

53
24.



**" EFECTO DE MICROORGANISMOS RUMINALES
BAJO CONDICIONES DE ANAEROBIOSIS Y
AEROBIOSIS SOBRE LA VIABILIDAD DE
Saccharomyces cerevisiae IN VITRO "**

**TESIS PRESENTADA ANTE LA
DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES DE LA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
PARA LA OBTENCION DEL TITULO DE
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
POR
VERONICA MENDOZA REYES**

ASESORES:

- DR.MARIO A. COBOS PERALTA**
- QFB CAROLINA SEGUNDO ZARAGOZA**
- MC FRANCISCO CASTREJON PINEDA**
- MC SERGIO ANGELES CAMPOS**



MEXICO, D.F.

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A veces, el escribir me ha servido para evitar expresarme a través del lenguaje hablado, y ahora que tengo espacio para explayarme no hallo como empezar. Sin embargo, comenzaré por mencionar que es imposible citar a todo aquel individuo que de alguna manera participó en mi formación (tengo espacio pero no tanto) por lo que pido consideres si no te encontraras aquí :

A mis padres, Por darme la oportunidad de ser. Raúl: por contribuir con el 50% de mi información genética; Margarita: Por su apoyo incondicional en todo momento tanto moral como monetario y por complementar con su cromosoma X.

A mi única hermanita; Sandra por ser tan paciente y quererme tanto a pesar de todo y recuerda que eres plenamente correspondida.

A mi abuelita Rosa: Donde quiera que estés.

A todos mis amigos: Regina, Paty, Leñisa, Max, Araceli, Ana, Josefina, Lulú, Sandra, Chuc, Agustín, Horacio, Román...

A la Dra. Rebeka Jones Guerrero: Por cambiar mi visión ante la vida-muerte...

A los animales que murieron (o morirán) en mi aprendizaje.

Para Angeles y Lucero: porque son un pedacito de mi corazón.

A los que de alguna forma tuvieron que ver algo en mi transitar por la vida.

AGRADECIMIENTOS:

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por ende, a la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT IN-505994) por su apoyo financiero para la realización del ensayo experimental, en especial al responsable del proyecto, MC Francisco Castrejón Pineda.

A Fundación UNAM dentro del Programa Beca Tesis por su apoyo para finalizar este trabajo.

Al Departamento de Nutrición Animal, especialmente a mis asesores: Francisco Castrejón y Sergio Angeles; además a Luis Corona, Silvia Buntinx, Lucas Melgarejo, Juan Horta, Toni...

Al laboratorio de Microbiología del Centro de Ganadería del Colegio de Posgraduados particularmente al Dr Mario Cobos Peralta y a MC Luis Miranda, MC Magda Crosby.

Al Laboratorio de Micología del Departamento de Microbiología e Inmunología, especialmente a mi asesora Carolina Segundo (incluyendo los regaños).

Al Departamento de Genética y Estadística. Al Dr Pedro Ochoa Galván: ¡Gracias por su desinteresada ayuda!

*Al jurado: Dr Roberto Cervantes Olivares .
MC Antonio Díaz Cruz.
Manuel Espinosa Pedroza (MVZ).
MC Francisco Castrejón Pineda.
Dra. Silvia Elena Buntinx Dios.*

A ti que te detienes a leer esto.

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCION.....	2
1. Generalidades de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
1.1. Antecedentes.....	4
1.2. Clasificación taxonómica.....	5
1.3. Morfología macroscópica y microscópica.....	5
1.4. Condiciones de crecimiento en la naturaleza.....	7
1.5. Composición de la levadura.....	8
2. Microorganismos ruminales y rumen.....	10
3. Justificación.....	13
4. Hipótesis.....	14
5. Objetivos.....	14
II. MATERIAL Y METODOS.....	15
1. Localización.....	15
2. Obtención de la cepa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> del cultivo microbiano Levucel ^{MR}	15
2.1. Aislamiento.....	15
2.2. Tinción de Gram.....	16

2.3. Pruebas bioquímicas de asimilación y fermentación de carbohidratos.....	17
2.4. Producción de ascosporas.....	18
3. Determinación de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) del cultivo microbiano Levucell	19
4. Ensayo.....	19
4.1. Preparación de Medios de cultivo.....	19
4.2. Preparación de inóculo.....	22
4.3. Presencia de microorganismos ruminales.....	22
4.4. Preparación de tratamientos e incubación.....	22
4.5. Determinación de Unidades Formadoras de Colonias (UFC).....	23
5.- Tratamientos y diseño experimental.....	23
III RESULTADOS.....	25
IV DISCUSION.....	37
V CONCLUSIONES.....	45
VI LITERATURA CITADA.....	48

INDICE DE CUADROS

No	Titulo	Página
1	Composición de la levadura	9
2	Composición proximal de un cultivo de levadura comercial (Yea Sac).....	10
3	Tratamientos utilizados en el experimento	24
4	Resultados de las pruebas de asimilación y fermentación de carbohidratos.....	25
5	Cambios en la viabilidad (UFC/ml) de las levaduras <i>in vitro</i> de acuerdo al tratamiento y distintos tiempos de incubación.	28
6	Análisis de varianza para la transformación logarítmica de las UFC de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> obtenidas <i>in vitro</i> en condiciones de aerobiosis o anaerobiosis y en presencia o ausencia de microorganismos ruminales.....	30
7	Viabilidad en UFC de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en aerobiosis con y sin la presencia de microorganismos ruminales.....	31
8	Viabilidad en UFC de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en anaerobiosis con y sin la presencia de microorganismos ruminales.....	32
9	Viabilidad en UFC de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a diferentes tiempos de incubación en aerobiosis.....	33
10	Viabilidad en UFC de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a diferentes tiempos de incubación en anaerobiosis.....	34

INDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
A	Cambios en la viabilidad (UFC/ml) de las levaduras <i>in vitro</i> de acuerdo al tratamiento y distintos tiempos de incubación.....	35
B	Cambios en la viabilidad (UFC/ml) de las levaduras <i>in vitro</i> de acuerdo al tratamiento y distintos tiempos de incubación transformada a logaritmo base 10.....	36

RESUMEN

MENDOZA REYES VERONICA. Efecto de microorganismos ruminales bajo condiciones de anaerobiosis y aerobiosis sobre la viabilidad de *Saccharomyces cerevisiae* in vitro. (Bajo la dirección de: Mario A. Cobos Peralta, Carolina Segundo Zaragoza, Francisco Castrejón Pineda y Sergio Angeles Campos.)

Dado que aún no se ha comprobado totalmente si *Saccharomyces cerevisiae* mantiene una población estable bajo condiciones anaeróbicas y si ésta es capaz de tener alguna acción metabólica en rumen, ni cuáles son los factores más importantes que afectan su viabilidad en dicho medio, en el presente ensayo se probó el efecto de los microorganismos ruminales sobre la levadura *Saccharomyces cerevisiae* en un medio de cultivo derivado de líquido ruminal bajo condiciones de aerobiosis y anaerobiosis. El trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Microbiología del Programa de Ganadería del Instituto de Recursos Genéticos y Productividad del Colegio de Posgraduados, en los laboratorios del Departamento de Nutrición Animal y en el de Micología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Se realizaron 12 tratamientos que se distribuyeron en un diseño completamente al azar con arreglo factorial $3 \times 2 \times 2$, dos cepas de levaduras más 1 testigo por 2 poblaciones (con y sin presencia de microorganismos ruminales) por 2 condiciones (con y sin presencia de anaerobiosis), con 12 repeticiones en cada tratamiento. Se aisló e identificó la cepa *Saccharomyces cerevisiae* del cultivo microbiano Leuocell. Se preparó el medio de cultivo glucosa líquido ruminal clarificado (GLRcl), hecho a base de líquido ruminal fresco. En este medio se colocó a la levadura y a los microorganismos ruminales, observando el efecto de éstos sobre la viabilidad de *Saccharomyces cerevisiae*, evaluada a través del conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) después de la siembra de gotas de $20 \mu\text{L}$ en agar dextrosa Sabouraud (SDA), obtenidas de las diluciones décuples seriadas realizadas de los tubos de las incubaciones. Para las condiciones de anaerobiosis se saturó el medio con CO_2 y para lograr la ausencia de microorganismos ruminales, el líquido ruminal fresco se esterilizó en autoclave a 121°C , 15 libras de presión, 15 minutos. Los resultados se sometieron al análisis de varianza para el diseño antes mencionado; se tomó como unidad experimental la gota sembrada en el agar. Se observó que la levadura mantiene una población estable en el medio GLRcl tanto en condiciones de aerobiosis como en anaerobiosis sin la presencia de microorganismos ruminales. Cuando se adicionan microorganismos ruminales y bajo condiciones de aerobiosis, la viabilidad de la levadura disminuye al paso del tiempo; sin embargo, se registró una marcada disminución en la viabilidad de la levadura después de que ésta fue puesta bajo condiciones de anaerobiosis y en presencia de microorganismos ruminales. En estas mismas condiciones a la hora 24 ya no hubo presencia de levaduras. Se concluye que en condiciones anaerobias y en presencia de microorganismos ruminales la viabilidad de *Saccharomyces cerevisiae* disminuye después de 12 horas de incubación.

I. INTRODUCCION

En México, como en otros países, se utilizan materias primas en la alimentación de rumiantes que en su mayoría no son aprovechables para la alimentación del hombre. Tal es el caso de los subproductos agrícolas, los cuales son convertidos en productos de alta calidad por los rumiantes. En un futuro no lejano, las dietas altas en granos y concentrados en este tipo de animales serán incosteables, por lo que el aprovechamiento de la celulosa de los vegetales adquirirá mayor importancia. Para optimizar el empleo de la fibra del forraje se debe tomar en cuenta la interacción compleja que existe entre a) composición y estructura de la pared celular de la planta, b) microbiota ruminal y c) metabolismo del animal.

