

EFECTO DE PREPARADOS CON LEVADURAS *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* Y LEVICA 25 VIABLES EN LOS METANÓGENOS Y METANOGENÉISIS RUMINAL *IN VITRO*

S. Castañeda; B. Díaz; G. Moreno

Escuela Superior Politécnica de Chimborazo
Panamericana Sur Km 1. Teléfono: 097192784. E-mail: holabyron@yahoo.es

R esumen

En el departamento de Ciencias Biofisiológicas perteneciente al Instituto de Ciencia Animal, que se encuentra ubicado en el Municipio San José de las Lajas, provincia La Habana, Cuba, entre septiembre de 2008 y enero de 2009, se realizó la investigación “Efecto de preparados con levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y Levica 25 viables en los metanógenos y metanogénesis ruminal *in vitro*”, cuyos tratamientos evaluados fueron: pasto estrella (control), pasto estrella + *Saccharomyces cerevisiae* y pasto estrella + Levica 25, donde se utilizó líquido ruminal de búfalos. Se evaluaron 3 tratamientos con 4 repeticiones cada uno, a las 8, 12 y 24 horas; en la cual se aplicó un diseño completamente al azar bifactorial 3 x 3 (3 tratamientos, 3 horas de muestreo). Existieron diferencias altamente significativas en función del tipo de tratamientos dentro de cada hora de evaluación y en función de las horas evaluadas en los diferentes tratamientos, cuyas variables fueron: población de metanógenos, producción de gas, producción de metano, bacterias celulolíticas, bacterias viables totales, protozoos y Ph. En este último se registraron diferencias significativas dentro de los tratamientos en donde se utilizaron levaduras y el tratamiento control; no así dentro de las horas de fermentación, en donde no se registraron diferencias estadísticas. Por lo tanto, la utilización de levaduras como suplemento en la dieta de rumiantes mejora el aprovechamiento del alimento ya que aumenta la población de bacterias celulolíticas (que desdoblán la celulosa) y hay una disminución de la población de bacterias metanogénicas (que producen el metano, perjudicial para el medioambiente). Se determinó que la mejor levadura es la Levica 25, que produce un efecto más eficiente. Por todo lo expuesto, se recomienda la utilización de preparados microbianos a partir de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae* y *Levica 25*) en rumiantes mayores para disminuir la metanogénesis en el rumen e incrementar la población de bacterias celulolíticas, que permitirán una mayor digestibilidad y aprovechamiento de los nutrientes de los pastos; igualmente se recomienda realizar otras investigaciones con otros preparados microbianos.

Palabras claves: levaduras, metanogénesis, ruminal, metano, celulolíticas

A bstract

In the department of sciences Biofisiológicas belong to the Institute of Animal Science that is located in the Municipality San José de las Lajas, county Habana, Cuba province, between September 2008 and January 2009, It`ve made the follow investigation: “Effect of prepared with yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and Levica 25 viable in the metanógenos and metanogénesis ruminal *in vitro*” whose valued treatments were: I pasture it shatters (control), Pasture it shatters + *Saccharomyces cerevisiae* and Grass shatters + Levica 25 where you uses liquidate ruminal of buffalos. 3 treatments were eva-

1. Autor de la Investigación. Tesis de Grado para la obtención del Título de Ingeniera Zootecnista.
2. Miembros de tribunal de tesis. Docentes. FCP. ESPOCH.

luated with 4 repetitions each one at the 8,12 and 24 hours, in which a design was applied bifactorial totally at random 3 x 3 (3 treatments, 3 hours of sampling).Existed highly significant differences in function to the type of treatments in every hour of evaluation and in function of the hours evaluated in the different treatments whose variables: population of metanógenos production of gas production of methane bacterias celulolíticas bacterias viable total protozoos and Ph. Observed in this last that registered significant differences inside the treatments where yeasts and the treatment control were used, not being this way in the hours of fermentation where didn't register statistical differences. Therefore the use of Yeasts like supplement in the diet of ruminant improvement the use of the food since the population of bacterias celulolíticas increases which unfold the cellulose and there is the population's of bacterias metanogénicas decrease which produce the methane that is harmful for the environment. You determines that the best yeast is the Levica 25 which produces a more efficient effect. All told that exposed the use is recommended of prepared microbial starting from yeasts (*Saccharomyces cerevisiae* and Levica 25) in ruminant adults to diminish the metanogénesis in the rumen and to increase the population of bacterias celulolíticas that you/they will allow a bigger digestibilidad and use of the nutrients of the grasses, equally to carry out other investigations with other microbial preparations.

