



**Facultad de Veterinaria  
Universidad Zaragoza**



# Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria



# ÍNDICE

Índice .....	I
Abreviaturas .....	II
Resumen-summary .....	III
Introducción .....	1
Uso de probióticos .....	3
Efectos de los probióticos .....	5
Justificación y objetivos.....	7
Metodología.....	8
Resultados y discusión .....	12
Resultados .....	12
ph.....	12
Producción de gas .....	13
Desaparición de materia seca .....	18
Discusión .....	19
Producción de gas .....	19
Conclusiones-conclusions .....	22
Valoración personal .....	24
Bibliografía .....	25

## **Abreviaturas**

AGV: Ácidos Grasos Volátiles

DMS: Desaparición de Materia Seca

EE: Extracto Etéreo

FAD: Fibra Ácido Detergente

FND: Fibra Neutro Detergente

LAD: Lignina Ácido Detergente

MO: Materia Orgánica

MS: Materia Seca

PB: Proteína Bruta

PG: Producción de Gas

UFC: Unidades Formadoras de Colonia

# RESUMEN-SUMMARY

Una de las alternativas a los antibióticos utilizados como mejorantes de la producción animal son los probióticos. Entre ellos, las levaduras se han estudiado ampliamente en rumiantes, dando resultados positivos en numerosas ocasiones, a pesar de que el ambiente ruminal no es el adecuado para garantizar el crecimiento y la actividad óptimos de estos microorganismos. El objetivo del presente estudio fue comparar, en condiciones *in vitro*, el nivel y la evolución de la fermentación ruminal en ausencia de levadura y en presencia de la misma, activada previamente mediante cultivo o administrada como polvo seco, con el fin de confirmar esos efectos positivos y, en su caso, cuantificarlos. Además, se utilizaron dos sustratos (cebada y pulpa de remolacha) con la intención de establecer diferencias entre alimentos concentrados y fibrosos.

Con este propósito se realizaron dos aproximaciones que únicamente difirieron en el cálculo de los valores de fermentación, en función del blanco considerado para corregir la fermentación total resultante de las mediciones. Se midieron los valores de producción de gas (PG) y pH de manera periódica durante veinticuatro horas, y al final de las incubaciones se desecaron las muestras para obtener los valores de desaparición de materia seca (DMS), como otro parámetro de fermentación.

Los resultados obtenidos confirmaron el efecto positivo de la inclusión de levaduras en las dietas de rumiantes. La fermentación, estimada en términos de PG, se vio aumentada cuando se añadió levadura, en mayor medida cuando se añadió activada que cuando se incorporó seca, e incluso añadiendo únicamente el activador de la levadura, debido a su aprovechamiento como nutriente por los microorganismos ruminantes. También se pudo confirmar que existen diferencias en cuanto a la mejora que se produce cuando la levadura actúa sobre un alimento fibroso respecto a cuando lo hace sobre uno rico en carbohidratos de reserva.

***In vitro study of the effect of activated yeast as a probiotic on ruminants intensive feeding***

Probiotics are a widely used alternative to antibiotics to enhance animal production. Among them, yeasts have been frequently studied in ruminants, often giving positive results, despite rumen environmental conditions are not suitable to ensure an optimum growth and activity of these microorganisms. The objective of the present *in vitro* study was to determine the level and evolution of the fermentation in the rumen in both the absence and the presence of yeast, either activated by previous culture or used as dry powder, in order to find these positive effects and, where appropriate, quantify them. In addition, two different substrates (barley and beet pulp) were used with the aim to establish differences between concentrated and fibrous diets.

For this purpose, two approaches were carried out, only differing in the calculation of the fermentation values, in function of the blank used to correct the total fermentation resulting from the measurements. The gas production and the pH values were measured periodically during twenty-four hours, and at the end of the incubations the samples were dried to obtain the values of dry matter disappearance, as a parameter of fermentation.

The results obtained confirmed the positive effect of the inclusion of yeasts in ruminant diets. The fermentation, estimated in terms of gas production, was increased when yeast were added, at a higher extent when included activated than in dry form, and also when only activating agent, because of its utilization by rumen microorganisms. It can also be stated that there are differences in the improvement of production when the yeast acts on a fibrous feed compared to one high in reserve carbohydrates.

# INTRODUCCIÓN

El aparato digestivo de los rumiantes se caracteriza por encontrarse dividido en cuatro cámaras, estando cada una de ellas especializada en una función determinada. Los preestómagos permiten la acción de microorganismos sobre el alimento, previa a la actividad enzimática que se da en el estómago glandular (abomaso). Entre los compartimentos con función mecánica, toma especial relevancia el rumen, pues es el de mayor tamaño y actividad, y donde el alimento es almacenado durante más tiempo.

El tracto digestivo en este tipo de animales presenta grandes diferencias anatómicas y fisiológicas con respecto a los animales no poligástricos, las cuales permiten un mayor aprovechamiento del alimento fibroso. Por un lado, aunque dependiendo del grado de lignificación del material vegetal, permite la degradación de carbohidratos estructurales que no pueden ser utilizados por otros animales, como es el caso de los monogástricos omnívoros, o que lo hacen en un grado mucho menor, como ocurre con otras especies de herbívoros, dada la asociación de los rumiantes con una población microbiana simbiótica compuesta por un elevado número de especies debacterias, arqueas metanogénicas, hongos anaerobios y protozoos. Adicionalmente, dicha población microbiana responsable de las tareas de digestión supone un aporte de aminoácidos de alta calidad y de energía para el animal al alcanzar tramos posteriores del tracto digestivo.

La población ruminal se ve modificada en respuesta a las proporciones de cada una de las especies microbianas que la componen, ya que existen relaciones de competición e interacciones sinérgicas y antagónicas entre los diferentes microorganismos, y también en función de la composición de la dieta. De esta manera, desequilibrios entre los porcentajes de alimentos de volumen y pienso concentrado pueden conllevar a modificaciones en la microbiota y como consecuencia en el metabolismo general y en la respuesta inmunitaria del animal. Asimismo, teniendo en cuenta que se trata de animales con una considerable necesidad de ingestión de forraje, una dieta con un excesivo contenido en carbohidratos de reserva, altamente fermentables, da lugar a trastornos en la ingestión voluntaria, laminitis, timpanismo (Enemark, 2008; Chaucheyras-Durand et al., 2012) y acidosis ruminal (Crichlow and Chaplin, 1985; Nocek, 1997; Sauvant et al., 1999), la cual es notablemente frecuente, pudiendo llegar a afectar al 40 % del sector bovino lechero.

Entre todos los microorganismos que actúan en la degradación del alimento, en este tipo de animales las bacterias encargadas de degradar la fibra son especialmente importantes. Las reacciones de hidrólisis que llevan a cabo las bacterias celulolíticas producen CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, calor y ácidos grasos volátiles (AGV) como productos finales. Estos últimos suponen la principal fuente de energía metabolizable para el animal, además de servir a las bacterias del rumen como fuente de fosfolípidos en la síntesis de sus membranas celulares (Van Lier y Regueiro, 2008). Los ácidos acético, propiónico y butírico son los principales AGV que se derivan de la fermentación ruminal, en proporciones que varían según el tipo de alimento degradado y la relación entre la cantidad de AGV producida y la absorbida a través de la pared ruminal. El ácido acético es el que se produce en mayor cantidad, siendo esta mayor conforme aumenta la proporción de forraje consumido. El propionato se ve incrementado cuando la dieta contiene un alto porcentaje de concentrado, aunque nunca llega a superar al acetato, y es el precursor de la lactosa de la leche tras su transformación hepática en glucosa (Van Lier, 2008). La cuantificación de AGV es por tanto un indicador de la actividad de fermentación que se está dando en el rumen.

En el interior del rumen la temperatura oscila entre 38 y 40 °C, y el pH se encuentra dentro del rango entre 5,5 y 6,9. Junto con los AGV, la fermentación del piruvato origina también ácido láctico, cuyo principal sintetizador es *Streptococcus bovis*. Mediante la acción de todas estas moléculas, el pH ruminal desciende, siendo el ácido láctico el mayor responsable de la acidificación del medio. Los microorganismos productores de lactato aumentan en número y los consumidores se ven reducidos, por lo que se produce su acumulación en el rumen y una reducción en la absorción.

Adicionalmente, la rápida fermentación que sufren los hidratos de carbono de reserva provoca una reducción posprandial en el pH (Nocek, 1997) debido al incremento en la concentración de los AGV, lo que resulta en el descenso del pH en el rumen. Estas condiciones inhiben la acción de los organismos encargados de fermentar los polisacáridos fibrosos, por lo que la degradación de los carbohidratos estructurales se ve también disminuida (McDonald et al., 2011). Si esto se prolonga en el tiempo aparecen las patologías anteriormente mencionadas, como la acidosis, que se da cuando los valores de pH descienden por debajo de 6,25 (Sauvant et al., 1999). Además, según Fulton et al. (1979) y Owens et al. (1998), niveles tan bajos de pH inhiben la admisión del alimento, y detienen la digestión de la pared vegetal.

