of *Streptococcus bovis* as an actively proteolytic rumen bacterium. *J. Anim. Sci.* 53:242
- Sosa, A. 2006. Efecto de *Aspergillus oryzae* como activador de la fermentación ruminal de *Pennisetum purpureum* en condiciones *in vitro*. Tesis de Maestría en Microbiología. Mención Microbiología General. Facultad de Biología. Universidad de La Habana-Instituto de Ciencia Animal. La Habana. Cuba. 56 pp.
- Revista Cubana de Ciencia Agrícola, Tomo 44, Número 3, 2010.
- Varel, V.H. & Kreikemeier, K.K. 1994. Influence of feeding *Aspergillus oryzae* fermentation extract (Amaferm) on *in situ* fiber degradation, ruminal fermentation, and microbial protein synthesis in nonlactating cows fed alfalfa or bromegrass hay. *J. Anim. Sci.* 72: 1814
- Varel, V.H., Kreikemeier, K.K., Jung, H.G. & Hatfield, R.D. 1993. *In vitro* stimulation of forage fiber degradation by ruminal microorganisms with *Aspergillus oryzae* fermentation extract. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3171
- Wallace, R.J. 1994. Microbiología ruminal, biotecnología y nutrición de rumiantes: Progresos y problemas. *J. Anim. Sci.* 72: 2992
- Wallace, R. J. & Newbold, C. J. 1993. Probiotics for ruminants. En: Probiotics. The Scientific basis. Ed. R. Fuller. Chapman and Hall. London. pp. 317-325
- Wiedmeier, R.D., Arambel, M.J. & Walters, J.L. 1987. Effect of yeast culture and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on ruminal characteristics and nutrient digestibility. *J. Dairy Sci.* 70: 2063

**Recibido: 23 de febrero de 2009**