Keywords: yeasts, methanogenesis, ruminal, methane, celulolíticas

INTRODUCCIÓN

Los rumiantes producen alrededor del 97% del metano generado por los animales domésticos, y el sitio principal de generación de metano es el rumen, como consecuencia inevitable de la fermentación de los carbohidratos por los microorganismos que habitan en él; se estima una producción anual de 300-600 litros en rumiantes adultos. Este gas es el responsable del 18% del efecto invernadero producido en la atmósfera. Se emite a la atmósfera mediante el eructo, y la cantidad que se libera depende del volumen y del tipo de alimento que consumen los rumiantes, siendo su producción menor cuando las dietas tienen bajas cantidades de fibra (1).

El metano que emiten los rumiantes no solo constituye un problema ecológico, sino que también contribuye a la pérdida de energía del alimento, lo que trae como consecuencia una disminución de la productividad de los animales, estimándose que más del 10% de la energía bruta que contienen los alimentos se pierde en forma de metano.

Se ha demostrado que, en rumiantes, las prácticas de alimentación que aumenten el consumo y la velocidad de digestión o acorten el tiempo de permanencia de los alimentos en el rumen disminuyen la producción de metano por unidad de forraje digerido. Al respecto, el empleo de preparados microbianos con levaduras viables constituye una atractiva opción. Una posibilidad, que ha sido estudiada para reducir la producción de metano en el rumen, es el empleo de aditivos con levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

En Cuba, Marrero (2) determinó que esta levadura es capaz de activar la población microbiana ruminal, e indicó que otras levaduras, entre las que se destaca Levica 25, pueden producir potencialmente efectos superiores a la *Saccharomyces cerevisiae*. Es bien reconocido que la dieta, y principalmente el contenido de fibra, influyen en la densidad poblacional de metanógenos en el rumen; así, menor cantidad de bacterias metanogénicas se detectarán en el rumen de animales alimentados con concentrado en comparación a los alimentados con forraje (3).

El empleo de aditivos microbianos con levaduras viables es una opción válida para contrarrestar la población de metanógenos, debido a su importante papel como manipuladoras de la fermentación ruminal, lo que provoca un incremento de bacterias celulolíticas que permiten una mejor digestión y, consecuentemente, mayor aprovechamiento de los nutrientes del alimento. Por estas consideraciones, en la presente investigación se planteó evaluar el efecto de preparados de levaduras a partir de *Saccharomyces cerevisiae* y Levica 25 en la metanogénesis ruminal *in vitro* de rumiantes mayores.

MATERIALES Y MÉTODOS

LOCALIZACIÓN Y DURACIÓN DEL EXPERIMENTO

El experimento se efectuó en el Laboratorio de Microbiología del Rumen del Instituto de Ciencia Animal, ubicado en la Carretera Central km 47 ½, en el Municipio San José de las Lajas, Provincia La Habana, Cuba. El experimento de validación se efectuó en el Laboratorio de Biotecnología y Microbiología Animal de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, en la Facultad de Ciencias Pecuarias, localizado en la Panamericana Sur km 1 ½, Riobamba, Ecuador.

UNIDADES EXPERIMENTALES

Las unidades experimentales estuvieron conformadas por 4 botellas de vidrio de 100 mL selladas con tapón de butilo y agrafe, en las cuales se introdujo el líquido ruminal, pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*) y preparados de levaduras.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS Y PRUEBAS DE SIGNIFICANCIA

Los resultados experimentales fueron sometidos a los siguientes procedimientos:

- Análisis de Varianza (ADEVA).
- Separación de Promedios por el método de rango múltiple de Duncan a un nivel de significancia de $P < 0,05$ y $P < 0,01$.

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

El experimento se condujo bajo condiciones *in vitro*, para lo cual se utilizó la técnica de Theodorou et al. (4) y se emplearon botellas de vidrio de 100 mL selladas con tapón de butilo y agrafe.

En cada botella se introdujo la mezcla integrada por líquido de rumen y so-

lución buffer en una relación de una parte de líquido ruminal y tres partes de solución buffer; y para el control se introdujo la mezcla integrada por líquido de rumen y solución buffer en una relación de una parte de líquido ruminal y cuatro partes de solución buffer.