Se han probado tratamientos directos a la planta, los cuales incrementan su digestibilidad o bien modifican el metabolismo del rumen en el animal de tal forma que se incrementan sus parámetros productivos. Algunos de los modificadores de la fermentación son los aditivos que combinados con los esquilmos agrícolas ofrecen resultados satisfactorios. Los aditivos no sólo modifican el metabolismo del rumen, también son preservadores de los alimentos, modificadores del consumo, moduladores de la digestión, alteradores del metabolismo y la salud, y otros (5,51). Dentro del grupo de modificadores del consumo están los cultivos microbianos que se clasifican a su vez en bacterianos y fungales. Estos interactúan y modifican la microflora ruminal, dando lugar a la formación de compuestos que son aprovechables por el organismo animal. Algunas de las especies de hongos más usadas son *Aspergillus oryzae* y *Saccharomyces cerevisiae*. Este último ha sido probado tanto en rumiantes como en no rumiantes, demostrándose que altera las condiciones del tracto gastrointestinal, principalmente en los no rumiantes (33,34,44,45). Cuando se incluye un alto nivel

de carbohidratos en la dieta de rumiantes, se acidifica el pH ruminal (36.40); sin embargo, al incluir *Saccharomyces cerevisiae* en algunos experimentos se encontró una modulación del pH, teóricamente por la disminución en la concentración de ácido láctico, ya que se supuso que la presencia de levadura incrementó la población de *Selenomonas ruminatum*, una bacteria que utiliza como sustrato el ácido láctico evitando así, de alguna forma la acidificación del medio ruminal. Y facilitando la supervivencia de bacterias celulolíticas anaeróbicas (sensibles a un pH ácido), que degradan la fibra (29,30,34,40,43). Otra explicación acerca de la disminución de la concentración de lactato fue propuesta por Dawson (1990), quien indicó que este resultado pudo haberse debido a la utilización de un precursor del ácido láctico por parte de las bacterias propiogénicas. En un estudio en el que se utilizó la misma levadura, se observó una reducción en la concentración total de oligosacáridos en el líquido ruminal, incluyendo azúcares (hexosas) como la maltotriosa y maltosa. Esto es importante considerando que ambos oligosacáridos son utilizados por la levadura y se relacionan con la acción de una enzima para ser convertidos a glucosa, siendo así sustratos para el crecimiento de la levadura y aumentando la concentración de propionato, a la vez que se reduce la relación de acetato-propionato (24).

Sin embargo, existen datos de algunos ensayos en ovinos alimentados con rastrojo de maíz (65%), en donde el pH se redujo en los animales en los que se incluyó cultivo de levadura *Saccharomyces cerevisiae* intraruminalmente (3,20).

Las pequeñas cantidades evacuadas y digeridas de material fibroso en el rumen son las mayores restricciones que limitan el consumo voluntario de dietas a base de subproductos lignocelulósicos. Por lo tanto, el incremento en la digestibilidad o en la tasa de digestión permite, a su vez el incremento en la tasa de recambio del contenido ruminal, resultando en un aumento en el consumo de

alimento, con la extracción de gran proporción de la energía presente en el mismo. En vacas altas productoras de leche, la adición de cultivo de levadura a base de *Saccharomyces cerevisiae* modificó la ingestión de alimento y la concentración de metano (68).

Además de los factores antes mencionados, *Saccharomyces cerevisiae* aparentemente modifica también el desarrollo de bacterias celulolíticas, la población de protozoarios, la fermentación de carbohidratos estructurales, la concentración de nitrógeno amoniacal, y la concentración de ácidos grasos volátiles (AGV's, acetato y butirato). Sin embargo como ya se ha mencionado, los resultados de los diferentes ensayos experimentales son inconsistentes, es decir que en una misma variable puede haber incremento, decremento o no haber modificación, lo que ha ocasionado gran controversia y aún no está claro el efecto de la levadura a nivel ruminal (45,50,61,68).

1. Generalidades de *Saccharomyces cerevisiae*:

1.1. Antecedentes: Existen aproximadamente 40 cepas de *Saccharomyces* que se han utilizado para la fabricación de cerveza, vino y alcohol. *Saccharomyces cerevisiae* es la denominación específica de la levadura de fermentación de la cerveza (*Saccharo*=azúcar, *myces*=hongo y *cerevisiae*=cerveza). Es un hongo levaduriforme, perteneciente a la familia de los Ascomycetes. La levadura es utilizada en la industria cervecera y constituye un alimento valioso para los animales, quienes pueden consumirla húmeda o desecada (63,65). A continuación se describirán algunas de las características

más importantes de la levadura que son relevantes para explicar su comportamiento en el ensayo.

1.2. Clasificación taxonómica (2):

Reino: *Fungi*
Subreino: *Eumycota*
División: *Amastigomycetes*
Subdivisión: *Ascomycotina*
Clase: *Hemiascomycete*
Subclase: *Hemiascomycetidas*
Orden: *Endomycetales*
Familia: *Saccharomycetaceae*
Género: *Saccharomyces*
Especie: *cerevisiae*

1.3. Morfología macroscópica y microscópica: Para poder reconocer y aislar a *Saccharomyces cerevisiae* fundamentalmente se deben caracterizar las diferentes cepas a través de su morfología macroscópica y microscópica y las propiedades de fermentación de la misma.

Observación microscópica: en frotis de cultivos de 24 horas teñidos con la técnica de Gram se observan células de color azul intenso (blastosporas) de formas redondas u ovals con diferentes tamaños. Miden de 4-8 μm de diámetro; algunas pueden estar en gemación, con frecuencia se encuentran cadenas celulares ramificadas debido a que quedan unidas cuando se reproducen; el tiempo de un ciclo celular completo es de 100 minutos (9). La levadura posee un núcleo bien observable rodeado de citoplasma y grandes vacuolas. Algunas especies forman células muy alargadas que se agrupan, dando la apariencia de un micelio que se denomina pseudomicelio (7,12,58). La levadura presenta una

sola mitocondria multirramificada. la cual tiene su propio DNA y sus propios ribosomas; muestra gemación multipolar (7,8,12,42). También se ha utilizado la capacidad que tiene para formar ascosporas como método de identificación. La ascospora es una espora sexual característica de los ascomicetos, la cual se produce en una estructura llamada asca originada por la fusión de núcleos. *Saccharomyces cerevisiae* forma las ascosporas en medios como el V8, caldo zanahoria y agar ascosporas. para estimular la esporulación se usa manosa, maltosa y ácidos orgánicos como el acetato de potasio o acetato de sodio (0.1-1% peso/vol). Sin embargo concentraciones altas de azúcares inhiben la esporulación, al igual que una elevada temperatura. Se considera que la temperatura óptima de esporulación es alrededor de 30°C con un intervalo entre 11-37°C (7,12). En un mismo frotis se pueden observar ascosporas y blastosporas, pero hay una clara diferenciación entre éstas. Las primeras son esféricas o redondas y están dentro del asca y se presentan de dos a cuatro en su interior; las segundas son ovales o alargadas como ya se describió anteriormente.

Macroscópicamente, en Agar Dextrosa Sabouraud (SDA), incubada durante 24-36 horas a 30°C. *Saccharomyces cerevisiae* da lugar a colonias redondas, de color blanco cremoso y tiene un olor característico a fermento (7,8,12,27,41,42). Crece en un rango de temperatura de 3-40°C, a un pH que va de 3.5 a 7.5, requiere carbohidratos, compuestos nitrogenados y substancias minerales. Los carbohidratos que fermenta son: glucosa, sacarosa y maltosa; los

que no fermenta: xilosa, celobiosa y lactosa. El producto de la fermentación de azúcares es el alcohol etílico y dióxido de carbono. *Saccharomyces cerevisiae* puede sintetizar muchas de las vitaminas necesarias para su crecimiento, pero en anaerobiosis necesita de varias vitaminas, ya que en esta situación no operan algunas de las síntesis normales. Es por esto que las levaduras crecen mejor en condiciones aeróbicas, sin embargo las fermentativas pueden hacerlo lentamente en condiciones anaeróbicas. La levadura viva seca en no rumiantes, se revitaliza en el tracto gastrointestinal y tiene la capacidad de producir ácidos grasos como acético, láctico y fórmico, en concentraciones que no pueden tolerar algunos de los microorganismos causantes de enfermedad. Esto explica el modo de acción en estos animales, ya que evita la proliferación de organismos patógenos (12,24,25,65).

1.4. Condiciones de crecimiento en la naturaleza: Las levaduras son organismos que crecen en medios ricos en nutrientes solubles que se difunden hacia las células; estos medios tienden a mantener a la población y no hay necesidad del crecimiento direccional. Algunas levaduras pueden usar metano como fuente de carbono y energía, pero la fuente más abundante de energía la constituyen los carbohidratos de origen vegetal. Usan glucosa así como otras hexosas o pentosas derivadas de azúcares. Si por alguna razón se carece de la capacidad para sintetizar azúcares a una tasa suficiente como para cubrir las necesidades de la pared, se pueden usar grasas, proteínas, etc (19,25,39).

Las levaduras requieren compuestos orgánicos preformados como fuente de energía y carbono para sus funciones vitales. Las moléculas orgánicas más simples, como monosacáridos, aminoácidos y ácidos orgánicos, las obtienen a través de la membrana celular, es decir, que secretan enzimas al exterior, las cuales son inducidas por la presencia del sustrato y suprimida su síntesis por la presencia de productos finales o compuestos de alta disponibilidad. Un aspecto importante de la digestión que las levaduras llevan a cabo en el medio exterior es que los productos de la degradación de los polímeros quedan potencialmente disponibles para todos los microorganismos que estén en el mismo medio y se establecen relaciones simbióticas, tales como el saprofitismo secundario de azúcares. Es decir, que los hongos que no pueden degradar polímeros viven en estrecha asociación con degradadores de éstos, compartiendo una porción de los productos de degradación enzimática. Para la difusión de nutrientes y enzimas se requiere una película de agua (25,27).

1.5. Composición de la levadura: Dado que teóricamente las levaduras podrían ser una fuente de energía para los microorganismos ruminales, en el cuadro 1 se marcan algunos de los compuestos químicos que forman parte de la levadura. El cuadro 2 presenta la composición proximal de un cultivo a base de *Saccharomyces cerevisiae*.

Con respecto a la composición química de la pared celular, en el caso de la blastospora esta se encuentra constituida por glucanas (30%), mananas(30%), quitina (1%) y 7 % de proteínas. En el caso de las ascosporas, estas son ricas en

carbohidratos (glucanas, mananas y trehalosa) y lípidos, pero pobres en proteínas y contenido de aminoácidos (32, 55).

Cuadro 1. Composición de la levadura (58,63)

COMPOSICION	CONCENTRACION
Aminoácidos¹	g/100g MS
Arginina	2.4
Isoleucina	2.5
Lisina	3.1
Fenilalanina	2.1
Triptofano	0.6
Histidina	2.7
Leucina	3.8
Metionina	0.6
Treonina	2.4
Valina	2.8
Minerales	μ g/g de MS
Aluminio	1000
Bario	150
Cobalto	50
Piomo	400
Manganeso	70
Zinc	3000
Vitaminas	μ g/g de MS
Acido fólico	19-35
Tiamina	29-90
Acido pantoténico	118-198
Niacina	190-585
Biotina	0.5-1.8
Acido aminobenzoico	8-95

¹ El N total es de 8.44g/100 g de MS de levadura

Cuadro 2. Composición proximal de un cultivo de levadura comercial (Yea Sacc) (57).

