



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

**FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS**

**ESCUELA DE INGENIERÍA ZOOTÉCNICA**

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LEVADURAS COMERCIALES SOBRE LA  
FERMENTACIÓN RUMINAL Y DIGESTIBILIDAD DE LOS NUTRIENTES  
MEDIANTE UN SISTEMA DE MEDICIÓN DE GAS IN VITRO”**

**TRABAJO DE TITULACIÓN**

**TIPO: TRABAJOS EXPERIMENTALES**

**Previo a la obtención del título de:**

**INGENIERA ZOOTECNISTA**

**AUTORA:**

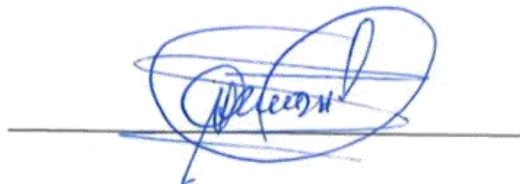
**KAREN NICOLE YANEZ FREIRE**

**RIOBAMBA – ECUADOR**

**2017**

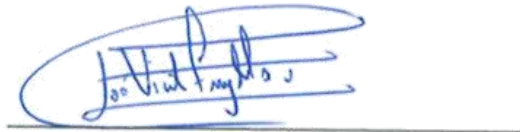
Este Trabajo de Titulación fue aprobado por el siguiente Tribunal

Este Trabajo de Titulación fue aprobado por el siguiente Tribunal



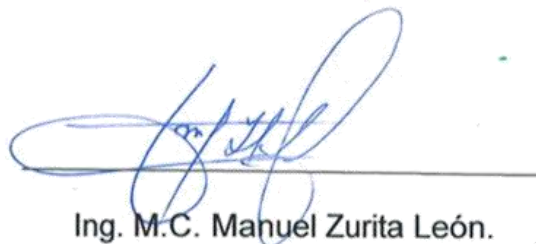
Ing. M.C. Hermenegildo Diaz Berrones.

**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**



Ing. M.C. José Vicente Trujillo Villacís.

**DIRECTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**



Ing. M.C. Manuel Zurita León.

**ASESOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**

Riobamba, 02 de junio del 2017.

## DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo Karen Nicole Yáñez Freire, con C.I. 180471049-7 declaro que el presente trabajo de titulación, es de mi autoría, y que los resultados del mismo son auténticos y originales, los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autora, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.

Riobamba, 30 de Mayo del 2017.



Karen Nicole Yáñez Freire

C.I. 180471049-7

## **AGRADECIMIENTO**

Primero a Dios por la vida y la fuerza de voluntad que día, día me ha dado para seguir adelante sin desmayar y obtener uno de mis grandes objetivos.

A mis padres y hermanos por su apoyo incondicional.

A mi hija el principal motivo de superación para ser mejor persona cada día.

A mi querida la Facultad de Ciencias Pecuarias, de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, que fue donde realice mi formación académica, por todos los conocimientos impartidos.

A la Facultad de Zootecnia y Ecología, de la Universidad Autónoma de Chihuahua, por aceptarme en el programa de Licenciatura por sus atenciones y servicios.

Al **Ph.D. Oscar Ruiz Barrera**, por brindarme su apoyo como asesor externo, profesor y amigo.

Al **Ph.D. Lorenzo Duran** por su apoyo esencial durante el proceso de realización de mi estancia.

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo con todo mi amor y gratitud a Dios, por darme la vida y a la Santísima Virgen del Cisne, quien me ha acompañado durante toda esta trayectoria con sus bendiciones.

### **A mis padres,**

*Jorge Yanez Ruiz e Hilda Freire Cortez* por su amor y paciencia. Ustedes son un gran ejemplo de superación, gracias.

### **A mi hija,**

*Malenie Shelit Pacheco Yáñez*, por ser mi motor, mi mayor motivo de superación constante.

### **A mis hermanos,**

*Cristian, Johnny y Nahomi*, por todo su cariño y apoyo.

### **A mis abuelitos,**

Por su apoyo, y confianza.

## CONTENIDO

Resumen	v
Abstract	vi
Lista de cuadros	vii
Lista de gráficos	viii
Lista de anexos	ix
<b>I. <u>INTRODUCCIÓN</u></b>	<b>1</b>
<b>II. <u>REVISIÓN DE LITERATURA</u></b>	<b>3</b>
<b>A. ALIMENTOS FUNCIONALES</b>	<b>3</b>
<b>B. PROBIÓTICOS</b>	<b>3</b>
1. Probióticos en la alimentación animal	4
<b>C. LEVADURAS</b>	<b>4</b>
1. Uso de levaduras en la alimentación animal	5
2. Mecanismo de funcionamiento de las levaduras	6
<b>D. LEVADURA SACCHAROMYCES CEREVISIAE</b>	<b>6</b>
<b>E. METANOGENÉISIS RUMINAL</b>	<b>7</b>
1. <u>Control de la metanogénesis ruminal</u>	7
2. Factores que influyen en la metanogénesis ruminal	8
a. Tipo de sustrato	10
b. Tampón empleado	10
c. pH del medio	10
d. Aditivos nutricionales	10
e. Número de microorganismos	11
f. Dieta del donador	11
g. Control de temperatura	11
h. Agitación	11
<b>F. DIGESTIBILIDAD IN VITRO DE LOS ALIMENTOS</b>	<b>12</b>
1. <u>Predicción de la digestibilidad</u>	13
2. Estudio de la cinética de fermentación	15
<b>III. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u></b>	<b>16</b>
<b>A. LOCALIZACIÓN Y DURACIÓN DEL EXPERIMENTO</b>	<b>16</b>
<b>B. UNIDADES EXPERIMENTALES</b>	<b>16</b>
<b>C. MATERIALES, EQUIPOS E INSTALACIONES</b>	<b>16</b>
1. <u>Materiales</u>	16
2. <u>Equipos</u>	17
3. <u>Reactivos</u>	18
4. <u>Instalaciones</u>	18