El inóculo ruminal se obtuvo a partir de dos búfalos canulados en rumen alimentados con una dieta de forraje de gramíneas sin suplementación adicional y libre acceso al agua.

La muestra de líquido ruminal se colectó mediante la cánula, con la ayuda de una bomba de vacío, y se conservó en termos herméticamente cerrados hasta su traslado al laboratorio de microbiología y genética molecular del rumen, del Instituto de Ciencia Animal, donde, posteriormente, se filtrarán a través de muselina. Para conformar la mezcla a fermentar, se utilizó el pool (licuado) de líquido ruminal de los búfalos con el propósito de eliminar el efecto animal.

Técnicas de cultivo y conteos de microorganismos

Se utilizó la técnica de cultivo de Hungate (5) en tubos roll y bajo condiciones de anaerobiosis estricta.

La siembra de bacterias viables totales y celulolíticas se efectuó en los medios de cultivo de Caldwell y Bryant (6), modificados por Galindo (7). Las bacterias metanogénicas se contaron por el mismo método; pero se utilizó una mezcla de hidrógeno y dióxido de carbono (60:40) en la fase gaseosa.

Los protozoos se preservaron en formol al 10% en una dilución 1:1 (v/v). Las muestras preservadas se guardaron en refrigerador a 4 °C y se contaron, posteriormente, al microscopio óptico en cámara de Neubauer. Para ello, los protozoos se tiñeron con una solución de violeta genciana al 0,01% en ácido acético glacial al 1%.

Preparación de la muestra del pasto

El alimento base para la fermentación es pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*), que se obtuvo a partir de un área sin pastorear del Instituto de Ciencia Animal. Para su preparación, se recolectaron hojas con sus pecíolos, de manera que semejara el bocado del animal. La muestra se secó en estufa a 60 °C durante 48 horas. Luego se molió en molino hasta un tamaño de partículas de 1 mm. Se conservó en frascos de cristal hasta su posterior utilización en el experimento.

Una muestra de aproximadamente 100 g se llevó al Laboratorio de Química Analítica para determinar su composición bromatológica.

Obtención del preparado microbiano con *Saccharomyces cerevisiae* y levica 25

Primeramente se preparó sendos pre inóculos, para lo cual se toman varias asas de cultivos en cuña de ambas levaduras con 24 horas de crecimiento, y se disuelven en 10 mL de caldo extracto de malta. Se incubó a 30 °C durante 16 horas. El preparado que se utilizó en el experimento se obtuvo después de inocular los 10 mL anteriormente obtenidos en 100 mL de caldo extracto de malta. De igual manera, se colocaron en la incubadora a 30 °C durante 16 horas. Se obtuvieron dos preparados microbianos, los que corresponden a sendas levaduras con una concentración inicial de células de 1 x 10⁷ cel/mL.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

EVALUACIÓN DE LA METANOGÉNESIS RUMINAL *IN VITRO* POR EFECTO DE PREPARADOS MICROBIANOS CON LEVADURAS VIABLES

Potencial hidrógeno (pH)

Se registraron diferencias significativas en los tratamientos donde se utilizaron levaduras y el tratamiento control; no así en cuanto a las horas de fermentación, donde no se registraron diferencias estadísticas.

En cuanto al pH presente en el líquido ruminal, al utilizar levaduras *in vitro* versus el tratamiento control, se puede señalar que el pH más bajo se presentó con la utilización de la levadura Levica 25 en 6,33, mientras que al utilizar *Saccharomyces cerevisiae* el pH fue mayor con 6,79; finalmente con el tratamiento control se presentó un pH alcalino de 7,43, siendo este el más elevado en comparación con el pH obtenido en los tratamientos en que se utilizó levaduras (cuadro 1).

tratamiento y tiempo de fermentación						
Variables	Tratamientos			X	Prob.	CV(%)
	C	S	L			
pH	7,43 a	6,79 b	6,33 c	6,85	0,0001	5,47
C: Control S: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> L: <i>Levica 25</i>						
Variables	8	12	24	X	Prob.	CV%
	PH	6,98 a	6,81 a			

Fuente: Castañeda, 2008

Cuadro 1. Resultados de eficiencia de salida del colector respecto a la radiación solar ingresada con los datos de Guayaquil

Producción de gas total (ml/g)

Mediante la incorporación *in vitro* de Levica 25 se determinaron diferencias estadísticas. Así, a las 24 horas de

evaluación se determinó el mayor promedio con 42,55 ml/g de materia seca de gas total; seguido por las 12 y 8 horas de evaluación, donde se determinaron promedios de producción de gas total de 25,33 y 20,50 ml/g de materia seca, respectivamente (cuadro 2).