	%
FAD ¹	14
Cenizas	8
ELN ²	29
Humedad	10.4
Grasas	9
Materia Seca	89.6
Proteína Cruda	24

¹ FAD=Fibra ácido detergente

² ELN=Elementos libres de nitrógeno

2. Microorganismos ruminales y rumen:

El rumen es el sitio donde se realiza la digestión del alimento gracias a la acción de microorganismos que viven en asociación simbiótica con el animal. Estos producen ácidos grasos volátiles, que utilizan como fuente de energía, así como proteína de origen microbiano. Las características que rigen en el rumen y que facilitan el establecimiento de microorganismos anaeróbicos y su actividad son variables incluso bajo condiciones normales de manejo y alimentación. Dentro de los microorganismos que se encuentran en el rumen figuran: bacterias (10^9 - 10^{12} /mL de líquido ruminal), protozoarios (10^4 - 10^6 /mL de líquido ruminal), y hongos (10^3 - 10^4 /mL de líquido ruminal). Aunque en la actualidad se considera que las bacterias ruminales están más relacionadas con el proceso de degradación o fermentación de los alimentos, no se descarta la importancia de

los demás microorganismos ruminales. Estos se ven afectados por factores dependientes del animal tales como: consumo de alimento, tipo de alimentación, cantidad de saliva secretada y su composición; y factores relacionados con el ambiente ruminal, por ejemplo: tasa de dilución de líquidos y sólidos, pH, concentración de amonio, disponibilidad de carbohidratos solubles y estructurales, concentración de ácido láctico, presencia de factores de crecimiento, depredación entre microorganismos, potencial de óxido-reducción, temperatura y osmolaridad. (13,17,31)

La población microbiana del rumen también incluye la presencia de hongos anaeróbicos, que se estiman que constituyen aproximadamente el 8% del total de la biomasa microbiana. Estos tienen la capacidad de hidrolizar celulosa y xilanos de hemicelulosa, pero poco se sabe acerca del papel de cada especie en la degradación de tejidos de plantas. Los hongos ruminales han sido fáciles de aislar y purificar; sin embargo, como en el caso de bacterias y protozoarios, su población puede ser manipulada o afectada por el tipo de ración ingerida por el animal. Algunos estudios indican que la mayoría de las especies tiene actividad celulolítica. Los hongos crecen sobre fragmentos de plantas dentro del rumen y son capaces de invadir la pared celular de plantas lignificadas y ganar acceso a carbohidratos fermentables no disponibles para las bacterias, que actúan a nivel superficial. Incluso pueden emplearse las enzimas producidas por los hongos como *Trichoderma viridae* sobre los forrajes para ensilar y hacer a la celulosa más digestible tanto *in vitro* como *in vivo* (17).

Se han aislado levaduras en el contenido ruminal, por ejemplo *Rhodotorula spp.*, aunque son poblaciones transitorias. Se reportó que *Saccharomyces cerevisiae* se multiplica cuando se introduce a simuladores del rumen, aunque en algún punto ocurre la degradación de la levadura con la extrusión de su contenido. Además, dado que es un microorganismo anaerobio facultativo, su crecimiento en rumen no sería difícil. Se ha hipotetizado incluso que la levadura pudiera tener una actividad directa en la degradación de la fibra a través de una exoenzima, aunque se cree que su acción es más bien indirecta, al favorecer el desarrollo de bacterias celulolíticas relacionadas con la degradación de la fibra por proporcionar a éstas una fuente de ácidos grasos de cadena ramificada (6,24,28,40,68).

Se ha propuesto que dado que en el rumen hay una baja cantidad de azúcares, dado lo cual se estimula la formación de ascosporas por la levadura, para lo que tiene que sintetizar exoenzimas que degraden la pared celular, provocando así la fermentación de otros compuestos presentes en el rumen que benefician al animal o a la microbiota (33,55).

3. Justificación:

Dado que aún no se ha comprobado totalmente si *Saccharomyces cerevisiae* mantiene una población estable bajo condiciones anaerobias y si es capaz de tener una acción metabólica en rumen, ni cuáles son los factores más importantes que afectan su viabilidad en dicho medio, en el presente ensayo se probó el efecto de los microorganismos ruminales sobre la levadura en un medio de cultivo derivado de líquido ruminal bajo condiciones de aerobiosis y anaerobiosis.

4. Hipótesis:

Los microorganismos ruminales disminuyen la viabilidad de *Saccharomyces cerevisiae* en condiciones *in vitro*.

La viabilidad de *Saccharomyces cerevisiae* es mayor en condiciones de anaerobiosis que en aerobiosis *in vitro*.

5. Objetivo general:

Determinar la viabilidad de *Saccharomyces cerevisiae* ante la presencia de microorganismos ruminales *in vitro*, bajo condiciones de anaerobiosis y aerobiosis y con diferentes tiempos de incubación.

Objetivos específicos:

- 1.-Aislar e identificar *Saccharomyces cerevisiae* en el cultivo microbiano LevuCell^{MR}.
- 2.-Determinar la concentración en Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de *Saccharomyces cerevisiae* en el cultivo microbiano LevuCell^{MR}.
- 3.- Determinar el efecto de los microorganismos ruminales sobre la viabilidad (UFC) de *Saccharomyces cerevisiae*.
- 4.-Evaluar el efecto de las condiciones de aerobiosis y anaerobiosis sobre la viabilidad (UFC) de *Saccharomyces cerevisiae*.

II. MATERIAL Y METODOS:

1. Localización: El trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Microbiología del Programa de Ganadería del Instituto de Recursos Genéticos y Productividad del Colegio de Posgraduados, en los laboratorios del Departamento de Nutrición Animal y en el de Micología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

2. Obtención de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* del cultivo microbiano Levucell^{MR}

2.1 Aislamiento: Se realizó una suspensión con 1 g del cultivo microbiano Levucell^{MR} y 10 mL de solución salina fisiológica al 0.85% (SSF). Se agregaron cristales de NaCl, 8.5 g/L, ajustando a pH 7 con HCl o NaOH; se esterilizó en autoclave a 121°C y 15 libras de presión por 15 minutos. Se tomó una asada de la suspensión anterior para sembrar con la técnica de dilución en una caja con Agar Glucosa según Sabouraud (SDA).

Composición del SDA: Contiene por litro peptonas, 10 g; D(+)-glucosa, 40 g; agar-agar, 15 g. Además, se adicionó como antibiótico una combinación de penicilina-estreptomicina a una dosis de 50 mg por litro de medio y sulfato de gentamicina, 100 mg por litro de medio (8,12).

La caja con SDA sembrada con la levadura se incubó 24-48 horas a 30°C. Se observó el desarrollo de colonias con aspecto levaduriforme, se hicieron frotis fijos y luego se tñieron con la tinción de Gram, observándose que

morfológicamente eran muy semejantes a *Saccharomyces cerevisiae* de acuerdo con la bibliografía (7,14,27,42)

NOTA: Durante todo el ensayo se utilizó un testigo positivo, es decir una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* de laboratorio.

2.2. Tinción de Gram: (12,14)

a) Se hizo un frotis fijo del cultivo colocando una gota de agua destilada en un portaobjetos con asa microbiológica; se tomó un poco de cultivo y homogenizó la suspensión en la superficie del portaobjetos, dejándose secar a temperatura ambiente, y se fijó la preparación con calor.

b) Se agregó solución de cristal violeta en cantidad suficiente para cubrir la preparación; luego de 30 segundos, se lavó con agua de la llave.

c) Se cubrió la preparación con solución de lugol y después de 30 segundos se decantó.

d) Se agregó una solución de alcohol acetona; después de 2 segundos, se lavó.

e) Se utilizó una solución de fucsina básica como colorante secundario; luego de 30 segundos se lavó.

f) La preparación se dejó secar a temperatura ambiente y se procedió a observarla.

2.3. Pruebas bioquímicas de asimilación y fermentación de carbohidratos:

Estas pruebas se basan en la capacidad que tienen algunos microorganismos para utilizar (acidificar) los carbohidratos. Se utilizó un caldo peptonado, libre de carbohidratos, al que se adicionó el carbohidrato que deseaba probarse como sustrato de la reacción. Dicho carbohidrato se adicionó en una concentración de 0.5 a 1%, además de un indicador de pH en el medio. Para detectar la fermentación de los carbohidratos se incluyó en el medio un tubo de "Durham" invertido con el fin de determinar la producción de gas. Se preparó una suspensión de un cultivo de 24 horas de *Saccharomyces cerevisiae*: Levucel^{MR} y cepa testigo en SSFa 0.85% y estandarizado a la turbidez del tubo de McFarland 3×10^8 células/mL. De esta suspensión se agregó 0.5 mL a cada tubo conteniendo un carbohidrato diferente. Los tubos se incubaron 24 horas y entonces se realizó la lectura.

Los azúcares utilizados en las pruebas de asimilación y fermentación

fueron:

Asimilación

Dulcitol
Melobiosa
Galactosa
Glucosa
Sacarosa
Lactosa
Maltosa

Fermentación

Glucosa
Lactosa
Maltosa
Sacarosa

La prueba positiva se observó por el cambio de coloración de rojo a amarillo. En el caso de fermentación se observó además gas en el tubo Durham (53).

Cuando la levadura fué identificada, se conservó en un tubo de medio inclinado de SDA tapado, protegido con papel "parafilm" y en refrigeración.

2.4. Producción de ascosporas.

Para la producción de ascosporas se elaboró un medio específico con la siguiente composición por litro: acetato de potasio, 10 g; extracto de levadura, 2.5 g; dextrosa, 1 g; agar bacteriológico, 30 g; pH, 6.5 (11, 65).

Para la preparación del medio se utilizaron matraces de diferente capacidad, según la cantidad que se requirió, elaborando tapones de gasa con algodón para cada uno. Después de esterilizar, se adicionó una mezcla de antibióticos (penicilina-estreptomicina, 200 mg, y sulfato de gentamicina, 100 mg / L) bajo condiciones de esterilidad y posteriormente se vació en recipientes (cajas de petri o tubos de ensaye). Una vez solidificados e identificados, se colocaron en la estufa a 37°C por 24 horas. Cuando no se presentó crecimiento alguno se utilizaron o se conservaron en refrigeración.

De las colonias de la levadura crecidas en SDA se tomó una asada y se sembraron, tanto en caldo zanahoria como en agar, ascosporas. A las 72 horas de la incubación se realizó la tinción de azul de metileno, dilución 1:1000 y se observaron al microscopio. Además, se realizó tinción de gram a las laminillas de caldo zanahoria, con lo que se determinó que las dos cepas eran de *Saccharomyces cerevisiae* (65).