<b>D. TRATAMIENTO Y DISEÑO EXPERIMENTAL</b>	19
1. <u>Esquema del experimento</u>	19
<b>E. MEDICIONES EXPERIMENTALES</b>	19
F. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y PRUEBAS DE SIGNIFICANCIA	20
<b>G. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL</b>	20
<b>H. METODOLOGÍA DE LA EVALUACIÓN</b>	21
1. <u>Heno de alfalfa</u>	21
2. <u>Bolsas ANKOM F57</u>	21
3. <u>Líquido ruminal</u>	22
4. <u>Saliva artificial</u>	22
5. <u>Fermentación ruminal</u>	24
6. <u>Producción de gas <i>in vitro</i></u>	25
7. <u>Secado de las muestras</u>	25
8. <u>Digestibilidad de FDN, FDA y lignina</u>	25
9. <u>Análisis proximal</u>	25
<b>IV. <u>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u></b>	26
A. ANÁLISIS PROXIMAL DE LA RACIÓN DE HENO DE ALFALFA	26
B. DIGESTIBILIDAD IN VITRO DE LA FIBRA DETERGENTE NEUTRA (FDN), FIBRA DETERGENTE ÁCIDA (FDA) Y LIGNINA	27
<b>C. PRODUCCIÓN DE GAS RUMINAL</b>	31
D. ANÁLISIS DE LOS GASES PARTICULARES DE LA FERMENTACIÓN (CH <sub>4</sub> Y CO <sub>2</sub> )	36
<b>V. <u>CONCLUSIONES</u></b>	40
<b>VI. <u>RECOMENDACIONES</u></b>	41
<b>VII. <u>LITERATURA CITADA</u></b>	42
<b>ANEXOS</b>	

## RESUMEN

En la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua-México, se evaluó tres tratamientos, T1 tratamiento control, T2 heno de alfalfa más (levadura cepa *Saccharomyces cerevisiae* Ganadero Plus), y T3 heno de alfalfa más (levadura cepa *Saccharomyces cerevisiae* LEVUCCELL SC-10), con seis repeticiones cada tratamiento, se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA) y para las variables que presentaron significancia ( $P < 0,05$ ), se realizó una separación de medias con el estadístico Tukey. Al determinar los resultados en la digestibilidad *in vitro* de la fibra detergente neutra (FDN), fibra detergente ácida (FDA) y lignina, T3 fue reportado como el mejor con 43,68; 39,76 y 0,5 % respectivamente. La producción de gas total se estabilizó a las 25,5 horas, el T3 mostró una menor cantidad de gas ruminal (82,73 ml/500 mg de MS) y en la producción del gas metano y CO<sub>2</sub> obtuvo (29,42 ml/500 mg de MS) y (50,69 ml/500 mg de MS) respectivamente. Por lo que se recomienda utilizar la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, en otro tipo de sustrato como, concentrados y forrajes de alto valor nutritivo, ya que al utilizar en forrajes fibrosos no se logró reducir la cantidad de gas.



## ABSTRACT

In the Animal Science and Ecology Faculty of the Autonomous University of Chihuahua-Mexico, three treatments were evaluated, T1 control treatment, T2 Alfalfa hay plus (yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* GANADERO PLUS) and T3 Alfalfa hay plus (yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* LEVUCCELL SC-10) with six repetitions by treatment. Completely randomized design were used and for the variables that presented significance ( $P < 0,05$ ), a means separation was performed with the TUKEY test. When determine the results, the digestibility in vitro of the neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF) and lignin, T3 was reported as the best with 43.68; 39.76 and 0.5%, respectively. The production of total gas was established to the 25,5 hours, the T3 showed a less amount of ruminal gas (82,73 ml/500mg DM) and in the production of methane gas and CO<sub>2</sub> was obtained (29,42 ml/500mg DM) and (50,69 ml/500mg DM), respectively. Consequently, is recommended to use *Saccharomyces cerevisiae*, in another substrate type such as: concentrates and forage of a high nutritional value due the usage of fibrous forage did not achieve to reduce the gas amount.