Los resultados obtenidos en cada una de las horas evaluadas en los diferentes tratamientos demuestran la marcada disminución de gas metano que compone gran parte de la producción de gas total, considerando lo expuesto por Marrero (2), quien determinó que esta levadura es capaz de activar la población microbiana ruminal y reducir la producción de metano, destacando que Levica 25 puede producir potencialmente efectos superiores a la *Saccharomyces cerevisiae*, por lo que en la presente investigación se obtuvieron efectos similares a los expuestos por el mencionado autor.

Producción de gas metano (µl)

Al comparar los promedios en cuanto a la producción de gas metano en función del tipo de tratamientos dentro de cada hora de evaluación y en función de las horas de evaluación dentro de cada tipo de levadura y grupo control, se determinó diferencias estadísticas con diferentes comportamientos dentro de cada tipo de levadura evaluada. De esta manera, al comparar la producción de gas metano dentro del grupo control, se determinó el mayor promedio a las 24 horas con 11,50 µL, seguido por producciones más bajas de gas metano obtenidas a las 12 y 8 horas de evaluación, en las cuales se determinó producciones de 10,50 y 9,25 µL, respectivamente (cuadro 2).

Mediante la incorporación *in vitro* de Levica 25 se determinaron diferencias estadísticas. Así, a las 24 horas de evaluación se determinó el promedio más bajo, con 3,00 µL de gas total, en donde los mayores promedios de producción de gas metano se obtuvieron a las 12 y 8 horas de evaluación, con 4,50 y 6,75 µL, respectivamente (cuadro 2).

Los resultados obtenidos con los preparados microbianos se hallan relacionados con lo descrito por Hungate (5), quien in-

formó que los metanógenos que viven en el interior o adheridos a la superficie de los protozoos ciliados del rumen son responsables de más del 37% de las emisiones de metano.

tratamientos de acuerdo con el tiempo												
Variables	8 horas			12 horas			24 horas			X	Prob.	CV (%)
	C	S	L	C	S	L	C	S	L			
Densidad de Bacterias Viables Totales, 1×10^{11} UFC/ml	72,00 a	66,00 b	18,00 c	112,95 a	78,50 b	69,50 c	264,25 a	169,25 b	126,0 c	108,52	0,0001**	1,43
Densidad de Bacterias Celulolíticas, 1×10^4 UFL/ml	26,00 c	27,00 b	30,00 a	14,00 c	30,00 b	42,50 a	13,50 c	37,25 b	64,50 a	31,64	0,0001**	3,32
Densidad de Bacterias Metanogénicas 1×10^9 UFC/ml	81,00 a	72,50 b	66,53 c	112,00 a	54,53 b	43,03 c	300,00 a	48,48 b	39,25 c	90,81	0,0001**	2,25
Densidad de Protozoarios, 1×10^6 especímenes/ml	19,13 a	16,50 b	14,88 c	21,50 a	14,50 b	12,63 c	34,88 a	11,25 b	6,88 c	16,90	0,0001**	6,61
Producción de Gas Total, mL/g de Ms	43,30 a	30,30 b	20,50 c	62,13 a	45,50 b	25,33 c	95,00 a	71,55 b	42,55 c	48,46	0,0001**	3,41
Producción de Gas Metano μ L	9,25 a	8,25 b	6,75 c	10,50 a	7,75 b	4,50 c	11,50 a	4,75 b	3,00 c	7,36	0,0001**	6,60

Fuente: Castañeda, 2008.

C: Control S: *Saccharomyces cerevisiae* L: Levica 25

Letras iguales no difieren estadísticamente. Según Duncan ($P < 0.05$ y $P < 0.01$).

Prob: Probabilidad.

CV (%): Porcentaje de Coeficiente de Variación. X: Media General. **: Diferencia altamente significativa entre promedios. *: Diferencia significativa entre promedios. ns: Diferencia no significativa entre promedios.