Los niveles bajos de pH favorecen a las bacterias amilolíticas y perjudican a las fibrolíticas, pues estas requieren rangos de pH más altos que las primeras, de alrededor de 6,5-

7,0. No obstante, Martin et al. (2001) concluyen que la suplementación con cebada en un 40 % del total de la dieta modifica la actividad de las bacterias encargadas de la degradación de la fibra sin variar la densidad de su población. En cualquier caso, la acidosis crónica promueve la detención de la digestión de la pared celular del alimento.

## Uso de probióticos

Con el fin de prevenir patologías e incrementar los rendimientos productivos de los animales se han utilizado diversos compuestos antimicrobianos, en tratamientos prolongados y/o a dosis subterapéuticas, para reducir así el índice de transformación y aumentar la productividad. Esta práctica, que se ha llevado a cabo durante varias décadas, ha dado lugar a la aparición de cepas bacterianas resistentes que se han mantenido en el tiempo tras haberse adaptado genéticamente, lo cual supone un grave problema presente y futuro al limitar la eficacia y el espectro de acción de los antibióticos, tanto en la población animal como en la humana. Además, los tiempos de espera tras la supresión del tratamiento implican una reducción de la rentabilidad y, en caso de no ser respetados, pueden manifestarse problemas de residuos en los alimentos de origen animal.

Por tanto, para reducir la incidencia y gravedad de los efectos negativos del uso de antibacterianos como quimioprofilácticos sobre la salud animal, y en respuesta a la prohibición de su uso en la Comunidad Europea y a la cada vez mayor preocupación del consumidor por el bienestar animal, se ha estudiado la efectividad de otras sustancias alternativas, como son los probióticos, los prebióticos, las enzimas o los ácidos orgánicos. El suministro a los animales de estas sustancias en forma de aditivos zootécnicos no promueve la aparición de residuos (Yirga, 2015) ni de resistencias, aunque tienen un efecto más variable. Las investigaciones tienen además un segundo objetivo: reducir los efectos perjudiciales para el medio ambiente que se derivan de la digestión de los rumiantes y de la producción animal en general, pues se ha demostrado que estos toman un papel notable en el total de emisiones de gases de efecto invernadero que se generan en el planeta (FAO, 2013).

Los probióticos son administrados junto con la dieta con el principal objetivo de incrementar la utilización de los nutrientes que la componen, además de mejorar el estado sanitario del animal. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), un probiótico es un “organismo vivo que, cuando es administrado en cantidad adecuada, es beneficioso para la salud del

hospedador". El objetivo de la inclusión de probióticos con el alimento es favorecer el crecimiento y la proliferación de unas determinadas bacterias, a la vez que reducir la densidad de población de aquellas menos deseables, para conseguir un equilibrio favorable de la flora digestiva. Se trata además de microorganismos que no son hidrolizados ni absorbidos en el intestino, estables genéticamente y con capacidad de sintetizar sustancias antimicrobianas (Kaur et al., 2002; Parvez et al., 2006). Otra consecuencia añadida de su inclusión en la dieta es que su presencia en el tracto digestivo conlleva a que existan competencias con agentes patógenos por los nutrientes y las zonas de unión en la pared intestinal (exclusión competitiva). Los probióticos también producen metabolitos que estimulan la respuesta inunitaria (Sherman et al., 2009). Además, la fermentación láctica propia de la actividad celular de bacterias del género *Lactobacillus* spp. promueve el descenso del pH hasta rangos no tolerables por determinadas bacterias patógenas. De este modo, la respuesta inmunitaria del organismo hospedador se ve auxiliada y estimulada y puede entonces ser más eficaz.

En animales monogástricos, el interés de la administración de probióticos se basa fundamentalmente en su acción como alimentos funcionales, reforzando el estado de salud del tracto digestivo y potenciando la acción del sistema inmunitario. Para ello, se utilizan mayoritariamente bacterias de géneros presentes de forma habitual en los segmentos anteriores del intestino, como son *Lactobacillus* spp. y *Bifidobacterium* spp. Otro ejemplo de probióticos son las levaduras, que han sido también utilizadas y estudiadas como aditivos funcionales, incluso en mayor grado, en rumiantes. En estos animales se persigue principalmente la mejora de la actividad fermentativa ruminal y la modificación de la flora digestiva en sentido beneficioso para el animal. Gran parte de los estudios realizados en este tipo de animales se han hecho en base a diferentes tipos de levaduras, fundamentalmente cepas de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, un hongo anaerobio facultativo utilizado comúnmente en la fabricación de pan, vino y cerveza, pues realiza mayoritariamente un metabolismo fermentativo y se adapta a condiciones de anaerobiosis. Su temperatura óptima oscila entre 30 y 35 °C, y el rango de pH al cual se consigue una fermentación relevante está entre 4,4 y 5,6 (Walsh y Martin, 1977).

## Efectos de los probióticos

Las consecuencias beneficiosas derivadas de la adición de levaduras en dietas para rumiantes van desde la modificación de la fermentación ruminal, la concentración de AGV y el pH ruminal, hasta el aumento en la producción lechera (Abd El-Ghani, 2004). En estudios llevados a cabo utilizando la levadura *S. cerevisiae* se han dado en la mayoría de los casos resultados positivos en cuanto a ganancia de peso (Spedding, 1991) y producción láctea (Quinonez et al., 1988; Fiems, 1994; Adams et al., 1995), además de en la eficiencia de la síntesis de proteína microbiana (Carro et al., 1992).

En vacas lactantes, la adición de *S. cerevisiae* ha demostrado un incremento del 3,9 % en la cantidad de leche producida (Fiems, 1994). Este efecto depende también de la composición de la dieta de los animales, pues no ha dado el mismo resultado cuando el concentrado se formula en base a maíz (Quinonez et al., 1988; Adams et al., 1995). También se ha visto una modificación cualitativa en la leche producida, pues en trabajos realizados con ganado caprino se observó que el porcentaje de grasa se ve aumentado (Abd El-Ghani, 2004).

En un estudio realizado por Wallace y Newbold (1992) se concluyó que *Saccharomyces cerevisiae* favorece el incremento en el número de bacterias celulolíticas. Los animales suplementados con esta levadura contienen una mayor población bacteriana viable en el rumen, junto con el incremento del número total de bacterias encargadas de degradar la pared de las células vegetales. Por tanto, la actividad ruminal se ve aumentada, a la vez que se incrementa el total de AGV generados.

Por otra parte, aunque el rumen es un ambiente fundamentalmente anaerobio, contiene cierta concentración de oxígeno procedente de la ingestión de alimento y agua por parte del animal. Este oxígeno es consumido por la levadura, disminuyendo el potencial de oxidación-reducción y facilitándose de esta forma el crecimiento de las bacterias anaerobias estrictas encargadas de degradar la pared de las células vegetales. Putnam y Schwab (1994) y Moya et al. (2007) sostienen además que, al favorecerse la actividad de estos microorganismos, se aumenta la concentración de nitrógeno bacteriano y la síntesis microbiana, reduciéndose la concentración de amoníaco en rumen.

Otros hallazgos derivados de su utilización son el aumento en la ingestión voluntaria de los animales y la elevación del pH ruminal, la cual se supone que se debe a la competición con las bacterias productoras de ácido láctico. En algunos casos se ha visto modificada la digestibilidad total de la dieta (Jouany et al., 2008; Agazzi et al., 2011), mientras que en otros

análisis no se han descrito cambios. Los efectos son más destacados en raciones con alto contenido en concentrado. También se ha visto un mayor efecto cuando la inclusión se realiza en dietas destinadas a animales en período inicial de la lactación (Harris y Lobo, 1988; Newbold, 1996).

Aunque en diversos estudios se ha confirmado su impacto positivo, también se han dado respuestas variables y no significativas en cuanto a la producción (Newbold et al., 1995; Ali-Haimoud-Lekhal et al., 1999), pues no es fácil demostrar su efecto en condiciones prácticas. Otros muchos estudios han concluido que la suplementación de la dieta con levaduras no tiene efecto significativo en cuanto a aumento de la producción lechera, del pH ruminal y de la concentración de AGV, ni al descenso en la producción de ácido láctico. Esto es debido a numerosos factores, pues, por ejemplo, la medida del pH ruminal resulta en valores diferentes según el método que se utilice. Con la sonda oro-ruminal se estimula la producción de saliva, que modifica en cierto grado los valores obtenidos (Enemark et al., 2008), mientras que la ruminocentesis proporciona resultados más variables respecto a cuandose realiza un ensayo *in sacco* en animales canulados. Además, los resultados que aporta la levadura dependen de la cepa utilizada, la naturaleza de la dieta y el estado fisiológico del hospedador. La forma en que se encuentre la levadura también es importante, pues se ha confirmado que los efectos son realmente relevantes y positivos cuando se ha cultivado previamente y está activada (Bach et al., 2007). Asimismo, hay que tener en cuenta que en muchas ocasiones se ha trabajado con la levadura liofilizada, seca o incluso inactivada.