**LISTA DE CUADROS**

N°	Pág.
1. ESQUEMA DEL EXPERIMENTO.	19
2. ANÁLISIS PROXIMAL DE LA MUESTRA DE HENO DE ALFALFA.	26
3. DIGESTIBILIDAD IN VITRO DE LA FIBRA DETERGENTE NEUTRA (FDN), FIBRA DETERGENTE ÁCIDA (FDA) Y LIGNINA.	28
4. PRODUCCIÓN DE GAS RUMINAL FINAL DE ACUERDO A LOS TRATAMIENTOS.	32
5. ANÁLISIS DE LOS GASES PARTICULARES DE LA FERMENTACIÓN.	38

**LISTA DE GRÁFICOS**

N°	Pág.
1. Digestibilidad in vitro de la fibra detergente neutra (FDN), fibra detergente ácida (FDA) y lignina.	29
2. Producción de gas ruminal final de acuerdo a los tratamientos.	33
3. Producción de gas del heno de alfalfa de acuerdo a los diferentes tratamientos.	35
4. Producción de gases en la fermentación.	39

## LISTA DE ANEXOS

N°

1. ADEVA para la digestibilidad in vitro de la fibra detergente neutra (FDN), fibra detergente ácida (FDA) y lignina.
2. Medias estimadas para la digestibilidad in vitro de la fibra detergente neutra (FDN), fibra detergente ácida (FDA) y lignina.
3. Comparación de medias con la prueba de TUKEY.
4. ADEVA para la producción de gas total.
5. Medias estimada para la producción de gas total.
6. Comparación de medias según TUKEY.
7. ADEVA para la producción de gas de acuerdo el tiempo.
8. Estimación de las medias para la producción de gas según el tiempo.
9. ADEVA para los gases particulares de la fermentación.
10. Medias estimadas para la producción de gases.
11. Separación de medias según TUKEY.

## **I. INTRODUCCIÓN**

Los procesos ruminales permiten el aprovechamiento de sustratos difíciles de digerir para muchos animales. Tal es el caso de la celulosa y la hemicelulosa (Elghandour, M.*et al.*, 2015).

Sin embargo Puniya, A.*et al.* (2015), manifiesta que la eficiencia de dichos procesos puede ser optimizada con la ayuda de aditivos alimenticios, como los probióticos, que además de mejorar las capacidades digestivas de los huéspedes, también influyen favorablemente en las funciones inmunes de su organismo, mejorando con esto la condición general de los hospederos. Siendo así, se ha estado investigando desde hace algún tiempo el uso de aditivos con microorganismos vivos tanto en la alimentación humana como animal (Williams, N. 2010).

En la actualidad a la dieta animal se está añadiendo los tan llamados probióticos, que se los ha definido como microorganismos vivos que ejercen un efecto benéfico para el tracto intestinal del hospedero, manteniendo y reforzando los mecanismos de defensa ante patógenos sin perturbar las funciones fisiológicas y bioquímicas normales, ya que cada día se están prohibiendo más la utilización de antibióticos, por lo que la adición de levaduras a la ración alimenticia sería de gran ayuda para un mejor aprovechamiento.

Para el sector ganadero y la industria de piensos compuestos, el reto actual es conseguir hacer rentables los sistemas de producción, que no hagan necesario el uso de los antiguos aditivos que podían suponer un riesgo para la salud del consumidor o para el medio ambiente, o conseguir unos efectos semejantes con el uso de productos naturales (Caja, G. *et al.*, 2003).

En correspondencia con la problemática, el objetivo de las investigaciones es evaluar el efecto de levaduras comerciales sobre la fermentación ruminal y la digestibilidad de nutrientes usando un sistema de medición de gas *in vitro*.

Esta investigación permitirá determinar el comportamiento de la digestión así como el grado de digestibilidad de la fibra detergente neutra, ácida y lignina, que nos permita generar información científica para validar el uso de GANADERO PLUS y LEVUCCELL SC-10 en la alimentación de rumiantes.

Además la información obtenida servirá para optimizar los recursos económicos e implementar nuevos programas nutricionales dentro de una explotación ganadera.

Por lo expuesto anteriormente se plantearon los siguientes objetivos:

- Validar las posibles diferencias en la digestibilidad *in vitro* de la fibra detergente neutra (FDN), fibra detergente ácida (FDA) y lignina a través de los tres tratamientos de estudio.
- Analizar las posibles diferencias en la tasa de digestión *in vitro* y cantidad de la fermentación ruminal a través de los tres tratamientos evaluados.
- Estimar las diferencias en la tasa de producción de gases, producto de la fermentación ruminal en los tratamientos de estudio.
- Identificar y cuantificar las posibles diferencias de gas ruminal, que se produce a través de una muestra de heno de alfalfa sola vs dos muestras de heno de alfalfa, adicionadas con dos tipos de levaduras.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### A. ALIMENTOS FUNCIONALES

Según Alvidrez, A.*et al.*, (2002), los alimentos funcionales son aquellos que son procesados y contienen ingredientes que desempeñan una función específica en las funciones fisiológicas del organismo, además de su contenido nutrimental.

Ferrer, L.y Dalmau, S. (2001), reporta que ayudan mejorando la salud y el bienestar y/o reduciendo el riesgo de enfermedad. Pudiendo ser este un alimento natural, que se ha añadido, eliminado o modificado uno o varios de sus componentes o una combinación de cualquiera de estas posibilidades por medios biotecnológicos y al adicionar estos componentes a un alimento, lo transforma en un alimento funcional.

### B. PROBIÓTICOS

Los Probióticos son microorganismos vivos que confieren un beneficio a la salud del huésped cuando es administrado en cantidades adecuadas. Las especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son usadas más frecuentemente como probióticos, pero la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y algunas especies de *E. coli* y *Bacillus* también son utilizadas como probióticos(OMS, 2011).

Según Ferrer, L. y Dalmau, S.(2001), indica que actúan acidificando la luz intestinal, segregando sustancias que inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos, además consumiendo nutrientes específicos o uniéndose competitivamente a los receptores intestinales para mantener la flora intestinal y evitando la acción de gérmenes patógenos. Tienen propiedades que modifican la respuesta a antígenos.