3. Determinación de las unidades formadoras de colonias (UFC) del cultivo microbiano Levucell^{MR}:

En un tubo de ensaye con 10 mL de SSF 0.85%, se diluyó 1g del producto comercial. Después de ser agitado vigorosamente, se siguió la *técnica de conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) en placa de Miles y Misra* (22), que se describe a continuación:

Del tubo muestra se tomó 1 mL y se realizaron diluciones décuples seriadas desde 1×10^{-1} hasta 1×10^{-6} , en tubos que contenían 9 mL de SSF estéril. Posteriormente, se sembraron 3 gotas de 20 μ L por duplicado en cajas de Petri con SDA, con penicilina-estreptomicina y sulfato de gentamicina como antibióticos, y se incubaron a 30°C. Después de 24 horas se realizó el conteo de UFC en la dilución que lo permitiera; se obtuvo el promedio y ajustando la concentración al factor de dilución y se registró el número de UFC/mL (10,22,23).

4.-Ensayo:

4.1 Preparación de medios de cultivo:

4.1.1. Medio de cultivo GLRcl (Glucosa Líquido Ruminal clarificado)(16):

A. Preparación del líquido ruminal clarificado:

a) Obtención del líquido ruminal fresco¹

El líquido ruminal se recolectó de un toro fistulado, de la raza Holstein, con un peso promedio de 500 Kg, alimentado con la siguiente dieta (en base

¹ El líquido ruminal se obtuvo de la misma forma tanto para preparar el medio GLRcl, como para su uso en fresco.

húmeda): ensilado de maíz (60%), alfalfa (20%) y rastrojo de maíz (20%). Esta ración se ofreció *ad libitum*, así como agua fresca y limpia. El matraz receptor del líquido se inyectó con CO_2 , se conservó tapado y sumergido en agua a una temperatura de 37-40°C para evitar cambios en el paso del rumen al matraz. Una vez recolectado, el líquido se transportó inmediatamente al laboratorio para su utilización.

b) El líquido recolectado se centrifugó a 18,000 RPM (23,420 unidades gravitacionales) por 25 minutos a 4°C, para obtener el sobrenadante. Los sólidos se desecharon.

c) El líquido recuperado se esterilizó en autoclave por 20 minutos a 15 libras de presión y 121°C, para precipitar proteínas.

d) Nuevamente se centrifugó bajo las condiciones arriba mencionadas y se decantó para eliminar las proteínas precipitadas.

e) El líquido se esterilizó nuevamente como se indica en el inciso c) y una vez frío se colocó en refrigeración para su uso posterior.

B. Preparación del medio de cultivo:

Ingredientes, (cantidad para 100mL):

Glucosa, 50 mg

Líquido ruminal clarificado, 33.3 mL (ver inciso A)

Peptona de caseína ("Bioxon"), 0.3 g

Extracto de levadura, 0.2 g

Solución mineral 1: 5 mL de (K_2HPO_4 , 6.0 g en 1000 mL)

Solución mineral 2: 5 mL de (K_2HPO_4 , 6.0 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 6 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.6 g;

NaCl , 12 g; MgSO_4 , 2.45 g; H_2O destilada c. b. p. 1000 mL)

Na_2CO_3^2 (8%), 5 mL

Cisteína² (solución), 2 mL

Resazurina² (solución 1%), 0.1 mL

² Agregados solamente en el medio de cultivo anaerobio.

C. Preparación del medio para condiciones de aerobiosis: el medio GLRcl se esterilizó en autoclave a 121°C y 15 libras por 15 minutos, colocándolo en un matraz con tapón de goma, fijado éste con alambre para evitar la salida de ácidos grasos volátiles. Bajo condiciones de esterilidad, se vaciaron 8 mL en tubos con tapón de algodón y gasa. Para verificar que no estaban contaminados se incubaron durante 48 horas a 37°C. Después de este tiempo se utilizaron los tubos con el medio de cultivo en los que no hubo crecimiento.

D. Preparación del medio para condiciones de anaerobiosis: Luego de haber esterilizado el medio de cultivo, incluyendo a la resazurina como indicador de anaerobiosis (en presencia de oxígeno toma coloración rosada), bajo condiciones de esterilidad se adicionaron el carbonato de sodio y la cisteína (soluciones previamente esterilizadas). Se burbujeó CO₂ hasta que el indicador viró su color obteniéndose un medio transparente color ambar. Entonces se vaciaron 8 mL en cada uno de los tubos de ensaye con tapón de goma (esterilizados) que se inyectaron con CO₂ para mantener la anaerobiosis. Se probó su esterilidad durante 48 horas a 37°C y se utilizaron los tubos en los que no había crecimiento alguno.

4.1.2. Medio de cultivo Agar glucosa 4% según Sabouraud; ver punto 2.1, dicho medio se utilizó para la siembra de las gotas de 20 µL obtenidas de los tubos de incubación de cada uno de los tratamientos y realizar el conteo de UFC en la dilución que lo permitiera.

4.2. Preparación del inóculo

a) Se hizo una suspensión con una asada de cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* tanto de la cepa Leuvecel^{MR} como la de laboratorio de 24 horas de incubación en 10 mL de SSF estéril. De la suspensión anterior, se determinó la concentración de células por mL en un hemocitometro.

b) A través de diluciones o adición de cultivo, según fué el caso, se llegó a una concentración de 1×10^8 células/mL.

c) En el caso del testigo negativo, se adicionó como placebo SSF estéril.

4.3. Presencia de microorganismos ruminales:

Se evitó la presencia de microorganismos ruminales en los tratamientos que lo requirieron a través de la esterilización del líquido ruminal en autoclave a 121°C y 15 libras de presión por 15 minutos.

4.4. Preparación de tratamientos e incubación:

Dependiendo del tratamiento (cuadro 3) se usaron tubos con 8 mL de medio GLRcl aerobio o anaerobio (sin y con inyección de CO₂, respectivamente) y bajo condiciones de esterilidad se inocularon por duplicado con :

1 mL de líquido ruminal fresco (tratamiento 4-6 y 10-12) ó

1 mL de líquido ruminal esteril (tratamiento 1-3 y 7-9) más

1 mL de inóculo de levadura cepa Leuvecel^{MR} (tratamiento 2, 5, 8 y 11) o cepa de laboratorio (tratamiento 3, 6, 9 y 12) o

1 mL de SSF (tratamientos 1, 4, 7 y 10).

Los tubos se incubaron en "baño María", a una temperatura de 38-39.5°C por 0,12, 24, 36 y 48 horas.

4.5. Determinación de Unidades Formadoras de Colonias (UFC)

Se siguió la metodología de Miles y Misra (23) descrita en el punto 3, en la cual se incluyeron diluciones decuples seriadas desde 1×10^{-1} hasta 1×10^{-6} y de cada dilución se sembraron 6 gotas de 20 μ L en el medio SDA por cada tubo de incubación, posteriormente se realizó el conteo en la dilución que lo permitió registrándose el número de colonias para obtener las unidades formadoras de colonias por mL, obteniéndose el valor de 12 gotas por tratamiento ya que existió una replica por tubo.

5. Tratamientos y Diseño Experimental:

Se utilizaron 12 tratamientos que se describen en el cuadro 3, éstos se distribuyeron en un diseño completamente al azar con arreglo factorial (con y sin presencia de microorganismos ruminales, con y sin presencia de anaerobiosis), y 1 duplicado en cada tratamiento. Se tomó como unidad experimental la gota de 20 μ L sembrada en el agar. Como variable de respuesta se utilizó la viabilidad de las levaduras que se expresó por el número de unidades formadoras de colonias (UFC) el cual se transformó a logaritmo base 10 para el análisis con el paquete estadístico S.A.S.(Statistical Analysis System).

Los resultados se sometieron al análisis de varianza para un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial, incluyendo los factores que se indican en el siguiente modelo (60,46,64):

$$Y_{ijk} = M + R_i + T_j + H_k + TH_{jk} + E_{ijk}$$

Donde:

Y=Unidades Formadoras de Colonias

i =subíndice réplica

j =subíndice tratamiento

k =subíndice hora

Y_{ijk} = T_i ^{ésima} UFC a la k ^{ésima} hora, en la i ^{ésima} réplica del j ^{ésimo} tratamiento.

M= Media general.

R_i = Efecto de la i ^{ésima} réplica ($i=1,2$)

T_j = Efecto del j ^{ésimo} tratamiento ($j=1, \dots, 12$)

H_k =Efecto de la k ^{ésima} hora ($k=1, \dots, 5$)

TH_{jk} = Efecto de la interacción tratamiento x hora.

E_{ijk} =Error experimental..

Cuadro 3. Tratamientos utilizados en el experimento

Saccharomyces cerevisiae	LIQUIDO RUMINAL			
	ESTERIL	FRESCO	ESTERIL	FRESCO
	AEROBIOSIS		ANAEROBIOSIS	
Placebo(SSF, sin levadura)	T1	T4	T7	T10
Levucell MR	T2	T5	T8	T11
Laboratorio	T3	T6	T9	T12

SSF= Solución salina fisiológica

III. RESULTADOS:

I-Obtención de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* del cultivo microbiano Levucell^{MR}

Del cultivo microbiano Levucell^{MR} se aislaron colonias levaduriformes confirmadas con la tinción de Gram.

Los resultados de las pruebas bioquímicas de asimilación y fermentación determinaron que la levadura aislada era *Saccharomyces cerevisiae* ya que en estas los resultados fueron iguales comparados a la cepa testigo del laboratorio y con la bibliografía (7, 14, 27, 41) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Resultados de las pruebas de asimilación y fermentación de carbohidratos.

CARBOHIDRATO	ASIMILACION		FERMENTACION	
	CEPA Levucell ^{MR}	Cepa Testigo	CEPA Levucell ^{MR}	Cepa Testigo
Melobiosa	-	-	-	-
Galactosa	+	+	+	+
Glucosa	+	+	+	+
Sacarosa	+	+	+	+
Lactosa	-	-	-	-
Maltosa	+	+	+	+

2.- Determinación de las UFC del cultivo microbiano Levucell^{MR} :

La concentración promedio encontrada fue de 1.8×10^4 UFC/mL. Tanto la cepa Levucell^{MR} como la testigo produjeron ascosporas 72 horas postincubación a 30°C.

3.- Ensayo para determinar el efecto de los tratamientos sobre la viabilidad de *Saccharomyces cerevisiae*:

Nota: Dado que no hubo efecto de réplica se consideraron 12 réplicas por cada tratamiento.

En el cuadro 5 se muestran los resultados de UFC/mL obtenidos en cada tratamiento, tanto en su concentración así como en su transformación a logaritmo base 10. Esta transformación se realizó para ajustar los datos a la distribución normal, ya que es un requisito previo para que se evalúen los resultados en el análisis de varianza. Ver figura A y B.

Las pruebas para descartar la presencia de microorganismos ruminales en aquellos tratamientos en los cuales no se requería de su actividad (T1, T4, T7 y T10) según se describió en el cuadro 3, indicaron que no hubo crecimiento de ningún tipo de colonia al tiempo de lectura (24 horas).

En el T1 (medio GLRcl aerobio + SSF + líquido ruminal estéril) no se observó ningún crecimiento en ninguno de los muestreos.