En este ensayo, al igual que en otros cuyo procedimiento fue similar, las levaduras son previamente cultivadas junto con el activador, compuesto por factores de crecimiento como aminoácidos, péptidos, vitaminas y ácidos orgánicos (Chaucheyras-Durand et al., 2012), de forma que quedan activadas, y se encuentran en un estado metabólico favorable para ejercer su función desde el momento de entrada en el rumen. En este caso, la metodología empleada difiere con otros trabajos al plantearse en experimentos de incubación *in vitro*.

Adicionalmente al trabajo experimental, se llevó a cabo una revisión bibliográfica, fundamentalmente de artículos científicos relacionados con los mecanismos de acción de los probióticos y sus efectos en los animales de abasto. También se consultaron libros esenciales de nutrición animal (McDonald et al., 2011; Van Soest, 1994) con el fin de plasmar en el presente trabajo los aspectos más importantes de la fisiología digestiva de los rumiantes y entender mejor los efectos de los probióticos en estos animales.

## JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Diversos estudios se han llevado a cabo con el objetivo de valorar los efectos beneficiosos de la inclusión de levaduras con acción probiótica para la producción y la salud de los rumiantes. En muchos de estos análisis se ha trabajado con levaduras inactivadas o muertas, mientras que en algunos pocos se ha trabajado sobre levaduras que han sido cultivadas previamente para activarlas. La metodología en muchos de estos estudios ha contado con técnicas *in vivo*, las cuales, aunque son más reales, no permiten una cuantificación específica de los parámetros de fermentación ruminal, que pueden ser abordados con mayor control en condiciones de laboratorio.

El objetivo de este trabajo fue valorar, en condiciones *in vitro*, las diferencias en el efecto sobre la población microbiana ruminal al añadir la levadura previamente activada por incubación en condiciones óptimas de crecimiento, con respecto a cuando se incluye en forma seca, determinando hasta qué punto los resultados dependen del tipo de carbohidrato fermentado, empleándose cebada como modelo de alimento rico en almidón, y pulpa de remolacha como fuente de fibra altamente fermentable.

Los resultados obtenidos pueden ser de interés práctico para confirmar la mejora en las condiciones de fermentación y el estado sanitario del animal frente a la no adición de probióticos en la dieta, sobre todo en ciertos momentos de la vida productiva en que se producen cambios bruscos en la alimentación o situaciones de estrés: destete, cambio en el tipo de alimentación, suplementación con altas concentraciones de pienso concentrado, altas temperaturas o transporte. Entonces, la microbiota ruminal se modifica en respuesta a los cambios en las condiciones ambientales del tracto digestivo. Según Chaucheyras-Durand (2012), el uso de las levaduras vivas es particularmente relevante en estos momentos.

# METODOLOGÍA

Con el fin encontrar las diferencias en cuanto a fermentación entre dos tipos de alimento para rumiantes (forraje y concentrado) se eligió la pulpa de remolacha y la cebada como sustratos representantes de cada tipo (Tabla 1), molidos ambos a un tamaño de 1 mm.

**Tabla 1.** Composición química de los sustratos (g/kgMS).

Sustrato	% MS	% cenizas	% MO	% PB	% EE	% FND <sub>MO</sub>	% FAD <sub>MO</sub>	% LAD <sub>MO</sub>	Almidón
Cebada <b>GUSTAV</b>	90,04	2,71	97,83	10,52	2,44	17,07	5,32	1,44	672,1
Pulpa de remolacha	91,02	4,74	95,26	10,69	0,48	43,53	25,96	6,83	ND

ND: No Determinado; MS: Materia Seca; MO: Matria Orgánica; PB: Proteína Bruta; EE: Extracto Etéreo; FND: Fibra Neutro Detergente; FAD: Fibra Ácido Detergente; LAD: Lignina Ácido Detergente.

Inicialmente se elaboró la solución de incubación, a la que sería añadido el sustrato junto con líquido ruminal o agua destilada, y la levadura (previamente activada o en forma seca) o el activador, según el caso. Las cantidades de cada uno de los ingredientes utilizados para obtenerla fueron establecidas siguiendo el protocolo de Theodorou et al. (1994).

Un litro de solución de incubación se compone de 238 ml de solución tampón, 238 ml de solución de macrominerales, 50 ml de agente reductor y 474 ml de agua destilada. La solución tampón, formulada para permitir el mantenimiento del pH en un valor de 6,0, se compone de 5,7 g de bicarbonato de sodio NaHCO<sub>3</sub> y 0,6 g de bicarbonato de amonio ((NH<sub>4</sub>)HCO<sub>3</sub>) por litro de agua destilada. La solución de macrominerales está compuesta por 0,6 g de sulfato de magnesio (MgSO<sub>4</sub>), 6,2 g de dihidrogenofosfato de potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) y 5,7 g de fosfato disódico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) diluidos en un litro de agua destilada.

El agente reductor se elaboró mezclando 47,5 ml de agua destilada, 2 ml de hidróxido de sodio y 313 mg de cisteína-HCl, por litro de solución de incubación.

La levadura a estudio (*S. cerevisiae*, MUCL39885, E1710; 9 × 10<sup>9</sup> unidades formadoras de colonias, UFC/g) fue provista por AMBIOTEC Balance (Toledo, España). Para su activación, fue incubada a 37 °C durante 24 horas en condiciones aerobias, junto con un sustrato enriquecido con factores de crecimiento específicos (activador), en proporción 15:85. El ensayo se realizó en tres tandas de incubación, con una duración de 24 horas cada una.

Cada tanda incluyó 12 tratamientos (Tabla 2), con tres repeticiones (botellas) por cada uno, variando en la presencia de inóculo, de levadura y de activador, de manera que la composición de cada uno de estos fue la siguiente:

Tratamiento	Sustrato	Líquido ruminal	Levadura	Activador
1. (C-LR)	Cebada	X		
2. (PR-LR)	Pulpa de remolacha	X		
3. (C-LR-LevA)	Cebada	X	X	X
4. (PR-LR-LevA)	Pulpa de remolacha	X	X	X
5. (C-LR-LevS)	Cebada	X	X	
6. (PR-LR-LevS)	Pulpa de remolacha	X	X	
7. (C-LR-A)	Cebada	X		X
8. (PR-LR-A)	Pulpa de remolacha	X		X
9. (C-LevA)	Cebada		X	X
10. (PR-LevA)	Pulpa de remolacha		X	X
11. (LR-LevA)		X	X	X
12. (LR)		X		

**Tabla 2.** Composición de los diferentes tratamientos. Aquellos que carecen de líquido ruminal contienen agua destilada en su lugar. C: Cebada; PR: Pulpa de Remolacha; LR: Líquido Ruminal; LevA: Levadura Activada; LevS: Levadura Seca; A: Activador.

Por tanto, los tratamientos 1 y 2 estaban compuestos únicamente por el sustrato y el líquido ruminal, mientras que los tratamientos 3 y 4 contenían además levadura previamente activada. En el caso de los tratamientos 5 y 6, también con sustrato e inóculo ruminal, la levadura no se encontraba activada con anterioridad. Los tratamientos 7 y 8 presentaban líquido ruminal y activador, en este caso en ausencia de levadura. El resto de tratamientos se llevaron a cabo con el objetivo de que sirvieran como corrección de los demás.

A las botellas de los tratamientos 1, 3, 5, 7 y 9 se les incorporaron 500 mg de cebada, incluida en una bolsita de nylon sellada, con un tamaño de poro de 45 µm, permitiéndose el contacto con la población microbiana pero impidiendo la salida de sustrato. La misma cantidad de pulpa de remolacha contenida en bolsitas se incorporó en las botellas de los tratamientos 2, 4, 6, 8, y 10.

En las bolsas de los tratamientos 5 y 6 (sustrato-LR-LevS) se añadieron 1,4 mg de levadura por gramo de sustrato previamente al sellado e introducción en las botellas. La misma cantidad de activador, en ausencia de levadura, fue añadida en las bolsas de los tratamientos 7 y 8 (sustrato-LR-A) antes de ser introducidas en las botellas. Tras el sellado de cada bolsita, estas fueron pesadas para determinar la desaparición de materia seca (DMS).

Para la extracción del líquido ruminal se emplearon cuatro ovejas adultas canuladas en el rumen, que se acostumbraron dos semanas antes a una dieta de 250 g de heno de alfalfa, 250 g de paja y 400 g de concentrado (60 % de cebada, 20 % de maíz y 20 % de soja), con el fin de que la población microbiana tuviera suficiente tiempo para habituarse a este tipo de alimento. Con la ayuda de un sistema simple de bomba extractora se obtuvo contenido ruminal, de ovejas diferentes para cada tanda, que fue filtrado a través de una doble capa de gasa para obtener la fracción líquida. Una vez en el laboratorio se mantuvo a 38-39 °C y se determinó el valor de pH.

La solución de incubación se vehiculó en alícuotas de 72 ml en cada una de las 36 botellas. Luego, se añadieron 8 ml de inóculo ruminal en las botellas de los tratamientos 1 a 8 y en las de los dos últimos tratamientos. En su lugar, en las botellas de los tratamientos 9 y 10 (sustrato-LevA) se adicionaron 8 ml de agua destilada. En las botellas de los tratamientos 3, 4, 9, 10 y 11, además, se añadieron 0,7 mg de levadura activada previamente en las condiciones descritas, a diferencia de los tratamientos 5 y 6, en los que se había añadido la levadura en forma seca.