Ademas Ferrer, L. y Dalmau, S.(2001), señala que los probióticos aumentan la actividad de las hidrolasas de las sales biliares que se unen al colesterol y ayudan a su eliminación, por lo que tienen un efecto hipocolesterolémico.

## **1. Probióticos en la alimentación animal**

La prohibición del uso de antibióticos como promotores del crecimiento ha sido un gran reto para la alimentación animal, ya que ha aumentado la necesidad de encontrar métodos alternativos prevenir y controlar la colonización de bacterias patógenas (Frizzoa, L.*et al.*, 2011).

En contraposición a los antibióticos surgieron los probióticos, los cuales pueden ser microorganismos vivos o muertos, o sustancias que contribuyen a mantener un equilibrio ecológico favorable en el intestino y un buen funcionamiento del sistema inmunitario (Guevara, J. 2011).

Guevara, J.(2011), menciona que los probióticos son microorganismos viables que aumentan la ganancia de peso y los rangos de conversión alimenticia (propiedades zootécnicas) y disminuyen la incidencia de diarrea.

### **C. LEVADURAS**

Las levaduras están agrupadas en unas 350 especies (clasificadas a su vez en unos 39 géneros), las levaduras son bastante heterogéneas en su morfología y fisiología; sin embargo su forma habitual se les encuentra es la unicelular, además pueden presentar micelio. Pero todo depende del medio donde se encuentre el microorganismo, independientemente de las condiciones ambientales (García, V. 2002).

La levadura típica tiene forma ovoide pero también hay de varias formas. Cada especie tiene su forma característica, pero en un cultivo puro se puede observar que existe cierta variación en el tamaño y forma de las células, ya que puede variar por la edad del cultivo y del medio donde se encuentra (García, V. 2002).

Las levaduras se han vuelto cada vez más importantes en otro tipo de industrias donde se aprovecha la capacidad que tienen para producir, a partir de desechos



industriales, una gran cantidad de sustancias útiles en la nutrición humana y animal, además el interés por disminuir la contaminación ambiental generada por varias industrias, ha aumentado el interés por estos organismos.

En las fermentaciones naturales y en la elaboración de productos en los que se utilizan procesos de fermentación controlados por el hombre, se puede encontrar una gran variedad de levaduras, pero se cultivan comercialmente solo tres géneros: *Saccharomyces*, *Candida* y *Kluyveromyces*.

La levadura comercial de mayor importancia es la *Saccharomyces cerevisiae*. La mayoría de levaduras que se utilizan para fortificar alimento animal pertenece al género *Candida*. Una de las más utilizadas es la *C. utilis*, la cual puede crecer aeróbicamente en diversos sustratos.

La cepa de levadura más comúnmente empleada es la "*Saccharomyces cerevisiae*". Existen productos a base de levadura viva desecada donde se busca obtener una concentración de células vivas lo más alta posible. Concentraciones de  $10^9$ - $10^{10}$  unidades formadoras de colonia por gramo son las más habituales (Telles, A. 2010).

Los cultivos de levadura desecada son otra alternativa de productos que no proporcionan levadura viva sino los productos de fermentación de dicha levadura sobre un medio vegetal. Estos cultivos de levadura aportan enzimas, y otros metabolitos (aminoácidos y vitaminas) que parecen ser los que realmente producen los efectos positivos cuando, posteriormente, se administran al animal.

## **1. Uso de levaduras en la alimentación animal**

La respuesta a la adición de probióticos en la alimentación animal está influenciada por múltiples factores, se encuentran la dosis utilizada, edad, raza, tipo de explotación, uso de antibióticos, estrés y el ambiente de la crianza. Por esta razón es muy común encontrar respuestas variables al uso de probióticos (Fox, S. 1994).

Hay varios mecanismos propuestos para explicar los efectos positivos de levaduras en el ecosistema ruminal. El primero establece que levadura favorece el desarrollo y la maduración del rumen, lo que ayuda a la creación de la microbiota (Galvao, K. *et al.*, 2005).

La segunda plantea que las levaduras son capaces de estabilizar pH ruminal a través de la interrelación de las bacterias productoras de lactosa (Rossi, F. *et al.*, 2004).

Por último, se refieren al incremento de la degradación de la fibra a través de la interacción de las levaduras con los microorganismos que actúan en la pared celular de plantas (Callaway, T. y Martin, S. 1997).

## **2. Mecanismo de funcionamiento de las levaduras**

Pascual, G. (1998), manifiesta que los aditivos a base de levaduras o cultivo de levaduras actúan a nivel ruminal influenciando la fermentación en los siguientes parámetros:

- Producción de ácidos grasos volátiles.
- Reducción de la producción de metano.
- Disminución de la concentración de amoníaco.
- Favorecen la estabilidad del pH.

Además la microflora ruminal también ejercen influencia a nivel de:

- Aumento de la actividad de la flora celulolítica.
- Aumento de la flora anaerobia total.
- Favorecen la flora.

## **D. LEVADURA SACCHAROMYCES CEREVISIAE**

Es un hongo de tamaño microscópico (5-12 micras), es un organismo unicelular, anaeróbico. Son capaces de actuar en un pH de 2,0 – 8,5 producen ácido glutámico, el cual favorece el consumo de materia seca tanto en rumiantes como en no rumiantes. Este ácido es considerado como el que mejora o estimula el consumo. Es fuente rica de aminoácidos, el 50% del peso seco es proteína, con un 75% de valor biológico (Lisina, Metionina, Triptófano), y 70% digestibilidad. Aportan vitaminas del complejo B y contienen enzimas digestivas (Valdés, Y. *et al.*, 2012).