Cuadro 2. Evaluación de las características microbiológicas y fermentativas ante el efecto de preparados microbianos con levaduras variables sobre la metanogénesis ruminal *in vitro*, de acuerdo con el tratamiento y tiempo de fermentación

EFFECTO DE PREPARADOS MICROBIANOS CON LEVADURAS VIA-BLES EN LA POBLACIÓN MICROBIO-LÓGICA RUMINAL *IN VITRO*

Población de bacterias viables totales (ufc/ml)

Mediante la incorporación *in vitro* de Levica 25 se determinaron diferencias estadísticas. Así, a las 24 horas de evaluación se determinó el mayor promedio con $126,00 \times 10^{11}$ UFC de bacterias viables totales/ml; seguido por las densidades de bacterias obtenidas a las 12 y 8 horas de evaluación, donde se determinaron promedios de $69,50$ y $18,00 \times 10^{11}$ UFC/ml en su orden (cuadro 2).

Los resultados obtenidos en la población de bacterias viables totales están relacionados con los obtenidos por Orpin (8), quien al evaluar el efecto de *Saccharomyces boulardii* en el metabolismo ruminal concluyó que la levadura era digerida por los microorganismos del rumen, por lo que era más utilizada como prebiótico que como aditivo microbiano, por obtener un incremento significativo en la población de bacterias benéficas que favorecían a la digestión de los forrajes.

Población de bacterias celulolíticas (ufc/ml)

Mediante la incorporación *in vitro* de Levica 25 se determinaron diferencias estadísticas. Así, a las 24 horas de evaluación se obtuvo el mayor promedio, con $64,50 \times 10^4$ UFC de bacterias celulolíticas/ml; seguido por las densidades más bajas de bacterias obtenidas a las 12 y 8 ho-

ras de evaluación, donde se determinaron promedios de 42,50 y 30,00x10⁴ UFC/ml respectivamente (cuadro 2). Respecto a estos resultados, se confirma que la levadura Levica 25 resultó ser la más promisoriosa para su empleo como activadora de la fermentación ruminal. Coincidiendo con los resultados expuestos por Marrero (2), quien afirma que esta cepa produjo 15% más de gas en fermentaciones *in vitro* con *Cynodon nlemfuensis* en relación con el resto de las aisladas en el rumen; y además ejerció efectos activadores más prolongados en las poblaciones fúngicas y de bacterias totales y celulolíticas cuando se comparó con la cepa *Saccharomyces cerevisiae* L/25-7-13, en vacas que consumen dietas fibrosas.

Población de bacterias metanogénicas (ufc/ml)

Mediante la incorporación *in vitro* de Levica 25 se determinaron diferencias estadísticas. Así, a las 8 horas de evaluación se obtuvo el mayor promedio, con 66,53x10⁹ UFC de bacterias metanogénicas/mL; seguido por el promedio obtenido a las 12 horas de evaluación con 43,03x10⁹ UFC/mL, mientras que un promedio menor se registró a las 24 horas con 39,25x10⁹ UFC/mL (cuadro 2).

Población de protozoos (ufc/ml)

Al comparar los promedios de la densidad de protozoarios, en función del tipo de levadura dentro de cada hora de evaluación, y en función de las horas de evaluación dentro de cada tipo de levadura, se determinó diferentes comportamientos dentro de cada tipo de levadura evaluada de esta manera. Al comparar la densidad de protozoarios dentro del grupo control, se determinó el mayor promedio a las 24 horas, con 34,88x10⁵ especímenes/mL; posteriormente se presentaron densidades más bajas de protozoarios obtenidas a las 12 y 8 horas de evaluación, en las cuales se determinaron promedios de 21,50 y 19,13x10⁵ especímenes/mL respectivamente (cuadro 2).

Mediante la incorporación *in vitro* de Levica 25 se determinaron diferencias estadísticas: a las 8 horas de eva-

luación se obtuvo el mayor promedio, con 14,88x10⁵ especímenes de protozoarios/mL; seguido por el promedio obtenido a las 12 horas de evaluación, con 12,63x10⁵ especímenes/mL; mientras que un promedio menor se registró a las 24 horas, con un promedio de protozoarios de 6,88x10⁵ especímenes/mL (cuadro 2).