Una vez preparadas, las botellas fueron tapadas, selladas y colocadas en un baño María a 39 °C. Con un manómetro portátil se determinó la presión interna en cada una de las botellas a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18 y 24 horas tras el inicio de cada tanda. A las 8 horas se escogió una de las tres repeticiones de los ocho primeros tratamientos, que se abrió, se midió el pH del medio de incubación y se trajeron las bolsitas para determinarla DMS. Las mediciones de PG continuaron en las botellas restantes, y tras la última medición se midió el pH de todas ellas antes de desecharlas.

La producción de gas (PG) se interpretó como indicador de la actividad fermentativa microbiana en cada tratamiento. Con los valores obtenidos como medida de presión, se calculó el volumen de gas mediante la siguiente fórmula:

$$V = \frac{P - 10,384}{24,030}$$

$$n = 103$$

$$R^2 = 0,996$$

El volumen de gas acumulado se expresó en base a la materia orgánica (MO) incubada de cada muestra.

Las bolsitas extraídas de cada botella se introdujeron en una estufa de ventilación forzada a 60 °C durante 48 horas, para obtener los valores de la DMS.

Los datos obtenidos de PG, pH y DMS se analizaron estadísticamente siguiendo un modelo en split-plot, considerando el efecto sustrato como factor principal y el efecto de la suplementación con aditivo como subfactor. Las medias de tratamiento se compararon por la mínima diferencia significativa. Se consideró una significación cuando  $P<0,05$  y una tendencia cuando  $P<0,10$ .

En el estudio estadístico principal, la media de los valores obtenidos del tratamiento 12 (tratamiento de inóculo ruminal sin sustrato, levadura ni activador) se empleó como tratamiento blanco para valorar el efecto de la levadura activada eliminando el efecto que puedan ejercer los microorganismos contenidos en el líquido ruminal extraído (Rymer et al., 2005) y corregirlo sobre todos los tratamientos del ensayo que contenían líquido ruminal. Después, en otro enfoque diferente de presentación de los resultados, se empleó el tratamiento 11 (LR-LevA en ausencia de sustrato) como blanco para estimar más correctamente la PG obtenida a partir de ambos sustratos en los tratamientos 3 y 4 (sustrato-LR-LevA).

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## Resultados

### pH

	<b>h8</b>	<b>h24</b>
<b>C-LR</b>	6,26	5,98
<b>C-LR-LevA</b>	6,23	5,98
<b>C-LR-LevS</b>	6,25	6,03
<b>C-LR-A</b>	6,26	5,99
<b>PR-LR</b>	6,30	5,96
<b>PR-LR-LevA</b>	6,31	5,93
<b>PR-LR-LevS</b>	6,30	5,98
<b>PR-LR-A</b>	6,34	5,94
<b>SEM</b>	0,73	0,02
<b>P sustrato</b>	0,475	0,223
<b>P aditivo</b>	0,432	0,336
<b>P sustrato*aditivo</b>	0,417	0,946

**Tabla 3.** Valores de pH medidos a las 8 y a las 24 horas.

El pH inicial medido en la mezcla de solución de incubación con inóculo de líquido ruminal fue de 6,39 en la primera tanda del ensayo, 6,58 en la segunda y 6,70 en la tercera. Con el transcurso del período de incubación, este parámetro fue disminuyendo hasta quedar en valores cercanos a 6,0 al final de cada tanda, aunque no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos.

## Producción de gas

	<b>h2</b>	<b>h4</b>	<b>h6</b>	<b>h8</b>	<b>h10</b>	<b>h12</b>	<b>h18</b>	<b>24h</b>
<b>C-LR</b>	8,2	18,7	29,8	41,1	52,2	62,7	82,7	103,5
<b>C-LR-LevA</b>	11,0	23,8	36,0	48,3	60	72,8	94,8	114,5
<b>C-LR-LevS</b>	10,7	22,7	34,9	47,9	59,7	71,7	91,5	111,3
<b>C-LR-A</b>	9,1	19,7	30,7	43,4	55,8	68,8	89,1	110,5
<b>PR-LR</b>	5,4	11,1	15,8	21,7	29,8	39,7	64,2	86,8
<b>PR-LR-LevA</b>	9,9	19,8	28,2	37,5	47,6	60,4	84,5	107,7
<b>PR-LR-LevS</b>	6,1	12,2	17,6	25,0	33,8	46,0	71,8	95,6
<b>PR-LR-A</b>	8,8	16,2	23,5	32,9	41,9	53,5	78,2	101,9
<b>SEM</b>	1,26	2,00	2,28	2,74	2,79	3,03	3,53	3,72
<b>P sustrato</b>	0,184	0,049	0,010	0,004	0,003	0,002	0,003	0,021
<b>P aditivo</b>	0,08	0,034	0,012	0,010	0,005	0,002	0,005	0,008
<b>P sustrato*aditivo</b>	0,368	0,301	0,131	0,105	0,089	0,150	0,434	0,474

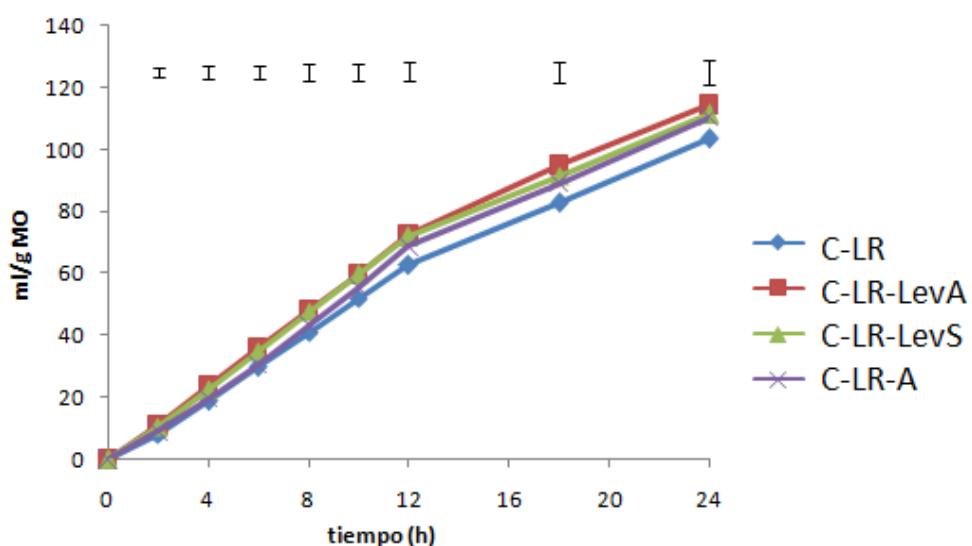
**Tabla 4.** Valores medios de producción de gas (ml/g MO), error y probabilidad a diferentes horas y con distintos tratamientos, restando la contribución de la producción de gas debida al líquido de rumen (tratamiento 12) como blanco.

No se observaron diferencias entre sustratos hasta la hora 4 ( $P<0,05$ ). A partir de entonces, los valores para cebada fueron significativamente superiores a los de pulpa de remolacha (Tabla 4). Teniendo en cuenta que el mayor rango de respuesta se debió a las diferencias entre sustratos, para clarificar la interpretación de resultados los valores medios de cada tratamiento en función del sustrato incubado se presentan además en las Figuras 1 y 2.

En cuanto al efecto del aditivo (adicción o no de levadura), la PG con los tratamientos en los que se añadió levadura previamente activada fue significativamente mayor que en los que no contaban con aditivo. Estas diferencias se observaron a partir de las 4 h, y fueron incrementándose a lo largo del tiempo de incubación. A partir de este momento hubo diferencias en los valores obtenidos con LevA respecto a los de la LevS, siendo los mayores en el primer caso, pero estas diferencias desaparecieron a las 24 h. A las 12 h ( $P=0,002$ ), la PG en los tratamientos con LevS superó a la obtenida en los carentes de aditivo, pero no a los que contaban con activador. Entre las 12 y las 18 h se detectaron además diferencias entre las botellas sin aditivo y las de levadura seca. Sin embargo, a la hora 24 el único caso en que no hubo semejanzas fue en ausencia de aditivo ( $P=0,008$ ). En cualquier caso, los tratamientos en

los que no se añadió ni levadura ni activador fueron los que condujeron a resultados más claramente inferiores.