Sin embargo existen datos como los reportado por Cabrera, E. *et al.*, (2000), mostraron que la *Saccharomyces cerevisiae* no mejoró la degradabilidad de la fibra en novillos mestizos (*Bos taurus* x *Bos indicus*), situación que pudo deberse a que los microorganismos comerciales en ocasiones no están activos ya que se utilizan en polvo (en forma de esporas) y tienden a ser menos eficaces que las presentaciones líquidas (Saxelin, M. *et al.*, 2010).

## **E. METANOGENESIS RUMINAL**

El proceso de metanogénesis en el rumen tiene ciertas particularidades, determinadas por las características fisiológicas de este órgano, que lo distingue de la formación de metano en otros hábitats (Zinder, S. 1992).

Las bacterias metanogénicas ruminales forman parte de un grupo de microorganismos, que llevan a cabo la degradación de los alimentos, al utilizar los productos finales de la hidrólisis de los polímeros para la formación de metano (Demeyer, D. y Fievez, V. 2000).

En la actualidad se llevan a cabo numerosas investigaciones que van desde el estudio de los metanógenos del rumen hasta el análisis de la producción de metano a partir de diferentes dietas (Beauchemin, K. y McGinn, S. 2005).

### **1. Control de la metanogénesis ruminal**

A partir de los últimos 30 años, se han considerado varias estrategias para la inhibición de la metanogénesis (Moss, A. 2002 y Dumitru, R. *et al.*, 2003). Dentro de las más comunes están: incrementos del consumo animal, modificación en la composición de la dieta, eliminación de los protozoos y mejora de la eficiencia de digestión de la fibra (Bandyopadhyay, T. *et al.*, 1996).

Numerosos agentes químicos también son capaces de inhibir la producción de metano (Itabashi, H. *et al.*, 2000) y se han probado como aditivos alimenticios potenciales para rumiantes. Estos incluyen análogos halogenados de metano, antibióticos ionóforos, ácidos grasos insaturados, ácido fumárico y otros compuestos que tienen efectos directos o indirectos en la metanogénesis ruminal. Otro microorganismo utilizado en la dieta de los rumiantes capaz de reducir la metanogénesis ruminal es la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, con el empleo de este aditivo microbiano se observó la disminución de un 20 % de la producción total de metano (Newbold, C. y Rode, L. 2005).

## **2. Factores que influyen en la metanogénesis ruminal**

Moss, A. *et al.*, (2000), indica que algunos factores identificados como modificadores de la metanogénesis son el consumo de MS, tasa de pasaje, la proporción entre el forraje y el concentrado y el procesamiento de los ingredientes.

Existe una relación estrecha entre la metanogénesis ruminal y el consumo de materia seca, ya que en animales con un alto consumo, la metanogénesis ruminal tiende a aumentar; sin embargo, también influyen otros aspectos como las características físico-químicas del alimento, las cuales impactan sobre el consumo y la frecuencia de alimentación, también existe una relación estrecha entre la tasa de pasaje y la metanogénesis. Esto significa que a medida que aumenta la tasa de pasaje, la metanogénesis ruminal disminuye alrededor de un 30%. Por otro lado, la proporción entre forraje y concentrado influye sobre la metanogénesis ruminal. Por ejemplo, la adición del 90% de concentrado a la dieta trae como consecuencia una disminución de 6,86 a 6,22 en el pH ruminal, pH en el que la metanogénesis disminuye. Este efecto se debe posiblemente a la

competencia entre la producción de propionato y la metanogénesis por el H<sub>2</sub> del medio (Zinder, S. 1992).

Por último, procesos tales como la molienda o el peletizado de los ingredientes también influyen de manera negativa sobre la metanogénesis. Esto puede deberse a que el menor tamaño de partícula del alimento promueve una mayor tasa de pasaje y, por lo tanto, menor tiempo para la metanogénesis en el rumen (Johnson, K. 1995).

La adición de levaduras como aditivo en la dieta de los rumiantes tiene efectos favorables sobre la población microbiana y en los indicadores fermentativos ruminales. Por consiguiente, la salud y la productividad de los animales están mejoradas. Hay múltiples productos en el mercado mundial en el que comercial se emplean cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae* como activadores de la fermentación ruminal (Chaucheyras, F.*et al.*, 2008).

Estudios anteriores han informado de que la estimulación de la degradación de la celulosa por cultivo de levadura se asocia con una disminución del tiempo de retardo, lo que resulta en aumento de las tasas iniciales de la digestión, pero no en un aumento de la cantidad de la digestión por microorganismos ruminales (Williams, N.2010).

Williams, N. (2010), reportaron que el cultivo de levadura estimula la digestión DM en el rumen de novillos alimentados con heno de cebada cuando estaba ausente. Ellos atribuyen esta diferencia a una estabilización del pH ruminal por el cultivo de levadura en los animales que recibieron la cebada. En un estudio posterior, Newbold, C.*et al.*, (1998), informaron de que algunos cultivos de levaduras aumentaron el número de bacterias totales y celulolíticas en el rumen y, en algunos casos, el aumento de degradación de la celulosa. También sugirieron que *S. cerevisiae* cultura estimula la tasa en lugar de la extensión de la digestión de la fibra por los microorganismos ruminales.