En el T2 (medio GLRcl aerobio + inóculo de cepa Levucell + líquido ruminal estéril), al tiempo cero se encontró la presencia de colonias levaduriformes a una concentración de 1.45×10^5 UFC/mL; a las 12 horas hubo disminución de la concentración hasta 6.62×10^4 UFC/mL. Posteriormente esta concentración se mantuvo constante en los siguientes muestreos.

En el T3 (medio GLRcl aerobio + inóculo de cepa testigo + líquido ruminal estéril), la concentración de UFC inicial se mantuvo en un promedio de 3×10^4 /mL en todos los muestreos.

El T4 (medio GLRcl aerobio + SSF + líquido ruminal fresco) no hubo crecimiento significativo, por lo tanto, se toma como negativo en todos los tiempos de incubación.

El T5 (medio GLRcl aerobio + inóculo de cepa Levucell + líquido ruminal fresco) mostró una concentración inicial de 1×10^5 UFC/mL, la cual se mantuvo así hasta la hora 24, cuando tuvo un descenso a 7.51×10^4 UFC/mL, y posteriormente se mantuvo así hasta el final del periodo de incubación.

En el T6 (medio GLRcl aerobio + inóculo de cepa testigo + líquido ruminal fresco), al paso de las horas se observó un decremento de 1.08×10^5 UFC/mL a las cero horas hasta 6.12×10^3 UFC / mL a las 48 horas.

El T7 (medio GLRcl anaerobio + SSF + líquido ruminal estéril), no mostró crecimiento alguno a lo largo de todos los muestreos.

El T8 (medio GLRcl anaerobio + inóculo de cepa Levucell + líquido ruminal estéril), inició con una concentración de 6.77×10^4 UFC/mL; hubo un ligero aumento a 1.2×10^5 UFC /mL en la hora 12 y 24 el cual se mantuvo hasta la hora 36, en la hora 48 disminuyó a la concentración a 10^4 UFC/ mL.

En el T9 (medio GLRcl anaerobio + inóculo de cepa Testigo + líquido ruminal estéril), la población inicial fue de 2.1×10^5 UFC/mL; luego descendió a

1.5 x 10⁵ UFC/mL a la hora 24; en la hora 36 llegó a la concentración inicial y a las 48 horas disminuyó a 6.6 x 10⁴ UFC/mL.

El T10 (medio GLRcl anaerobio + SSF + líquido ruminal fresco), no mostró crecimiento en ninguno de los tiempos de incubación.

CUADRO 5. Cambios en la viabilidad (UFC/mL) de las levaduras *in vitro* de acuerdo con el tratamiento y distintos tiempos de incubación.

TRAT*	TIEMPO DE INCUBACION					
	0	12	24	36	48	
1	0	0	0	0	0	0
2	1.454X10 ⁵ (5 15) [†]	6 629X10 ⁴ (4 817)	6 45X 10 ⁴ (4 807)	5 687X10 ⁴ (4 753)	5 725X10 ⁴ (4 752)	
3	3 112X10 ⁴ (4 491)	2 9X10 ⁴ (4 456)	3 008X10 ⁴ (4 473)	2 829X10 ⁴ (4 439)	2 266X10 ⁴ (4 353)	
4	0	0	0	0	0	
5	9 912X10 ⁴ (4 992)	1 149X10 ⁵ (5 059)	7 516X10 ⁴ (4 874)	3 991X10 ⁴ (4 600)	1 833X10 ⁴ (4 257)	
6	1 084X10 ⁵ (5 027)	6 8X10 ⁴ (4 832)	2 612X10 ⁴ (4 410)	9 041X10 ³ (3 948)	6 125X10 ³ (3 776)	
7	0	0	0	0	0	
8	6 779X10 ⁴ (4 830)	1 254X10 ⁵ (5 094)	1 225X10 ⁵ (5 079)	1 266X10 ⁵ (5 092)	6 52X10 ⁴	
9	2.1 X 10 ⁵ (5 320)	1 862X10 ⁵ (5 267)	1 587X10 ⁵ (5 107)	1 708X10 ⁵ (5 230)	6 679X10 ⁴ (4 824)	
10	0	0	0	0	0	
11	6 81X10 ⁴ (4 831)	1 58X10 ³ (3 181)	0	0	0	
12	2 02X10 ⁵ (4 298)	1 875X10 ³ (3 220)	0	0	0	

+ Los valores entre paréntesis corresponden a la transformación de la concentración a logaritmo base 10.

*Ver cuadro 3 para la descripción de los tratamientos

El T11 (medio GLRcl anaerobio + inóculo de cepa Levucell + líquido ruminal fresco) inició con una concentración de 6.81×10^4 UFC /mL y hubo una disminución a la hora 12 hasta una concentración de 1.5×10^3 UFC /mL. De las 24 a las 48 horas ya no hubo crecimiento.

El T12 (medio GLRcl anaerobio + inóculo de cepa Testigo + líquido ruminal fresco) inicia con una concentración de 2.02×10^5 UFC /mL la cual decreció a 1.8×10^3 UFC/mL en la hora 12 y a partir de la hora 24 no hubo crecimiento hasta el final del experimento (48 horas).

Análisis de varianza: El cuadro 6 presenta el análisis de varianza para el modelo descrito en el punto 5 de Material y Métodos, utilizando la transformación logarítmica de la variable UFC. Como puede apreciarse todos los efectos excepto el de repetición, fueron altamente significativos encontrándose una interacción de tratamiento X hora. Sólo se probaron 8 de los 12 tratamientos omitiéndose aquellos que no presentaron crecimiento de levadura (T1, T4, T7, T10) ver cuadro 6.

Cuadro 6. Análisis de varianza para la transformación logarítmica de las UFC de *Saccharomyces cerevisiae* obtenidas *in vitro* en condiciones de aerobiosis o anaerobiosis y en presencia o ausencia de microorganismos ruminales.

Fuente de variación	GL	Cuadrado Medio	F	P
Réplica	1	0.00055	0.08	NS*
Tratamiento	7	136.12951	18532.16	0.0
Hora	4	42.95534	5847.78	0.0
Tratamiento x Hora	28	10.95429	1491.28	0.0
Error	433	0.007346		
Total	473			

*NS= No significativo

El efecto de la aerobiosis y la presencia o ausencia de microorganismos ruminales, sobre la viabilidad de *Saccharomyces cerevisiae* a las 0, 12, 24, 36 y 48 horas de incubación, se muestra en los cuadros 7 a 10. Los cuadros 7 y 8 presentan la comparación de medias por hilera (diferentes tratamientos a la misma hora) y los cuadros 9 y 10 presentan la comparación de medias por columnas (mismo tratamiento a diferentes tiempos de incubación).

Cuadro. 7 Viabilidad en unidades formadoras de colonias (UFC) de *Saccharomyces cerevisiae* en aerobiosis, con y sin la presencia de microorganismos ruminales

AEROBIOSIS					
		SIN M.O. RUMINALES	CON M.O. RUMINALES		
TRAT	T2	T3	T5	T6	
HORA					
0	1.454X10 ⁵ ^a	3.112X10 ⁴ ^c	9.912X10 ⁴ ^b	1.084X10 ⁵ ^b	
12	6.629X10 ⁴ ^b	2.9X10 ⁴ ^c	1.149X10 ⁵ ^a	6.8X10 ⁴ ^b	
24	6.45X 10 ⁴ ^a	3.008X10 ⁴ ^b	7.516X10 ⁴ ^a	2.612X10 ⁴ ^b	
36	5.687X10 ⁴ ^a	2.829X10 ⁴ ^c	3.991X10 ⁴ ^b	9.041X10 ³ ^d	
48	5.725X10 ⁴ ^a	2.266X10 ⁴ ^b	1.833X10 ⁴ ^b	6.125X10 ³ ^c	

a, b, c, d- literal diferente por hilera (indica diferencia significativa (P< 0.01)

T2 cepa Levucell (1ml de inóculo), T3 cepa de laboratorio (Testigo positivo), T5 inóculo cepa levucell, T6 inóculo cepa de laboratorio (testigo positivo).

Cuadro. 8 Viabilidad en unidades formadoras de colonias de *Saccharomyces cerevisiae* en anaerobiosis, con y sin la presencia de microorganismos ruminales

ANAEROBIOSIS				
	SIN M.O. RUMINALES	CON M.O. RUMINALES		
TRAT	T8	T9	T11	T12
HORA				
0	6.779×10^4 ^b	2.1×10^5 ^a	6.81×10^4 ^b	2.02×10^5 ^c
12	1.254×10^5 ^b	1.862×10^5 ^a	1.58×10^3 ^c	1.875×10^3 ^c
24	1.225×10^5 ^a	1.587×10^5 ^a	0 ^b	0 ^b
36	1.266×10^5 ^b	1.708×10^5 ^a	0 ^c	0 ^c
48	6.52×10^4 ^a	6.679×10^4 ^a	0 ^b	0 ^b

a, b, c, -literal diferente por columna indica diferencia significativa ($p < 0.01$).

T8 cepa Levucell (1ml de inóculo), T9 cepa de laboratorio (Testigo positivo), T11 inóculo cepa levucell, T12 inóculo cepa de laboratorio (testigo positivo).

Cuadro 9. Viabilidad en unidades formadoras de colonias de *Saccharomyces cerevisiae* a diferentes tiempos de incubación en aerobiosis.

AEROBIOSIS					
SIN M.O. RUMINALES			CON M.O. RUMINALES		
TRAT	T2	T3	T5	T6	
HORA					
0	1.454X10 ⁵ v	3.112X10 ⁴ v	9.912X10 ⁴ v	1.084X10 ⁵ v	
12	6.629X10 ⁴ w	2.9X10 ⁴ v	1.149X10 ⁵ v	6.8X10 ⁴ w	
24	6.45X 10 ⁴ w	3.008X10 ⁴ v	7.516X10 ⁴ w	2.612X10 ⁴ x	
36	5.687X10 ⁴ w	2.829X10 ⁴ v	3.991X10 ⁴ x	9.041X10 ³ y	
48	5.725X10 ⁴ w	2.266X10 ⁴ w	1.833X10 ⁴ x	6.125X10 ³ z	

v, w, x, y, z - literal diferente por columna indica diferencia significativa ($p < 0.01$).

T1 placebo SSF (Testigo negativo), T2 cepa Levucell (1ml de inóculo), T3 cepa de laboratorio (Testigo positivo), T4 Placebo (SSF), T5 inóculo cepa levucell, T6 inóculo cepa de laboratorio (testigo positivo).