Con respecto a la interacción entre sustrato y levadura, activada o seca, los valores de PG no fueron significativamente diferentes. No obstante, se vio una tendencia ( $P=0,089$ ) a la hora 10, cuando se dieron algunas diferencias entre tratamientos con diferente sustrato. La diferencia numérica más notable fue observada al comparar tratamientos de C-LR-LevA y PR-LR, y aunque no alcanzó la significancia estadística, fue cada vez mayor con el transcurso de las horas. No se observó distinción entre tratamientos con cebada como sustrato hasta la hora 12, cuando se observó una mejora en los tratamientos C-LR-LevA frente a los carentes de aditivos, que se mantuvo durante el resto de horas del ensayo. Además, en el caso de la pulpa de remolacha como sustrato, que condujo a resultados más diferentes entre los diferentes tratamientos, los tratamientos sin aditivo produjeron menor cantidad de gas que los que contaban con LevA o activador, pero no se vio esa diferencia con respecto a los que contenían LevS. Las diferencias entre tratamientos con LevA y LevS mostraron diferencias a partir de la hora 4, pero esto solo ocurrió cuando la levadura actuaba sobre pulpa de remolacha; con la cebada como sustrato, esta diferencia no se dio. En cuanto a la pulpa de remolacha, se vio diferencia numérica entre tratamientos con levadura activada y tratamientos con levadura seca, pero no entre los primeros y aquellos que solo contaban con activador. No obstante, esta diferencia desapareció a la hora 24.

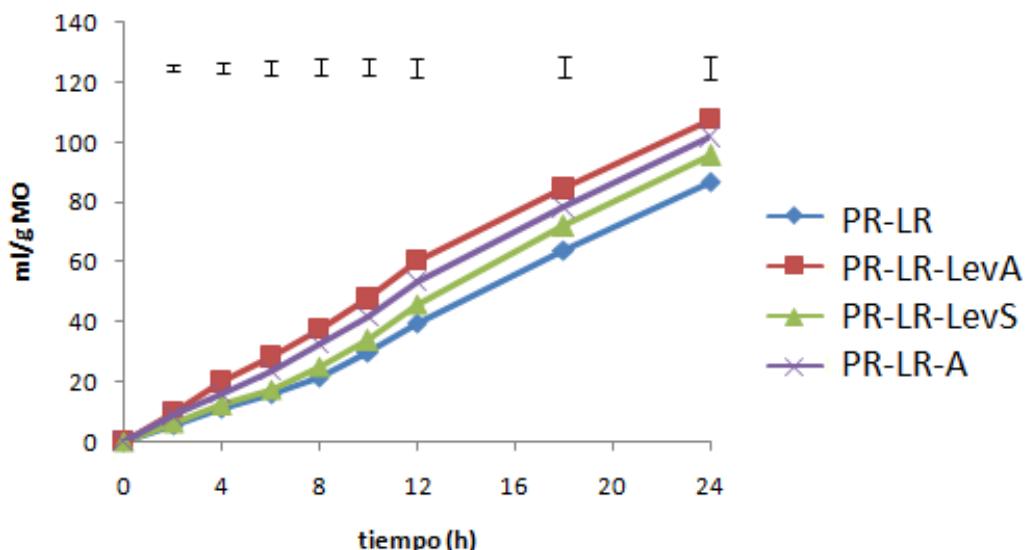


**Figura 1.** Evolución de la producción de gas en los tratamientos con cebada, restando la contribución de la producción de gas debida al líquido de rumen (tratamiento 12) como blanco.

La menor PG fue la que se produjo cuando el sustrato no se acompañó de levadura y/o activador (C-LR), cuando la única actividad microbiana producida fue la que aportaba el líquido

filtrado del contenido ruminal. Con levadura, estando esta activada o no, la fermentación producida fue mayor que cuando no se añadieron aditivos al sustrato, pero cuando se encontraba activada se obtuvieron valores más altos. Si en lugar de levadura se añadía activador al sustrato, la PG también se vio incrementada respecto a los tratamientos sin aditivos.

En este caso, la PG final fue bastante similar tanto si se añadía levadura seca como activador, aunque fue mayor con la primera durante el transcurso del ensayo. En cualquier caso, la máxima fermentación se alcanzó cuando a la cebada se le añadió levadura activada (C-LR-LevA).



**Figura 2.** Evolución de la producción de gas en los tratamientos con pulpa de remolacha, restando la contribución de la producción de gas debida al líquido de rumen (tratamiento 12) como blanco.

La mayor producción se consiguió en los tratamientos PR-LR-LevA. Con la pulpa de remolacha como sustrato, se alcanzaron valores destacadamente mayores cuando se añadió activador en lugar de levadura seca. La menor PG sigue correspondiendo al tratamiento que carecía de ambos aditivos.

En una segunda aproximación a la presentación de los resultados, se tuvo en cuenta que, para el estudio del efecto de la adición de levaduras activadas sobre la capacidad fermentativa del líquido ruminal se debería evitar la desviación de la posible actividad de la levadura *per se*; por ello, los sustratos suplementados con levaduras activadas (tratamientos 3 y 4) se estudian también sustrayendo el tratamiento 11 (levaduras activadas administradas con líquido ruminal).

	<b>h2</b>	<b>h4</b>	<b>h6</b>	<b>h8</b>	<b>h10</b>	<b>h12</b>	<b>h18</b>	<b>24h</b>
<b>C-LR</b>	8,2	18,7	29,8	41,1	52,2	62,7	82,7	103,5
<b>C-LR-LevA</b>	8,6	19,7	30,1	40,7	51,0	62,6	82,6	100,4
<b>C-LR-LevS</b>	10,7	22,7	34,9	47,9	59,7	71,7	91,5	111,3
<b>C-LR-A</b>	9,1	19,7	30,7	43,4	55,8	68,8	89,1	110,5
<b>PR-LR</b>	5,4	11,1	15,8	21,7	29,8	39,7	64,2	86,8
<b>PR-LR-LevA</b>	7,6	15,7	22,2	29,7	38,5	50,0	72,1	93,3
<b>PR-LR-LevS</b>	6,1	12,2	17,6	25,0	33,8	46,0	71,8	95,6
<b>PR-LR-A</b>	8,8	16,2	23,5	32,9	41,9	53,5	78,2	101,9
<b>SEM</b>	1,24	2,00	2,3	2,76	2,76	2,96	3,37	3,53
<b>P sustrato</b>	0,182	0,049	0,010	0,004	0,003	0,002	0,003	0,020
<b>P aditivo</b>	0,382	0,439	0,300	0,15	0,075	0,032	0,044	0,025
<b>P sustrato*aditivo</b>	0,358	0,306	0,138	0,110	0,087	0,141	0,405	0,443

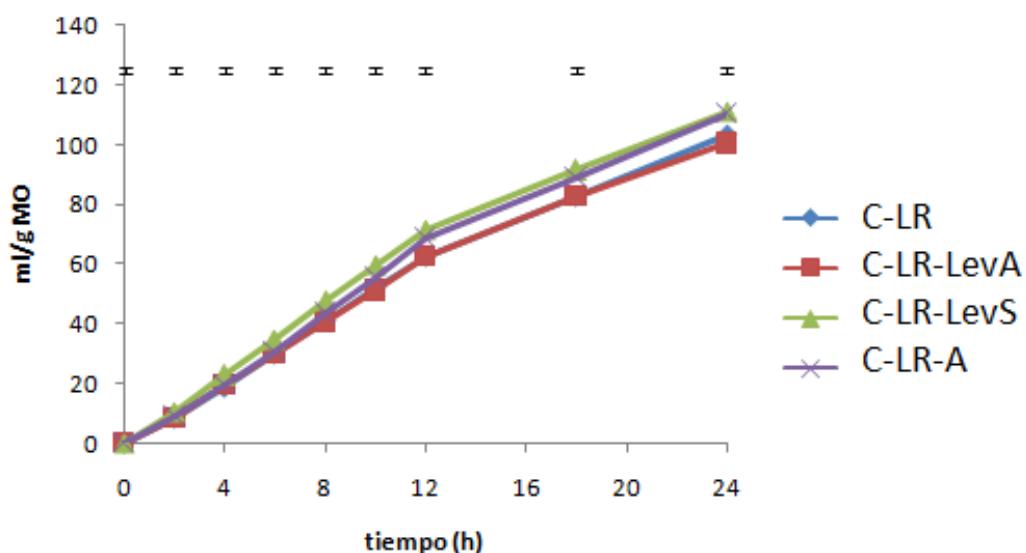
**Tabla 5.** Valores medios de producción de gas (ml/g MO), error y probabilidad a diferentes horas y con distintos tratamientos, restando la contribución de la producción de gas debida a la presencia de levadura activada en líquido de rumen (tratamiento 11) como blanco.

En este caso, al comparar la mejora en la actividad fermentativa del inóculo ruminal de ambos sustratos, una vez eliminada la PG derivada de la actividad de la propia levadura, se observó una mayor PG a partir de la cebada que de la pulpa de remolacha a partir de la hora 4 ( $P=0,049$ ).

Las diferencias entre tratamientos con adición o no de aditivo se pudieron ver a partir de la hora 8, y fueron significativamente estadísticas a partir de la hora 12 ( $P=0,032$ ). A partir de la hora 8, la mayor diferencia se observó entre los tratamientos sin aditivos y los que contenían activador. La mayor PG se obtuvo en los tratamientos con activador, seguidos de los de LevS, y la menor cantidad de gas fue producida en las botellas que carecían de aditivo. También se vio distinción entre tratamientos únicamente con sustrato y los que presentaban LevS, pero no con los que contenían la levadura en forma activada previamente. A las 24 h, también se observó diferencia ( $P=0,025$ ) entre la adición de LevA y activador (siendo la PG mayor en este caso), y entre LevS y ausencia de sustrato (menor PG).