Se ha sugerido que el aumento de la flora bacteriana en animales alimentados con *Saccharomyces. cerevisiae* es central a la acción de la levadura en el rumen,

y el aumento de la población bacteriana conduce a un aumento tanto de la degradación de la fibra en el rumen y el flujo de proteína microbiana de la rumen (Wallace, R. *et al.*, 1994).

#### **a. Tipo de sustrato**

López, S.*et al.*, (1998), indicaron que los henos de leguminosas se degradan a una tasa más alta que los henos con una alta participación de gramíneas.

Las diferencias en la actividad de los microorganismos desde el rumen de diferentes especies, o de la misma especie pero con diferentes dietas, significa que todas las descripciones de producción de gas deberán describir las condiciones del animal donador (Williams, B. 2000).

#### **b. Tampón empleado**

Los datos de producción de gas serían más fácilmente interpretados si un sistema tampón basado únicamente en bicarbonato o fosfato fuera utilizado. Sin embargo, para lograr un  $\text{pH} > 6$ , una mezcla de bicarbonato-fosfato es necesaria (Pell, A. y Schofield, P. 1993).

#### **c. pH del medio**

Los microorganismos ruminales son muy sensibles a cambios en el pH y la mayoría prefieren un rango de pH entre 6,5 a 6,8. Las bacterias celulolíticas, en particular, son más sensibles a bajos pH que las bacterias amilolíticas (Grant, R. y Mertens, D. 1992).

Hoover, W.*et al.*, (1984), demostró que un pH alto (7,5) o bajo (5,5) severamente compromete la digestión de la fibra.

#### **d. Aditivos nutricionales**

Para evitar que factores no fibrosos limiten la fermentación de la fibra, Grant, R. y Mertens, D. (1992), recomiendan utilizar aditivos nutricionales para asegurar la máxima digestión, especialmente con sustratos bajos en proteína y microminerales.

#### **e. Número de microorganismos**

Aunque los protozoarios hacen una significativa contribución a la digestión de la fibra, su remoción permite que más bacterias colonicen las plantas, cubriendo el nicho anteriormente ocupado por ellos, demostrando que la actividad de los protozoarios y de las bacterias parece ser intercambiable.

Hidayat, C.*et al.*, (1993), señalaron que si todos los nichos de degradación disponibles son colonizados por bacterias o protozoarios, la adición de población complementaria no incrementa la tasa o la extensión de la fermentación.

#### **f. Dieta del donador**

Borba, A.*et al.*, (2000), señalan una posible relación inversa existe entre la producción de gas y el porcentaje de proteína de la dieta del donador.

#### **g. Control de temperatura**

La actividad microbiana, el volumen de gas y las presiones cambian con la temperatura, por lo que está debe estar en 39°C (Schofield,P. 2000).

#### **h. Agitación**

El CO<sub>2</sub> tiene una fuerte tendencia a formar soluciones supersaturadas en medio acuoso. Si esto ocurre, la presión o el volumen obtenidos en las lecturas serán incorrectos. Afortunadamente esta tendencia puede ser reducida por suave agitación ocasional (Schofield,P. 2000).

## F. DIGESTIBILIDAD IN VITRO DE LOS ALIMENTOS

La digestibilidad *in vitro* de los alimentos se ve afectada por numerosos factores, entre los que destacan el tipo de ración, el nivel y pauta de ingestión de los alimentos, la especie animal y el estado fisiológico de los animales (Schneider, B. y Flatt, W. 1975).

De todos los factores relacionados con el tipo de ración administrada a los animales, el efecto de la relación forraje: concentrado ha sido uno de los más estudiados. Así, en experimentos realizados con ganado ovino (Ramanzin, M. *et al.*, 1997), vacuno (Jaakola, S. y Huhtanen, P. 1993), y caprino (Kawas, J. *et al.*, 1991; Ramanzin, M. *et al.*, 1997), se observó que a medida que aumentaba la proporción de concentrado en la ración se producía un aumento paralelo de la digestibilidad *in vitro* de la materia seca (MS) y de la materia orgánica (MO), así como una disminución de la digestibilidad de los componentes de la pared celular.

Jaakola, S. y Huhtanen, P. (1993), observaron que estos efectos eran producidos fundamentalmente por cambios en la digestión en el rumen, mientras que el efecto observado en los tramos posteriores del tracto digestivo era muy pequeño. En relación con este aspecto, Alvir, M. y González, J. (1992), y Giráldez, F. *et al.*, (1994), utilizando la técnica de las bolsas de nylon, observaron que los ritmos de degradación ruminal de diversos alimentos eran más lentos cuando los animales eran alimentados con raciones que incluían concentrado que cuando recibían raciones constituidas exclusivamente por forraje.

La proporción de concentrado en la ración afecta a la digestión ruminal a través de diversos mecanismos, entre los que destacan las modificaciones que produce en el crecimiento y/o actividad de los microorganismos ruminales (Mould, F. 1988).

Debido a que la población microbiana ruminal se ve afectada por numerosos factores, la procedencia del inóculo ruminal se considera la mayor fuente de variación en la determinación de la digestibilidad *in vitro* (Marten, G. y Barnes, R. 1980).



En este sentido, la ración ingerida por los animales empleados como donantes ha sido señalada como uno de los principales factores que afectan al número y actividad de los microorganismos ruminales y que, consecuentemente, pueden afectar a los valores de la DIV de los alimentos (Weiss, W. 1994).