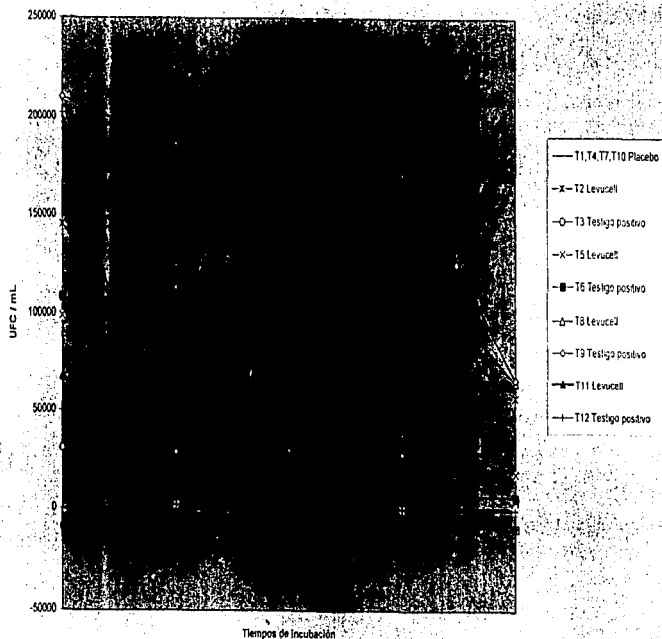
Cuadro 10. Viabilidad en unidades formadoras de colonias de *Saccharomyces cerevisiae* a diferentes tiempos de incubación en anaerobiosis.

ANAEROBIOSIS				
	SIN M.O. RUMINALES		CON M.O. RUMINALES	
TRAT	T8	T9	T11	T12
HORA				
0	6.779X10 ⁴ w	2.1 X 10 ⁵ v	6.81X10 ⁴ v	2.02X10 ⁵ v
12	1.254X10 ⁵ v	1.862X10 ⁵ v	1.58X10 ³ w	1.875X10 ³ w
24	1.225X10 ⁵ v	1.587X10 ⁵ w	0 x	0 x
36	1.268X10 ⁵ v	1.708X10 ⁵ v	0 x	0 x
48	6.52X10 ⁴ w	6.679X10 ⁴ x	0 x	0 x

v, w, x, literal diferente por columna indica diferencia significativa ($p < 0.01$).

T8 cepa Levucell (1ml de inóculo), T9 cepa de laboratorio (Testigo positivo), T11 inóculo cepa levucell, T12 inóculo cepa de laboratorio (testigo positivo)

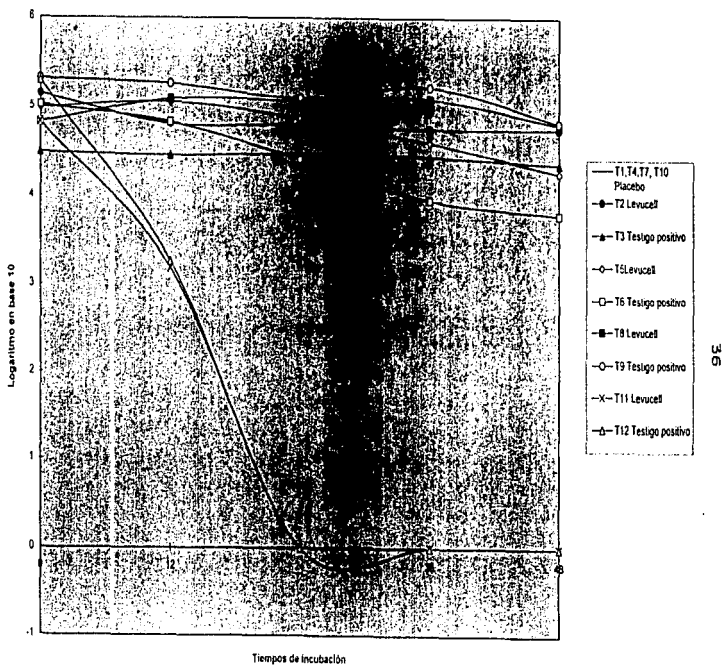
FIG A. Cambios en la viabilidad (UFC/ml) de las levaduras in vitro de acuerdo al tratamiento y distintos tiempos de incubación.



Aerobiosis y sin microorganismos animales (MOR) T1, T2, T3.
Aerobiosis con MOR: T4, T5, T6

Anaerobiosis y sin MOR: T7, T8, T9.
Anaerobiosis con MOR: T10, T11, T12

Fig B Cambios en la viabilidad (UFC/mL) de las levaduras in vitro de acuerdo al tratamiento y distintos tiempos de incubación transformada a logaritmo base 10.



Aerobiosis sin microorganismos ruminales (MOR) T1, T2, T3
 Aerobiosis con MOR: T4, T5, T6

Anaerobiosis sin MOR: T7, T8, T9
 Anaerobiosis con MOR: T10, T11, T12.

IV. DISCUSION

Como ya se ha mencionado, existe gran controversia acerca del efecto de *Saccharomyces cerevisiae* sobre el metabolismo ruminal y las variables productivas en rumiantes. Algunos estudios (35,37,47,48,55) reportan una mejoría en el metabolismo ruminal. En un estudio realizado en vacas se incrementó la digestibilidad de materia seca al adicionar una combinación de *Aspergillus oryzae* y *Saccharomyces cerevisiae*. En otro ensayo donde se usó la levadura sola, aumentó la producción láctea y de grasa (aunque aquí el placebo utilizado no estaba libre de levaduras) (33,37,45,55). Se ha reportado aumento en la digestibilidad de la proteína, de la pared celular y en el número de bacterias celulolíticas y estabilización del pH. En un simulador de rumen (*in vitro*) existe un efecto marcado en la población microbiana y la fermentación. (32,34,43,44,57). Pero al parecer estos efectos no se manifiestan con dietas altas en forraje. En diversas investigaciones realizadas en ovinos, a los cuales se proporcionaron dietas en base de esquilmos no se afectó ninguna de las variables ruminales medidas al adicionar *Saccharomyces cerevisiae*. Lo mismo sucedió en ovinos en crecimiento, a los cuales se les adicionó levadura en la ración: no se encontró mejoría en la ganancia de peso, en la conversión alimenticia o diferencias en las características de la canal por efecto de la levadura en sus dietas (3,4,17,20,21,24,36,54,56,59). Otra posibilidad es que la levadura tenga efectos en algunas variables y en otras no. En un ensayo se incrementaron los valores de la proporción acetato-propionato; sin embargo, la

ganancia diaria de peso no aumentó (49). Se reportó que en bovinos la levadura redujo la incidencia de fiebre y el número de tratamientos en predestete, pero después de ésta etapa ya no hubo efecto de la levadura (62).

Adams (1) señaló que al incluir *Saccharomyces cerevisiae* en las dietas de los rumiantes, se incrementó la tasa de dilución en rumen y mejoró la eficiencia de la producción de estos tal vez por incremento en el crecimiento bacteriano y flujos de polímeros alfa de glucosa, aminoácidos totales y microbianos al intestino delgado. Por otra parte, diversos investigadores han postulado que *Saccharomyces cerevisiae* modula el pH en vacas. Así en un ensayo donde se adicionaron granos a la dieta de vacas lactantes disminuyó la ingestión y digestión del forraje, por disminución del pH, lo que causó que se afectaran los protozoarios y las bacterias celulolíticas. Al adicionar la levadura probablemente la levadura estimuló el crecimiento de *Selenomonas ruminantium*, una bacteria que utiliza lactato, y por lo tanto, el crecimiento de esa bacteria evitó la disminución del pH ruminal (34,38,50).

Saccharomyces cerevisiae normalmente no está presente en rumen, sin embargo se sabe de la presencia de hongos anaeróbicos los cuales tienen la capacidad para degradar celulosa y los xilanos de hemicelulosa, pero poco se sabe acerca del papel específico de cada especie en la degradación de tejidos vegetales en rumen, por lo que se han estado realizando ensayos utilizando estos hongos a temperatura de 39°C y con CO₂ (24,37,43).

En esta investigación cuando la levadura se sometió a condiciones de aerobiosis y no se incluyeron microorganismos ruminales (T2 y T3) se observó que la población se mantuvo constante en ambas cepas (Testigo y Levucel^{MR}) sin embargo, existió diferencia estadística ($p < 0.01$) entre una y otra, ya que la viabilidad de Levucel^{MR} fue mayor.

La levadura aislada del cultivo microbiano Levucel^{MR} mostró mayor crecimiento bajo condiciones de aerobiosis, sin la presencia de microorganismos ruminales (T2), comparada con su desarrollo en anaerobiosis (T8).

Levucel^{MR} en condiciones de aerobiosis y con microorganismos ruminales (T5) comparada con la cepa testigo bajo las mismas condiciones (T6) mostró un crecimiento semejante (1×10^5 UFC/mL) hasta las 12 horas. A las 24 horas hubo una disminución en su crecimiento ($p > 0.01$), presentando Levucel^{MR} presentó un crecimiento mayor (1.8×10^4 UFC/mL) al de la cepa testigo (6.1×10^3 UFC/mL).

Los tratamientos tanto en condiciones de aerobiosis como en anaerobiosis que no contenían microorganismos ruminales, pero si contenían levadura (T2, T3, T8 y T9), mostraron que el medio era capaz de mantener la población de *Sacharomyces cerevisiae* estable por lo menos 48 horas, tiempo suficiente para que ésta incrementará su concentración. Por ejemplo, cuando Levucel^{MR} se incubó en condiciones aerobias sin microorganismos ruminales

(T2) presentó un decremento significativo ($p < 0.01$) en la concentración de UFC a las 12 horas; sin embargo, a partir de este muestreo la concentración se mantuvo estable y hubo conteos de UFC hasta las 48 horas. La temperatura óptima para el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* se encuentra entre 28-30°C, y se ha encontrado que la levadura puede sobrevivir a temperatura de 37°C e inclusive formar ascosporas (26,35), no obstante la temperatura es uno de los factores del medio que puede afectar su desarrollo por lo que al realizar esta investigación a 39°C, simulando que en rumen se alcanzan temperaturas de 38-40°C tal vez si afectó su desarrollo y adicionado a la falta de nutrientes como carbohidratos de alta disponibilidad probablemente determinó que en todos los tratamientos a las 48 horas disminuyera la viabilidad.

La cepa Levucel^{MR} en condiciones de anaerobiosis sin microorganismos ruminales (T8) inició con 6.7×10^4 UFC/mL y esta concentración se incrementó significativamente ($p < 0.01$) a la hora 12 (1.2×10^5 UFC/mL). Posteriormente la población se mantuvo hasta la hora 48, cuando decreció significativamente a 6.5×10^4 UFC/mL, concentración igual ($p > 0.01$) que la inicial. Comparando con la cepa testigo bajo condiciones de anaerobiosis sin microorganismos ruminales (T9) ésta inició con una concentración cercana a 2×10^5 UFC/mL que se mantuvo hasta la hora 24, después disminuyó significativamente ($p < 0.01$) decreciendo también la concentración en la hora 36 y 48. Este comportamiento indicó que la levadura mostró dificultades para mantener su población estable bajo condiciones de anaerobiosis, lo cual fue debido a que

es un microorganismo anaerobio facultativo, es decir que puede mantenerse sin oxígeno; sin embargo la estabilidad de la población disminuye ($p < 0.01$) en ausencia de este.