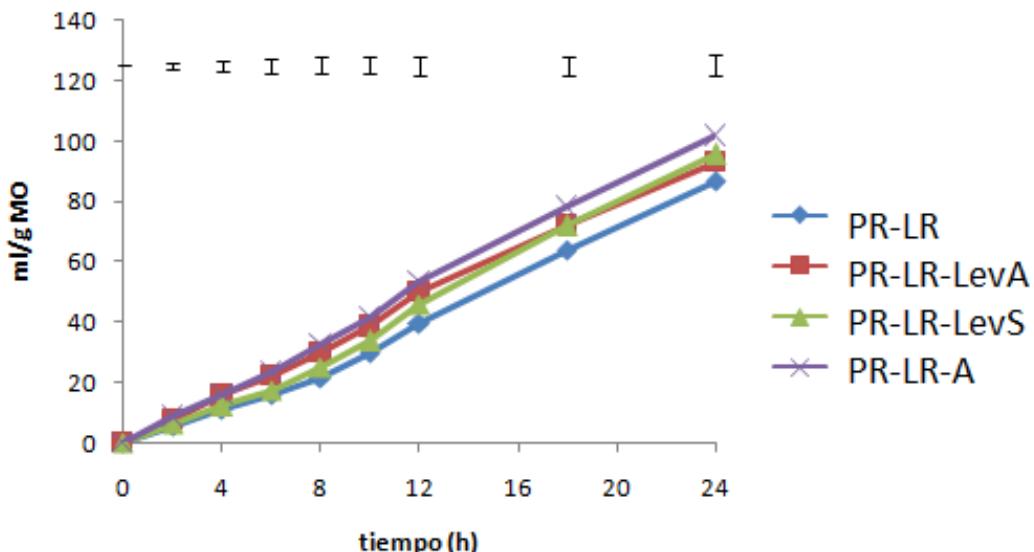
La interacción entre sustrato y la adición o no de aditivo no conllevó a diferencias estadísticamente significativas. Tan solo se observó una tendencia a la hora 10 ( $P=0,087$ ), cuando la diferencia entre sustratos fue bastante evidente. En este momento, la adición de LevA frente a LevS mostró diferencias en el caso de la cebada, pero no en la pulpa de

remolacha, hecho que solo volvió a repetirse a las 24 h. La interacción entre sustrato y la adición o no de aditivo comenzó a mostrar diferenciación numérica a la hora 4, cuando la menor similitud encontrada fue entre C-LR-LevS y PR-LR, diferencia que se mantuvo y fue incrementándose a lo largo del ensayo en toda esta consideración. En cuanto a la cebada, la mayor PG se alcanzó cuando la levadura se encontraba seca. En cambio, con la pulpa de remolacha los mayores resultados se alcanzaron cuando se añadió activador. A las 12 h, todas las muestras de cebada dieron resultados similares entre sí y diferentes a las de pulpa de remolacha.



**Figura 3.** Evolución de la producción de gas en los tratamientos con cebada, corregida por el efecto de la levadura activada en líquido de rumen (tratamiento 11).

La PG cuando se fermentó la cebada fue algo menor en esta consideración que en la anterior. Se observó una gran similitud en los valores obtenidos de botellas C-LR-LevS y las C-LR-A. Lo mismo ocurrió en el caso de tratamientos únicamente con cebada y los C-LR-LevA, presentando estos dos menores valores de fermentación que los dos anteriores.



**Figura 4.** Evolución de la producción de gas en los tratamientos con pulpa de remolacha corregida por el efecto de la levadura activada en líquido de rumen (tratamiento 11).

La mayor PG se consiguió cuando la pulpa de remolacha llevaba añadido activador. En este caso, la adición de levadura al sustrato dio valores finales similares, estuviera esta activada o no. Al igual que en la estimación principal de los resultados, la menor producción se obtuvo cuando el sustrato no se encontraba acompañado de ningún aditivo.

### Desaparición de materia seca

	DMS
C-LR	0,395
C-LR-LevA	0,357
C-LR-LevS	0,380
C-LR-A	0,345
PR-LR	0,311
PR-LR-LevA	0,295
PR-LR-LevS	0,329
PR-LR-A	0,347
SEM	0,02
P sustrato	0,178
P aditivo	0,663
P sustrato*aditivo	0,404

**Tabla 6.** Desaparición de MS en tanto por uno, tras la desecación a 60 °C durante 48 horas.

No se observaron diferencias significativas al comparar sustratos, tratamientos con o sin aditivo ni en la interacción entre sustrato y adición de estos.

## Discusión

Desde el punto de vista de la evolución del pH a lo largo del ensayo, puede observarse que el medio de incubación es capaz de mantener las condiciones previstas de pH 6,0 durante las primeras 8 h, tal como observaron Amanzougarene y Fondevila (2017). No obstante, y de acuerdo con estos autores, la capacidad tampón del medio se consume en las horas posteriores, y el sistema permite una evolución más libre del pH de incubación, por lo que la medida a las 24 horas resultó inferior a la de las 8, aunque las diferencias entre tratamientos fueron de escasa magnitud, inferior a 0,1 unidades de pH. En cualquier caso, los resultados no corresponden al aumento en el pH ruminal resultante de la adición de levadura en los trabajos de Wallace y Newbold (1992), o de Bach et al. (2007), que en sus estudios determinaron que los valores medios de pH ruminal se vieron incrementados ( $P<0,01$ ) cuando la levadura viva fue añadida, en comparación a su no inclusión en la dieta.

Los valores que se obtuvieron en el presente estudio también contradicen lo resultante en el trabajo de Lynch y Martin (2002), que sostenían que las levaduras inactivadas disminuyen el pH cuando actúan sobre almidón soluble, y las activadas lo incrementan.

En cualquier caso, se podría considerar que *Saccharomyces cerevisiae* no perjudica de manera importante el pH ruminal y que contribuye a su estabilización (Brossard et al., 2006). Siendo esto así se ayuda a que las bacterias fermentativas, especialmente las fibrolíticas, más sensibles a bajos pH, se mantengan en el rumen y dispongan por tanto de más tiempo para degradar los carbohidratos.

Los valores de DMS en los tratamientos con cebada fueron mayores, pues se trata de un carbohidrato más fácil y rápidamente fermentable que la pulpa de remolacha, pero no hubo significación estadística entre sustratos, adición de levadura o activador, ni en la interacción entre estos dos.

## Producción de gas

La técnica de determinación de la PG *in vitro* como índice de la fermentación microbiana ruminal es una técnica muy utilizada para la caracterización del valor de los alimentos para rumiantes, así como para la valoración de determinados factores que pueden modular la utilización de nutrientes. El volumen de gas registrado en las incubaciones de las botellas, resultó en valores mayores siempre que se trabajó con la cebada como sustrato en

comparación con la pulpa de remolacha. Esto se debe a la mayor velocidad de fermentación que sufren los carbohidratos no estructurales (azúcares y almidón) dentro del rumen, con respecto a los alimentos fibrosos, los cuales contienen altas proporciones de celulosa y hemicelulosa, y cierto contenido en lignina, siendo, por tanto, más lentamente fermentables.

Al estudiar el gas producido en la fermentación de cebada y pulpa de remolacha, corrigiendo los resultados con el gas que se produce debido a los solubles vehiculados en el líquido ruminal (principal enfoque de los resultados), para evitar la variabilidad entre tandas de incubación en cuanto a la autofermentación de los solubles vehiculados en el inóculo, se observó que, con ambos sustratos, la PG fue mayor cuando se añadió levadura (seca o previamente activada) o activador, en comparación al sustrato no suplementado. Estos resultados concuerdan con lo postulado por Chauvel et al. (2008), pues las levaduras vivas tienen influencia sobre el crecimiento, la proliferación y la actividad de los microorganismos ruminantes. También concuerda con Newbold y Wallace (1996), cuyos estudios también concluyeron que la adición de la levadura incrementa la población de bacterias fibrolíticas, por lo que se ve aumentada la degradación del alimento de volumen y la fermentación que estas bacterias llevan a cabo.

No obstante, este efecto fue mayor cuando la levadura se incluyó en el medio previamente activada, siendo menor el efecto en los tratamientos que incorporaron levadura sin activar o seca, especialmente en el caso de la cebada. Con el ambiente promovido por un alimento concentrado, no supone una gran mejora la previa activación de la levadura con respecto a su presentación en forma seca, pues en esta última forma de presentación, el mayor beneficio que ofrece es su utilización por los microorganismos ruminantes como nutriente adicional. Se supone que la levadura promueve una mayor actividad fermentativa de la población microbiana ruminal, fundamentalmente por reducir la concentración de oxígeno disuelto en el medio, perjudicial para los microorganismos anaerobios estrictos. Alternativamente, la levadura que no se activa después de su adición, o posteriormente muerta en el medio, puede suponer un sustrato de alto valor nutritivo para la población ruminal, favoreciendo indirectamente su actividad como aporte de factores de crecimiento.