El efecto de la actividad microbiana del inóculo sobre la DIV de los alimentos fuera más acusado en alimentos con un alto contenido en pared celular (forrajes) que en aquellos otros que presentan un menor contenido (concentrados). Los valores de DIV de los concentrados fueron más elevados que los de los forrajes, y no se vieron afectados significativamente ( $P > 0,05$ ) por el tipo de inóculo ruminal empleado.

### **1. Predicción de la digestibilidad**

Se ha demostrado que la producción de gas está relacionada con la desaparición de la FDN (Nsahlai, I. *et al.*, 1995), y al respecto Pell, A. *et al.*, (1997), encontraron que la relación entre ambos conceptos es lineal, con una pendiente marcadamente constante. Igualmente se ha encontrado una alta correlación entre la producción de gas *in vitro* y la disponibilidad del almidón en los granos de cereales (Opatpatanakit, Y. *et al.*, 1994).

De manera alternativa a la desaparición de sustrato, se ha propuesto la medición de la producción acumulada de gas, como indicador del metabolismo del carbono, centrandose su atención en la acumulación de los productos finales de la fermentación:  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$ , y ácidos grasos volátiles (AGV). Este sistema presenta la ventaja de que el producto final que se mide (gas) es resultado directo del metabolismo microbiano, en lugar de registrar la desaparición de sustrato. Una segunda ventaja es que la formación de productos finales de la fermentación, pueden ser monitoreado a intervalos cortos de tiempo y por lo tanto la cinética de fermentación puede ser descrita con precisión (Bruni, M. y Chilbroste, P. 2001).

La mayoría de los procedimientos *in vitro* desarrollados hasta el momento miden la desaparición de sustrato en un punto final de medida. Con el objetivo de obtener sistemas reproducibles y repetibles, se han propuesto sistemas estáticos

y estandarizados. Para el estudio de la digestión ruminal, la mayoría de los sistemas utilizan inóculo microbiano.

La degradación de alimentos por los microorganismos del rumen produce gas. El estudio de la producción del gas de fermentación *in vitro* puede ser utilizado para describir la digestibilidad del forraje y la cinética de la fermentación ruminal de los alimentos. La técnica *in vitro* de Theodoroul, M. *et al.*, (1994), al medir la producción periódica de gas en un solo frasco de fermentación, aparece como una alternativa para reducir la necesidad de los estudios con gran número de muestras, a objeto de medir la cinética de la degradación de un alimento. Se ha demostrado que el método puede estimar la degradabilidad *in vivo* y la digestibilidad aparente de la materia seca de forrajes con bastante precisión (Pulido, R. *et al.*, 1998)

Menke, K. y Steingass, H.(1998), encontraron que la producción de gas acumulada en 24 horas estuvo bien correlacionada con la digestibilidad de la MO determinada *in vivo*. Finalmente, Sileshi, Z.*et al.*, (1996), y López, S.*et al.*, (1998), han reportado significativas correlaciones entre la tasa fraccional de desaparición de la MS *in situ* y la tasa fraccional de producción de gas.

Para predecir la producción de gas *in vitro* se utilizan funciones matemáticas, para cuantificar la relación entre el desarrollo de un organismo, órgano o tejido y el tiempo. France, J. y Thornley, J. (1987), señalan que la selección de un modelo es empírico, escogiéndose la forma de la función que mejor ajuste los datos obtenidos.

La descripción matemática de los perfiles de producción acumulada de gas es una herramienta fundamental, no sólo para comparar substratos o condiciones de fermentación, sino para obtener información de diferentes fracciones nutricionalmente relevantes. Los modelos matemáticos propuestos para modelar la producción de gas han evolucionado desde modelos simples que siguen una cinética de primer orden, a modelos más sofisticados, en los que diferentes procesos pueden ser identificados (Groot, J. *et al.*, 1996).

## **2. Estudio de la cinética de fermentación**

La cinética de producción de gas depende de las proporciones de partículas solubles, insolubles pero degradables, y no degradables del alimento (Getachew, G. *et al.*, 1998).

La cinética de fermentación, pueden ser influenciados por la temperatura y el proceso de secado del sustrato (60 ó 70°C) (Williams, B. 2000; Rosero, J. 2002). La sincronización entre la energía y el nitrógeno suplementados en el rumen es una aproximación para mejorar la eficiencia de la fermentación ruminal. Para aplicar este principio en formulación de alimentos, se necesitan datos sobre las tasas de degradación de las proteínas y de fermentación de los carbohidratos. Las técnicas de producción acumulativa de gas pueden ser usadas para generar esta información (Williams, B. 2000).

Los parámetros de la cinética de fermentación describen la digestión y caracterizan propiedades intrínsecas del alimento, que limitan su disponibilidad para el rumiante, determinan la proporción de los nutrientes consumidos que pueden ser absorbidos y utilizados por el animal y dependen de un activo crecimiento y desarrollo de la población microbiana del rumen. La medición de la producción de gas como una aproximación a la fermentación ruminal no es nueva: McBee, R. (1953), describió un método manométrico para medir la producción de gas generado por una mezcla de bacterias ruminales que posteriormente fue sufriendo diferentes modificaciones.