Cuando la levadura cepa Levucell y la testigo se inocularon bajo condiciones de aerobiosis y con microorganismos ruminales (T5 y T6), se notó un descenso gradual significativo ($p < 0.01$) desde la hora 24 hasta la la hora 48, en que la concentración de la levadura continuó disminuyendo. No obstante que las levaduras permanecieron viables todo el tiempo, los microorganismos ruminales que se mantuvieron en condiciones de aerobiosis disminuyeron la viabilidad de *Saccharomyces cerevisiae* lo cual probablemente se debió a la competencia por nutrientes principalmente de bacterias anaerobias facultativas (que sobrevivieron en presencia de oxígeno) y que se reproducen en menor tiempo que la levadura.

Al colocar a *Saccharomyces cerevisiae* (cepa Levucell^{MR} y de laboratorio) bajo condiciones de anaerobiosis y en presencia de microorganismos ruminales (T11 y T12), lo más cercano a las condiciones de rumen, la concentración de levaduras disminuyó significativamente ($p < 0.01$) desde el muestreo a la hora 12 y a partir de la hora 24 ya no se encontraron levaduras en los siguientes muestreos. Esto confirma que la levadura utilizada difícilmente puede tener alguna acción *per se* en el rumen, pues en un medio de crecimiento con características semejantes a las presentes en el rumen, no incrementó su concentración y cuando se adicionaron microorganismos ruminales, disminuyó

drásticamente su viabilidad es decir hubo una alta tasa de degradación de las levaduras. Este efecto pudo deberse, como ya se mencionó, a que las bacterias, hongos y protozoarios ruminales representan una fuerte competencia por nutrientes en el medio, además que los protozoarios tienen gran afinidad a consumir levaduras(66), de donde se supone que éstas sólo son una fuente de nutrientes para algunos de los microorganismos comunes en el rumen, que pueden consumirlos enteros o se sirven de los ácidos grasos de cadena ramificada que producen ciertas cepas (16).

En los testigos negativos es decir donde no hubo presencia de microorganismos ruminales y se usó placebo tanto en aerobiosis (T1) como en anaerobiosis (T7) no hubo crecimiento de colonias en ninguno de los tiempos de muestreo, lo cual indicó que la condición "ausencia de microorganismos" en el ensayo, se cumplió.

Dawson mencionó que *Saccharomyces cerevisiae* puede incrementar su población en simuladores de rumen, pero hasta este momento, en condiciones in vitro los resultados de la presente investigación indicaron que no manifestó viabilidad en anaerobiosis, con la presencia de microorganismos ruminales. Lo cual tal vez se deba a la utilización de cepas diferentes. Aunque recientemente se ha encontrado que *Saccharomyces cerevisiae* inducida bajo condiciones de anaerobiosis es más tolerante al efecto inhibitorio del etanol y su viabilidad aumenta comparada con la misma cepa en condiciones de aerobiosis (15,24,26,52).

En otros estudios simulando las condiciones del rumen con medios a base de líquido ruminal, donde se satura el medio con CO₂ para obtener condiciones de anaerobiosis han obtenido crecimiento de microorganismos anaerobios principalmente bacterias celulolíticas (*Selenomonas ruminantium*). (16,37,40,45,50).

Plata en 1995 postuló que la levadura se estimuló a formar ascosporas en medios con bajas concentraciones de azúcares, para formar éstas, la levadura tuvo que degradar su pared para lo cual secretó exoenzimas que pudieron indirectamente degradar otros compuestos que estuvieran en el medio, haciendolos más disponibles para la microbiota. Fué cierto que la levadura produjo ascosporas en medios como el utilizado en éste ensayo, sin embargo, para formar las ascosporas, las levaduras requieren condiciones de aerobiosis ya que se ha reportado que en anaerobiosis, estas no pueden formarse. (18,55). Y además se presume que la levadura sólo tiene acción por 12 horas y las ascosporas se forman después de 72 horas(24,67,68)

En investigaciones como la presente en las que el objetivo es estudiar la viabilidad de *Saccharomyces cerevisiae* en condiciones *in vitro* bajo la presencia de microorganismos ruminales, resulta de suma importancia estandarizar las condiciones de experimentación, ya que las variaciones de los resultados en los experimentos *in vitro* pueden deberse a las diferencias en el tipo, concentración de aditivo, sustratos y condiciones de cultivo utilizados (50). En este estudio, aún cuando se homogeneizaron los inóculos a una

concentración de 1×10^6 células/mL, la viabilidad de la levadura entre tratamientos varió y se tuvieron distintas concentraciones de inicio. Esto se debió principalmente a que las cepas mostraron diferente grado de agrupación en el primer tiempo de muestreo, porque cuando se realizó el conteo en el hemocitómetro de las células para hacer el inóculo, se notó que en la cepa levucell^{MR} las células estaban muy agrupadas. Esto pudo haber ocasionado que el recuento de colonias fuera más bajo que el número de células individuales, puesto que cada grupo dió lugar a una sola colonia(43).

La curva anormal de crecimiento de la levadura pudo haberse debido también a que el medio usado tuvo una baja concentración de carbohidratos de alta disponibilidad. La cinética normal de crecimiento de las levaduras se presenta cuando se tienen pocas células en un gran volumen de medio, con nutrientes y bajo condiciones cercanas al óptimo tales como temperatura, pH, oxigenación, agitación. En tal caso (y sólo así) se reconocen las fases inicial, exponencial, estacionaria y de decrecimiento (43, 52).

Debido a que Dawson menciona que la actividad de la levadura sólo es por 12 horas y con los resultados obtenidos se propone llevar a cabo otro estudio bajo las mismas condiciones, realizando los muestreos y determinando las UFC con un intervalo de tiempo más corto.

V CONCLUSIONES:

El estudio *in vitro* ha determinado que bajo condiciones anaerobias y en presencia de microorganismos ruminales en concentración similar a la esperada en rumen, la viabilidad de dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae* fue mínima después de 12 horas de incubación.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* mantiene una población estable tanto en condiciones aerobias como anaerobias pero en ausencia de microorganismos ruminales.

VI. LITERATURA CITADA:

1. Adams, D.C., Galyean, M.L., Kiesling, H.E., Wallace, J.D. and Finker, M.D.: Influence of viable yeast culture, sodium bicarbonate and monensin on liquid dilution rate, rumen fermentation and feedlot performance of growing steers and digestibility in lambs. *J. of Anim. Sci.* 53:780-789 (1981).
2. Alexopoulos, C. J. and Mims, C.W.: Introducción a la Micología. *Omega*. España, 1985.
3. Angeles, C.S.: Evaluación de dos cultivos de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) a dosis comercial sobre la población de protozoarios y el metabolismo ruminal en ovinos alimentados con una dieta a base de rastrojo de maíz. Tesis de Maestría. Fac. de Med. Vet. y Zoot., UNAM, México, D.F., 1996.
4. Avendaño, B.H.: Efecto del nivel de rastrojo de maíz y de un cultivo de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) en el valor nutritivo de dietas para borregos en crecimiento. Tesis de Maestría. Programa de Ganadería. Colegio de Posgraduados. Montecillo, Estado de México, 1995.
5. Avila, G.E., Shimada, A.S. y Llamas, L. G.: Aditivos y anabólicos en la producción pecuaria. *SECPA*. México 1990.
6. Ayala, O.J., Mendoza, M.G.D., Bárcena, G.R. y González, M.S.S.: Efecto de la adición de *Saccharomyces cerevisiae* y melaza-urea sobre la digestibilidad *in vivo* e *in situ* en dietas para ovinos basadas en paja de cártamo. *Vet Mex*, 25:221-226 (1994).
7. Barnett, J.A., Payne, R.W. and Yarrow, D.: Yeast Characteristics and Identification. 1a ed. *Cambridge University Press*, Inglaterra, 1983.
8. Bonifaz, A.: Micología Médica Básica, 1a ed. *Mendez Cervantes*, México, 1990.
9. Bradshaw, J.: Microbiología de Laboratorio, *Manual Moderno*, México, 1994.
10. Breeuwer, P., Drocourt, J.L., Bunschoten, N., Zwietering, M. H., Rombouts, F.M. and Abee, T.: Characterization of uptake and hydrolysis of fluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate by intracellular esterases in *Saccharomyces cerevisiae*, which result in accumulation of fluorescent product. *App. Env. Microbiol.* 61:1614-1619 (1996).
11. Breuseghem, R, Van: Guide Pratique de Micologie Medicale et Veterinaire. *Masson and Cie*, France 1986.
12. Campbell, I. and Duffus, J.H: Yeast: a practical approach. *Irl press*. England 1988.

13. Carro, M.D., Lebzien, P. y Rohr, K.: Effects of yeast culture on rumen fermentation, digestibility and duodenal flow on dairy cows fed a silage based diet. *Livestock Production Science*. 32: 219-229 (1992).
14. Carter, G.R. and Chengappa, M.M.: Bacteriología y Micología Veterinarias, 2a. ed. *Manual Moderno*, México, 1994.
15. Cartwright, C.P., Juroszek, J.R., Beavan, M.J., Ruby, F.M.S., De Morais, M.F.S. and Rose, H.A.: Ethanol dissipates the proton motive force across the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol*, 32: 369-377 (1986).
16. Cobos, M.A. and Yokoyama, M.T.: *Clostridium paraputrificum* var. *ruminantium*: Colonization and degradation of shrimp carapaces *in vitro* observed by scanning electron microscopy. In: Rumen Ecology Research Planning Proceedings of a Workshop held at ILRI, Edited by R. J. Wallace and A.L. Kassi. *ILRI*. p 151-161. Addis Ababa. Ethiopia 1995.
17. Cobos P.M.A.: Microbiología aplicada a la producción de rumiantes. Memorias del Curso Internacional Avanzado de Nutrición de Rumiantes. *Educación Continua CBS*. p 1-16. 23-25 de Octubre de 1996.
18. Codon, A.C., Gassent, J.M. and Benitez T.: Factors which affect the frequency of sporulation and tetrad formation in *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeasts. *App Env. Microbiol*, 61: 630-638 (1995).
19. Cook, A.H. : The Chemistry and Biology of Yeasts. *Academic Press Inc. USA* 1958.
20. Corona, G.L., Castrejón, P.F., Mendoza, M.G.D. y Cobos, P.M.: Evaluación de dos cultivos de levadura a dosis similar (UFC) sobre la fermentación ruminal y digestibilidad *in situ* del rastrojo de maíz en ovinos. Memorias del XIX Congreso Nacional de Buiatría. Veracruz, México, 1995.
21. Crosby, G.M.M.: Efecto de la dosis de un cultivo de levadura *Saccharomyces cerevisiae* en la fermentación y en la digestibilidad ruminal de la fibra en borregos. Tesis de Maestría. Programa de Ganadería. Colegio de Posgraduados. Montecillo, Estado de México, 1995.
22. Cruickshank, R., Duguid, J.P., Marmion, B.P. and Swain, R.H.A.: Centrifuges, colorimeters and bacterial counts. In: *Medical microbiology*. Volume two: The Practice of Medical Microbiology. 12 th ed. 301-310. *Churchill Livingstone, Longman Group Limited*, Hong Kong 1975.
23. Davis, B.D.: *Microbiology*. Edited by Harper and Row. Renato dulbeco. *Manual Moderno*, México 1980.
24. Dawson, K.A., Newman K.E. and Boling, J.A.: Effects of microbial supplements containing yeast and lactobacilli on roughage-fed ruminal microbial activities. *J. Anim. Sci.*, 88:3392-3398. (1990).
25. Deacon, J.W.: Introducción a la Micología Moderna. *Limusa*. México 1988.