En cuanto a la pulpa de remolacha, la mayor fermentación alcanzada con levaduras activadas sugiere que estas favorecen las condiciones de fermentación de las bacterias que fermentan polisacáridos estructurales, o dicho de otra manera, potencian en mayor medida la actividad fermentativa sobre sustratos fibrosos. En este caso, la diferencia en el efecto entre las levaduras secas o activadas adquiere una mayor magnitud sobre la fermentación de fibra.

En todos los casos, el activador, que es un sustrato específico para el desarrollo de la levadura, también puede ser utilizado por la población microbiana ruminal, la cual produce gas a partir de él, como se desprende de los casos en los que se incubó el inóculo con dicho activador y en ausencia de levaduras. No obstante, la posibilidad de que una fracción representativa de activador permanezca en el medio después de la activación del aditivo en cultivo durante 24 horas previamente a la inoculación es bastante improbable, por lo que la importancia de los resultados de este tratamiento es más bien testimonial.

En cualquier caso, no puede descartarse una actividad fermentativa sobre el sustrato a cargo de la propia levadura, independiente del inóculo ruminal. En la segunda estimación de los resultados, cuando a la producción total se le descontó la correspondiente a la actividad de la propia levadura, la fermentación de cebada también fue mayor con levadura seca que la alcanzada cuando no se añadió ningún aditivo, pero esta vez estos tratamientos no fueron superados por los tratamientos de LevA. La razón de que esto suceda podría ser que la mejora en la fermentación que se consigue cuando el activador es utilizado por la levadura es menor que la que se consigue cuando este es aprovechado por la microflora ruminal habitual. Además, según Fuller (1989), la levadura viva ejerce el efecto de probiótico, pero las sustancias con las que se incuba para activarla cuentan con los efectos tanto probióticos como prebióticos.

Asimismo, en este segundo enfoque la cebada con levadura previamente activada resultó en valores similares a los obtenidos cuando la cebada no se acompañaba de aditivos. De esta manera se deduce de nuevo que la levadura activada tiene un efecto más relevante cuando trabaja sobre alimentos forrajeros y no sobre concentrados, ya que su presencia ejerce un mayor efecto sobre las bacterias fibrolíticas. Esto conduce a pensar que la acción de la levadura activada sobre el pienso concentrado no conlleva a una mejora en la fermentación como ocurre cuando actúa sobre una dieta forrajera.

Resumiendo, con la cebada como sustrato, la mayor diferencia se dio cuando se compararon (en ambos enfoques de la presentación de los resultados) los tratamientos en ausencia de aditivos con los que contaban con levadura activada anteriormente. En cambio, con la pulpa de remolacha la mayor diferencia se pudo ver al comparar las muestras sin aditivos y aquellas que contenían activador.

## CONCLUSIONES-CONCLUSIONS

La inclusión de levaduras supone una mejora en la fermentación microbiana de sustratos ricos en almidón o fibra que se da en el rumen, manifestada en la producción de gas a partir de sustrato *in vitro*, con respecto a la no adición de estas. Este efecto es más claro cuando ocurre sobre un sustrato rico en fibra.

El efecto de la adición de levadura es mayor cuando esta se administra previamente activada, mejorando la fermentación microbiana respecto a las levaduras en forma seca. La magnitud de la diferencia en esta respuesta es mayor sobre pulpa de remolacha como sustrato, siendo menos manifiesto el efecto de la forma de presentación de la levadura cuando el sustrato es cebada.

En general, el pH no se vio afectado, por lo que puede afirmarse que la mejora en la fermentación promovida por la adición de levaduras no perjudica el ambiente ruminal.

The inclusion of yeasts in concentrate diets promotes an increase in the rumen microbial fermentation of starch-rich or fiber-rich substrates highlighted in a higher gas production generated *in vitro*, in comparison with the non-added substrate. This effect is clearer when it occurs on a fiber-rich substrate.

The effect of adding the yeast is greater when it has been previously activated, enhancing the microbial fermentation in comparison with dried yeasts. The extent of the difference in the response is greater with beet pulp as substrate, since the effect of the yeast form of presentation is less obvious when is added to barley.

In general, the pH was not markedly affected, and therefore it can be stated that the increased fermentation promoted by the added yeasts did not alter rumen fermentation environment.

## VALORACIÓN PERSONAL

El presente Trabajo de Fin de Grado me ha permitido ampliar mi experiencia en varios aspectos. Por un lado, he tenido la oportunidad de realizar parte del mismo trabajando en un laboratorio, lo que me ha permitido mejorar a la hora de la organización de las tareas dentro de este y los tiempos de espera entre ellas. Además, una vez obtenidos los datos de las mediciones y realizado los análisis estadísticos pertinentes, he incrementado en gran medida mis conocimientos sobre este campo. También he aprendido a realizar una búsqueda de bibliografía, utilizando fuentes fiables, esquematizando, seleccionando y resumiendo la información extraída de estas. Asimismo, mi habilidad para la redacción se ha visto también mejorada en cierta medida.

Por último, quiero agradecer al Dr. Manuel Fondevila Camps por su gran labor como profesor y orientador en todo momento, y a Zahia Amanzougarene por su tiempo, constancia e infinitas ganas de enseñarme.

## BIBLIOGRAFÍA

Abd El-Ghani, A. A. (2004). Influence of diet supplementation with yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on performance of Zaraibi goats. Small Ruminants Research. 52: 223-229.

Abd El-Tawab, M. M., Youssef, I. M. I., Bakr, H. A., Fthenakis, G. C., Giadinis, N. D. (2016). Role of probiotic in nutrition and health on small ruminants. Polish Journal of Veterinary Sciences. 19: 893-900.

Adams, A. L., Harris, B., Van Horn, H., Wilcox, C. J. (1995). Effects of varying forage types on milk production responses to whole cotton seed, tallow and yeast. Journal of Dairy Science. 78: 573-581.

Agazzi, A., Ferroni, M., Fanelli, A., Maroccolo, S., Invernizzi, G., Dell'Orto, V., Savoini, G. (2011). Evaluation of the effects of live yeast supplementation on apparent digestibility of high-fiber diet in mature horses using the acid insoluble ash marker modified method. Journal of Equine Veterinary Science. 31: 3-18.

Ali-Haimoud-Lekhal, D., Lescoat, P., Bayourthe, C., Moncoulon, R. (1999). Effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus orizae* on milk yield and composition in dairy cows: a review. 6<sup>th</sup> Rencontres Recherches Ruminants. 6: 157.  
[http://www.journees3r.fr/IMG/pdf/1999\\_5\\_alim\\_ration\\_05\\_lekhal.pdf](http://www.journees3r.fr/IMG/pdf/1999_5_alim_ration_05_lekhal.pdf) Consulta: 28/2/17.

Alugongo, G. M., Xiao, J. X., Chung, Y. H., Dong, S. Z., Li, S. L., Yoon, I., Wu, Z. H., Cao, Z. J. (2017). Effects of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation products on dairy calves: performance and health. Journal of Dairy Science. 100: 1189-1199.

Alugongo, G. M., Xiao, J., Wu, Z., Li, S., Wang, Y., Cao, Z. (2017). Utilization of yeast of *Saccharomyces cerevisiae* origin in artificially raised calves. Journal of Animal Science and Biotechnology. 8: 34; <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0165-5>.

Amanzougarene, Z., Fondevila, M. (2017). Fitting of pH conditions for the study of concentrate feeds fermentation by the *in vitro* gas production technique. Animal Production Science (aceptado 16/03/2017; <https://doi.org/10.1071/AN16097>).

Bach, A., Iglesias, C., Devant, M. (2007). Daily rumen pH of loose-housed dairy cattle as affected by feeding pattern and live yeast supplementation. Animal Feed Science and Technology. 136: 146-153.

Brossard, L., Chaucheyras-Durand, F., Michalet-Doreau, B., Martin, C. (2006). Dose effect of live yeasts on rumen microbial communities and fermentations during butyric latent acidosis in sheep: new type of interaction. Animal Science. 82: 829-836.

Carro, M. D., Lebzien, P., Rohr, K. (1992). Effects of yeast culture on rumen fermentation, digestibility and duodenal flow in dairy cows fed a silage based diet. Livestock Production Science. 32: 219-229.

Chaucheyras-Durand, F., Chevaux, E., Martin, C., Forano, E. (2012). Use of yeast probiotics in ruminants: effects and mechanisms of action on fumen pH, fibre degradation, and microbiota according to the diet. Intech. Capítulo 7. 119-152

Chaucheyras-Durand, F., Walker, N. D., Bach, A. (2008). Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: past, present and future. Animal Feed Science and Technology. 145: 5-26.

Crichlow, E.C., Chaplin, R.K. (1985). Ruminal lactic acidosis: relationship of fore stomach motility to non dissociated volatile fatty acids levels. American Journal of Veterinary Research. 46: 1908-1911.

Ding, G., Chang, Y., Zhou, Z., Ren, L., Meng, Q. (2014). Effect of *Saccharomyces cerevisiae* on rumen fermentation characteristics, nutrient degradation and cellulase activity of steers fed diets with different concentrate to forage ratios. World Journal of Agricultural Research. 2: 306-307.