De la misma manera, al validar el efecto del preparado microbiano a partir de *Saccharomyces cerevisiae* en Ecuador se determinó que la densidad de protozoarios decrece con relación al incremento del tiempo de fermentación; así, se ha determinado una disminución en la población de protozoarios a partir de la hora 8 con 12,25x10⁵ especímenes/mL, decreciendo a una población de 10,50x10⁵ especímenes/mL a las 12 horas de evaluación, y finalmente a 8,00x10⁵ especímenes/mL a las 24 horas de fermentación (cuadro 3).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Sobre la base de los resultados obtenidos, se concluye lo siguiente:

1. Mediante la utilización de preparados microbianos a base de levaduras Levica 25 y *Saccharomyces cerevisiae*, se determinó un efecto significativo con relación al grupo control en cuanto a la reducción de la producción de gas total y gas metano *in vitro* de la digestión del pasto estrella; sin embargo, la utilización de Levica 25 produce un efecto más eficiente.
2. Mediante la aplicación de preparados microbianos a base de Levica 25 en la digestibilidad *in vitro* de líquido ruminal, se determinó una menor población de protozoos y bacterias metanogénicas, lo que favoreció al desarrollo de bacterias celulolíticas en el rumen.
3. El costo de la aplicación de preparados microbianos a partir de levadu-

Variables	Horas de evaluación		
	8	12	24
Densidad de bacterias viables totales, 1x10 ¹¹ UFC/mL	65,00	74,80	158,50
Densidad de protozoarios, 1x10 ⁵ especímenes/mL	12,25	10,50	8,00
pH	6,80	6,76	6,25

Fuente: Castañeda, 2008

Cuadro 3. Validación del efecto de preparados microbianos a base de *Saccharomyces cerevisiae* sobre la población microbiológica ruminal *in vitro*

ras en rumiantes mayores durante un año es de \$21,24, lo que corresponde a un costo diario de \$0,058/160 mL que deben ser ofertados diariamente a los rumiantes para disminuir el contenido de metanógenos del rumen e incrementar la densidad de bacterias celulolíticas.

4. En la validación realizada en Ecuador, se determinó que la utilización de un preparado microbiano a base de *Saccharomyces cerevisiae* en bovinos presenta resultados similares a los obtenidos en Cuba en cuanto a pH y densidad de bacterias viables totales y protozoarios.

Por ello, se recomienda:

1. Utilizar preparados microbianos a partir de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae* y Levica 25) en rumiantes mayores para disminuir la metanogénesis en el rumen y para incrementar la población de bacterias celulolíticas, que permitirán una mayor digestibilidad y aprovechamiento de los nutrientes de los pastos.
2. Realizar nuevas investigaciones para evaluar los niveles adecuados de suministro de preparados microbianos a base de levaduras, tanto en bovinos lecheros como en los de carne.
3. Divulgar los resultados obtenidos en la investigación a nivel de gobierno local y organizaciones de productores, a fin de adoptar tecnologías que permitan el incremento de la productividad utilizando compuestos orgánicos amigables con el medio.

R referencias

1. Gil SB. Sistema de producción de carne bovina: Engorde intensivo. Elementos que intervienen y posibles impactos en el medio ambiente; 2004.
2. Marrero Y. Las levaduras como mejoradoras de la fermentación ruminal de dietas con alto contenido de fibra. [Tesis doctoral]. Instituto de Ciencia Animal. La Habana, Cuba; 2005.
3. Demeyer, D. L. y Fievez, V. 2000. Ruminants et environnement: la méthanogénèse. Ann. Zootech., 49: 94-112.
4. Theodorou, M. K, Williams, B. A., Dhanoa, M. S., Mcallan, A. B. y France, J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminants feed. Anim. Feed. Sci. Tech., 48: 185-197
5. Hungate R.G. 1970. The anaerobic, mesophilic cellulolytic bacteria. Bacterial: 112.
6. Caldwell DR y Bryant, MP. 1966. Medium without fluid for nonselective enumeration and isolation of rumen bacteria. Appl. Microbiol. 14(5): 794-801.
7. Galindo J. Efecto de la zeolita en la población de bacterias celulolíticas y su actividad en vacas que consumen ensilaje. [Tesis doctoral]. Instituto de Ciencia Animal. La Habana, Cuba; 1988.
8. Orpin, C. 1983. The role of ciliate protozoa and fungi in the rumen digestion of plant cell walls. Anim. Feed Sci. Technol, 10:121-143.