26. Dengis, P.D., Nelissen, L.R. and Rouxhet, P.G.: Mechanisms of yeast flocculation: comparison of top- and bottom-fermenting strains. *Appl. Env. Microbiol.* 61: 718-728 (1995).
27. Ellis, D.H.: Clinical Mycology. *Pfizer*, Australia, 1994.
28. Erasmus, L.J., Botha, P.M. and Kistner, A.: Effect of yeast culture supplement on production, rumen fermentation, and duodenal nitrogen flow in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 75:3056-3065 (1992).
29. Erasmus, L.J.: La importancia de los perfiles duodenales de aminoácidos en vacas lecheras y los cambios significativos de estos perfiles al uso de Yea Sacc. *Biotechnology en la Industria de Alimentación Animal*, Vol III, *SETIC*, México 1991.
30. Firkins, J.L., Weiss, W.P., Eastridge, M.L. and Hull, B. L.: Effects of feeding fungal culture extract and animal vegetable fat on degradation of hemicellulose and on ruminal bacterial growth in heifers. *J. Dairy Sci.*, 73: 1812-1822 (1990).
31. Fluharty, F.L., Loerch, S.C. and Dehority, B.A.: Ruminal characteristics, microbial populations and digestive capabilities of newly weaned, stressed calves. *J. Anim. Sci.* 72: 2969-2979 (1994).
32. Frazier, W. C. y Westho, F. F.: Microbiología de los Alimentos. *Acribia S.A.* España 1988.
33. Frumholtz, P.P., Newbold, C.J. and Wallace, R.J.: Influence of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on the fermentation of a basal ration in the rumen simulation technique (Rusitec). *J. Agric. Sci.* 113:169-172 (1989).
34. Galloway, D.L., Goetsch, A.L., Sun, W., and Forester, L.A.: Effects of additions of sodium bicarbonate, salt, *Aspergillus oryzae* culture extract, niacin, lysine or phenylalanine to ground corn based supplements on feed intake and digestion by Holstein steers consuming bermudagrass (*Cynodon dactylon*) hay. *Anim. Feed. Sci. and Technology*. 32: 261-273 (1989).
35. Gedek B., Enders, C., Ahrens, F. and Roques, C.: The effect of *Saccharomyces cerevisiae* (BIOSAF Sc 47) on ruminal flora and rumen fermentation pattern in dairy cows. *Ann. Zootech.* 42: 175 (1993)
36. Gómez-Alarcón, R.A., Dudas, C. and Huber, J.T.: Influence of culture of *Aspergillus oryzae* on rumen and total tract digestibility of dietary components. *J. Dairy Sci.*, 73:703-710 (1990).
37. Grenet, E., Bernalier, A., Jamot, J. and Fonty, G.: Degradation of untreated and anhydrous ammonia-treated wheat straw by two strains of rumen fungi. *Ann. Zotech.* 42:180 (1993).
38. Harrison, G.A., Hemken, R.W., Dawson, K.A. Harmon, R.J. and Barker, K.B.: Influence of addition of yeast culture supplement to diets of lactating cows

- on ruminal fermentation and microbial populations. *J. Dairy. Sci.* 71:2967-2975 (1988)
39. Herrera, J. y Ulloa, M.: El Reino de los Hongos. *Micología Básica y Aplicada*. 1a ed. *Fondo de Cultura Económico*. México, 1990.
40. Hino, T. and Hamano, S.: Effects of readily fermentable carbohydrate on fiber digestion by rumen microbes in continuous culture. *Anim. Sci. Technol.* 11:1070-1078 (1993).
41. Jorgensen, A.P.C.: *Microbiología de las Fermentaciones Industriales*, 7a ed. *Acribia*, España, 1959.
42. Larone, H.D.: *Medically Important Fungi: A Guide to Identification*, 2a ed. *Elsevier*, USA, 1987.
43. Lewis, M.: Perspectivas en los conteos y sobrevivencia del cultivo de levadura en el alimento. *Biocnología en la industria de alimentación animal*. Vol III *SETIC*, México 1991.
44. Martin, S.A. and Nisbet, D.J.: Effects of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on fermentation of amino acids, bermudagrass and starch by mixed ruminal microorganisms *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, 68:2142-2149 (1990).
45. Martin, S.A. and Nisbet, D.J.: Symposium: Direct-fed microbials and rumen fermentation. *J. Dairy Sci.*, 75:1736-1744 (1992)
46. Martínez, A.G.: *Diseños Experimentales. Métodos y elementos de teoría*. *Trillas*. México 1988.
47. Mir, Z. and Mir, P.S.: Effect of the addition of live yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on growth and carcass quality of steers fed high-forage or high-grain diets and on feed digestibility and *in situ* degradability. *J. Anim. Sci.* 72:537-545 (1994).
48. Moloney A.P. and Drennan, M.J.: The influence of the basal diet on the effects of yeast culture on ruminal fermentation and digestibility in steers. *Animal Feed Science and Technology*. 50: 55-73 (1994).
49. Mutsvangwa, T., Edwards, I.E., Topps, J.H. and Paterson, G.F.M.: The effect of dietary inclusion of yeast culture (Yea Sacc) on patterns of rumen fermentation, food intake and growth of intensively fed bulls. *Anim. Prod.* 55:35-40 (1992).
50. Nisbet, D.J., and Martin, S.A.: Effect of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on lactate utilization by the ruminal bacterium *Selenomonas ruminantium*. *J. Anim. Sci.*, 69: 4628-4633 (1991).
51. Nolan, J.V., Leng, R. A., and Demeyer, D.I.: The Roles of Protozoa and Fungi in Ruminant Digestion. Proceedings of an international seminar held at the University of New England, Armidale, Australia. (Printed in Australia by

- University of New England Printery). *Penambul Books Armidale* 26-29 September 1988.
52. Norgaard, H.T. and Hahn-Hagerdal, B.: Xylitol formation and reduction equivalent generation during anaerobic xylose conversion with glucose as cosubstrate in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing the xylI gene. *App. Env. Microbiol.* 61: 2043-2045 (1995).
 53. Pérez, M.J.A., Vázquez, M.J.R., Rodríguez S.M.C., Miranda, M.R.E., Romo, G. A.L.y Nader, G.E.: *Procedimientos de Laboratorio para Bacteriología y Micología Veterinarias. FMVZ, UNAM, México* 1989.
 54. Piva, G., Belladonna, S., Fusconi, G., Sicbaldi, F.: Effects of yeast on dairy cow performance, ruminal fermentation, blood components and milk manufacturing properties, *J. Dairy Sci.* 76: 2717-2722 (1993).
 55. Plata, P.F.: Efecto de un probiótico *Saccharomyces cerevisiae* en la fermentación ruminal, digestibilidad *in situ* y el consumo en bovinos alimentados con tres niveles de paja de avena. Tesis de Maestría. Programa de Ganadería. Colegio de Posgraduados. Montecillo, Estado de México, 1995
 56. Quigley, J.D., Wallis, L.B., Dowlen, H.H. and Heitmann, R. N.: Sodium bicarbonate and yeast culture effects on ruminal fermentation, growth and intake in dairy calves. *J. Dairy Sci.* 75:3531-3538 (1992).
 57. Rodríguez, M., Herrera, R., González, S. y Miranda, R.: Efecto de la adición del probiótico *Saccharomyces cerevisiae* a la dieta de vacas Holstein en producción durante el primer tercio de lactancia. Biotecnología en la Industria de Alimentación Animal, Vol II, *SETIC, México* 1991.
 58. Rose, A. H., and Harrison, J.S.: *The Yeasts. Physiology and Biochemistry of yeasts. Academic Press, London, 1972.*
 59. Rouzbehan, Y., Galbraith, H., Rooke, J.A. and Perrott, J.C.: The effects of dietary inclusion of a yeast culture on growth and ruminal metabolism of lambs given diets containing unground pelleted molassed dried sugar-beet pulp and barley in various proportions. *Anim. Prod.* 59:147-150 (1994).
 60. SAS. SAS User's Guide for a personal computers. Ver. 6. *SAS Inst. Inc., Cary, N.C.* 1985.
 61. Scott, A.M. and Nisbet, D.J.: Symposium: Direct-fed microbials and rumen fermentation. *J. Dairy Sci.*, 75:1736-1744 (1992).
 62. Seymour, W.M., Nocek, J.E. and Siciliano-Jones: Effects of a colostrum substitute and of dietary brewer's yeast on the health and performance of dairy calves. *J. Dairy Sci.* 78:412-420 (1995).
 63. Solís, V. L. Tesis de licenciatura. FESC. UNAM, 1991
 64. Steel, R.G.D. and Torrie, J.H.: *Principles and Procedures of Statistics: 2nd.ed., 4th. pr. McGraw Hill International. Book Co, Singapore, 1984*

65. Webster, J.: Introduction to Fungi. 2nd edition. *Cambridge University Press*, Great Britain 1980.
66. Williams, A.G. and Coleman, G.S.: The Rumen Protozoa. 300 *Springer Verlag*, New York, USA, 1991
67. Williams, P.E.V. and Newbold, C.J.: Rumen probiosis: The effects of novel microorganisms on rumen fermentation and ruminant productivity. En: *Recent Advances in Animal Nutrition. W. Haresign and D.J.A. Cole (eds)*, 211-227 *Butterworths*, London 1990.
68. Williams, P.E.V., Tait, C.A.G., Innes, G.M. and Newbold, C.J.: Effects of the inclusion of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae* plus growth medium) in the diet of dairy cows on milk yield and forage degradation and fermentation patterns in the rumen of steers. *J. Anim. Sci.*, 69: 3016-3026 (1991).