Enemark, J.M.D. (2008). The monitoring, prevention and treatment of sub-acute ruminal acidosis (SARA): a review. Veterinary Journal. 176: 32-43.

Fiems L. O. (1994). The use of yeast in practical diets for ruminants. In: Microorganisms and enzyme preparations in animal nutrition (Castanon JIR, ed) Directorate-General for Agriculture. European Commission. Brussels. 159-173.

- Food and Agriculture Organization, World Health Organization (2001). Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria. 4-5.
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*. 66: 365-378.
- Fulton, W. R., Klopfenstein, T. J., Britton, R. A. (1979). Adaptation to high concentrate diets by beef cattle. I. Adaptation to corn and wheat diets. *Journal of Animal Science*. 49: 775-784.
- Gunther, K. D. (1990). Yeast Culture: Success under German dairy conditions. *The Feed Compounder*. January. Citado por Newbold, 1996.
- Harris, B., Lobo, R. (1988). Feeding yeast culture to lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 77: 276. Citado por Newbold, 1996.
- Jouany, J. P., Gobert, J., Medina, B., Bertin, G., Julliand, V. (2008). Effect of live yeast culture supplementation on apparent digestibility and rate of passage in horses fed a high-fiber or high-starch diet. *Journal of Animal Science*. 86: 339-347.
- Jung, H-J. G. (1997). Analysis of forage fiber and cell walls in ruminant nutrition. *The journal of nutrition*. 127: 810S-812S.
- Kaur, I. P., Chopra, K., Saini, A. (2002). Probiotics: potential pharmaceutical applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 15: 1-9.
- Lynch, H. A., Martin, S. A. (2002). Effects of *Saccharomyces cerevisiae* culture and *Saccharomyces cerevisiae* live cells on *in vitro* mixed ruminal microorganism fermentation. 85: 2603-2608.
- Martin, C., Millet, L., Fonty, G., Michalet-Doreau, B. (2001). Cereal supplementation modified the fibrolytic activity but not the structure of the cellulolytic bacterial community associated with rumen solid digesta. *Reproduction Nutrition Development*. 41.
- McDonald, P., Edwards, R. A., Greenhalgh, J. F. D., Morgan, C. A., Sinclair, L. A., Wilkinson, R. G. (2011). *Animal nutrition* (7<sup>th</sup> edition). Pearson.
- Mikulec, Z., Masek, T., Habrun, B., Valpotic, H. (2010). Influence of live yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*) supplementation to the diet of fattening lambs on growth performance and rumen bacterial number. *Veterinarski archive*. 80: 695-703.

- Moya, D., Calsamiglia, S., Ferret, A., Fuentes, M. C. (2007). Effects of yeast and type of starch in pH fluctuation, nutrient digestion and microbial fermentation in a dual flow continuous culture system. *Journal of Dairy Science*. 90: 337 (abstract). Citado por Nina, 2013.
- Newbold, C. J. (1996). Probiotics for ruminants. *Annales de zootechnie*, INRA/EDP Sciences. 45: 329-335.
- 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. *Journal of Animal Science*. 73: 1811-1818.
- Newbold, C. J., Wallace, R. J., McIntosh, F. M. (1996). Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. *British Journal of Nutrition*. 76: 249-261.
- Nina, J. (2013). Estudio del efecto de la adición del cultivo activo de levaduras RFN en la dieta de caprino lechero sobre la producción y calidad de la leche, fermentación ruminal y la degradabilidad de la dieta. Instituto de Nutrición Animal. Estación experimental del Zaidín, Granada. [http://www.uco.es/zootecniaygestion/img/pictorex/14\\_15\\_21\\_TFM\\_Junior.pdf](http://www.uco.es/zootecniaygestion/img/pictorex/14_15_21_TFM_Junior.pdf)  
Consulta: 13/12/17.
- Nocek, J. E. (1997). Bovine acidosis: implications on laminitis. *Journal of Dairy Science*. 80: 1005-1028.
- Owens, F. N., Secrist, D.S, Hill, W. J., Gill, D. R. (1998). Acidosis in cattle: a review. *Journal of Animal Science*. 76: 275-286.
- Parvez, S., Malik, K. A., Ah Kang, S., Kim, H-Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology*. 100: 1171-1185.
- Pinloche, E., McEwan, N., Marden, J-P., Bayourthe, C., Auclair, E., Newbold, C. J. (2013). The effects of a probiotic yeast on the bacterial diversity and population structure in the rumen of cattle. *Plos one*. 8: 4-9.
- Putnam, D. E., Schwab, C. G. (1994). Mode of action of yeast culture. *Journal Animal Science*. 72: 2-5.

Quinonez, J. A., Bush, L. A., Nalsen, T., Adams, G. D. (1988). Effect of yeast culture on intake and production of dairy cows fed high wheat rations. *Journal of Dairy Science*. 71: 275. Citado por Newbold, 1996.

Rymer, C., Huntington, J. A., Williams, B. A., Givens, D. I. (2005). *In vitro* cumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. *Animal Feed Science and Technology*. 123: 19-20.

Sauvant D., Meschu, F., Mertens, D. (1999). Les composantes de l'acidose ruminale et les effets acidogènes des rations. *INRA Productions Animales*. 12: 49-60.

Sherman, P. M., Ossa, J. C., Johnson-Henry, K. (2009). Unreaveling mechanisms of action of probiotics. *Nutri Clin Pract*. 24: 10-4.

Spedding, A. (1991). Effects of Yea-sacc<sup>1026</sup> on performance of beef bulls fed cereal or silage beef diets containing monensin. *Biotechnology in the Feed Industry* (Lyons, T. P.). Alltech Technical Publications. Nicholasville, Kentucky. 333-336.

Statistix 10. Analytical Software (2010).

Strzeltski, J. A., Maciejewicz-Rys, J., Rys, R., Kowalczyk, J., Niwinska, B., Stasiniewicz, T., Maxiaszek, K. (1995). Yeast cells as a feed supplement for cattle. 2. Effect of liquid yeast cultures on digestive processes in the rumen of bulls. *Journal of Animal and Feed Sciences*. 4: 293-295.

Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M. S., McAllan, A. B. and France, J. (1994). A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48: 185-197.

Uyeno, Y., Akiyama, K., Hasunuma, T., Yamamoto, H., Yokokawa, H., Yamaguchi, T., Kawashima, K., Itoh, M., Kushibiki, S., Hirako, M. (2016). Effects of supplementing an active dry yeast producton rumen microbial community composition and on subsequent rumen fermentation of lactating cows in the mid-to-late lactation period. *Animal Science Journal*. 88: 119-124.

Uyeno, Y., Shigemori, S., Shimosato, T. (2015). Effect of probiotics/prebiotics on cattle health and productivity. *Microbes Environ*. 30: 128-130.

- Van Lier, E., Regueiro, M. (2008). Digestión en retículo-rumen. Curso de Anatomía y Fisiología Animal. Facultad de Agronomía. Universidad de la República. Montevideo, Uruguay. <http://prodanimal.fagro.edu.uy/cursos/AFA/TEORICOS/Repartido-Digestion-en-Reticulo-Rumen.pdf> Consulta: 7/4/17.
- Van Soest, P. J. (1994). Nutritional ecology of the ruminant, 2<sup>nd</sup> edition. Cornell University Press. Ithaca.
- Wallace, R. J., Newbold, C. J. (1992). Probiotics for Ruminants. Probiotics: The Scientific Basis (Fuller, R., ed). Chapman and Hall. London. 317-353.
- Wallace, R. J., Newbold, C. J. (1993). Rumen fermentation and its manipulation: The development of yeast cultures as feed additives. Biotechnology in the Feed Industry (Lyons T. P.). Alltech Technical Publications. Kentucky. 173-192.
- Wallace, R. J., Newbold, C. J. (2007). Microbial feed additives for ruminants .Rowett Research Institute. Bucksburn. Aberdeen. UK. 101-125.
- Wang, Z., He, Z., Beauchemin, K. A., Tang, S., Zhou, C., Han, Z., Wang, M., Kang, J., Odongo, N. E., Tan, Z. (2016). Evaluation of different yeast species for improving *in vitro* fermentation of cereal straws. Asian-Australasian Journal of Animal Science. 29: 230-240.
- Walsh, R. M., Martin, P. A. (1977). Growth of *Saccharomyces cerevisiae* and *S. ovorum* in a temperature gradient incubator. Journal of the Institute of Brewing. 83: 169-172.
- Williams, P. E. V., Tait C. A. G, Innes G. M., Newbold C. J. (1991). 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. Journal of Animal Science. 69: 3019-3025.
- Yirga, H. (2015). The use of a probiotic in animal nutrition. Probiotic & Health. 3: 132. <https://doi.org/10.4172/2329-8901.1000132>.
- Zhu, W., Wei, Z., Xu, N., Yang, F., Yoon, I., Chung, Y., Liu, J., Wang, J. (2017). Effects of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation products on performance and rumen fermentation and microbiota in dairy cows fed a diet containing low quality forage. Journal of Animal Science and Biotechnology. 8: 36. <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0167-3>.