De acuerdo a cada técnica también se presentan ciertas limitaciones de la técnica de producción de gas, como la solubilidad de los gases en los líquidos, tipo de fermentación, producción de gas indirecta a partir del buffer del medio de cultivo, contenido de N de la muestra, tamaño de partícula, y procesamiento de la muestra (Bruni, M. y Chilbroste, P. 2001).

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **A. LOCALIZACIÓN Y DURACIÓN DEL EXPERIMENTO**

La investigación se realizó en el laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua, ubicada en el km 1 del Periférico Francisco R. Aldama de la Ciudad de Chihuahua del estado de Chihuahua, país de México, a una altitud de 1435 msnm, y una temperatura media anual de 18,2 °C con una precipitación media anual de 387,5 mm<sup>3</sup>. Su localización geográfica es a los 28° 38' latitud Norte y 106° 04' longitud Oeste, en la Ciudad de Chihuahua (INEGI. 2016).

La duración de la investigación fue de 60 días.

#### **B. UNIDADES EXPERIMENTALES**

Se utilizaron 18 módulos de fermentación ANKOM los cuales contenían una bolsa ANKOM F57 con 0,5 g de muestra de heno de alfalfa (BH) y aleatoriamente fueron asignadas a cada uno de los 3 tratamientos motivo del estudio.

#### **C. MATERIALES, EQUIPOS E INSTALACIONES**

Para el estudio se utilizaron los siguientes materiales, equipos e instalaciones entre los que tenemos:

##### **1. Materiales**

- Muestra (heno de alfalfa).
- Levadura cepa *Saccharomyces cerevisiae* GANADERO PLUS.
- Levadura cepa *Saccharomyces cerevisiae* LEVUCCELL SC-10.
- Líquido ruminal.
- Manta de tela.
- Bolsas ANKOM F57.

- Botellas ANKOM (250ml).
- Agua destilada.
- Probetas.
- Micropipetas.
- Vasos de precipitados
- Espátula.
- Hielo.
- Jeringa de insulina.
- Termómetro.
- Termo plástico.
- Matraces.
- Crisoles.
- Pinzas.
- Embudo.
- Toallas desechables.
- Papel filtro.
- Papel aluminio.
- Guantes desechables.
- Mascarilla desechable.

## 2. **Equipos**

- Molino.
- Balanza analítica.
- Balanza electrónica.
- Incubadora Thermo con agitación automática.
- Sistema de medición de producción de gas modelo RFS ANKOM.
- Analizador de fibra semiautomático modelo A200 ANKOM.
- Cromatografía de gases serie 580 (GOW-MAC).
- Analizador de nitrógeno(LECO FP 528).
- Equipo Soxhlet.
- Desecadores.

- Estufa (Thelco).
- Baño maría (Terlab).
- Mufla.
- Placa de agitación y calentamiento.

### 3. Reactivos

- Rezasurina.
- Hidróxido de sodio (1NaOH).
- Sulfato de sodio nonahidratado ( $\text{Na}_9\text{H}_2\text{O}$ ).
- Cloruro de sodio dihidratado ( $\text{CaCl}_2\text{H}_2\text{O}$ ).
- Cloruro manganoso tetrahidratado ( $\text{MnCl}_4\text{H}_2\text{O}$ ).
- Cloruro cobaltoso hexahidratado ( $\text{CoCl}_2\text{6H}_2\text{O}$ ).
- Cloruro férrico hexahidratado ( $\text{FeCl}_3\text{6H}_2\text{O}$ ).
- Bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ).
- Difosfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ).
- Fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ).
- Solución de ácido detergente (ANKOM).
- Solución de ácido neutro (ANKOM).
- Sulfito de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ).
- Alpha- Amylase.
- Acetona ( $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ ).
- Ácidosulfúrico al 72%.
- Éter de petróleo ACS.

### 4. Instalaciones

Se efectuó en las instalaciones del Laboratorio Nutrición Animal de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua.

## D. TRATAMIENTO Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Se evaluaron tres tratamientos, (T1)tratamiento control, (T2)tratamiento heno de alfalfa mas levadura cepa *Saccharomyces cerevisiae*(GANADERO PLUS),y (T3) tratamiento con heno de alfalfa mas levadura cepa *Saccharomyces cerevisiae*(LEVUCCELL SC-10). Dentro del esquema del experimento se utilizó el diseño completamente al azar, para el análisis de la información se empleó el siguiente modelo lineal:

$$Y_{ij} = u + a_i + e_{ij}$$

$Y_{ijk}$  = Valor del parámetro en determinación.

$u$  = Valor de la media general.

$a_i$  = Efecto de los tratamientos.

$e_{ij}$  = Efecto del error experimental.

### 1. Esquema del experimento

El esquema del experimento se da a conocer en el cuadro 1.

Cuadro 1. ESQUEMA DEL EXPERIMENTO.

Tratamiento	Código	Repeticiones	T.U.E.	Total
Testigo	T1	6	1	6
GANADERO PLUS	T2	6	1	6
LEVUCCELL SC-10	T3	6	1	6
Total				18

\*T.U.E.: Tamaño de unidad experimental.

## E. MEDICIONES EXPERIMENTALES

Las mediciones experimentales consideradas en la investigación fueron las siguientes:

- Análisis proximal de la muestra de heno de alfalfa.
- Determinación *invitro* de la digestibilidad de fibra detergente neutra, ácida y lignina.
- Medición de la cantidad y la tasa de producción de gas.
- Análisis de los gases particulares de la fermentación (CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>).

## F. ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y PRUEBAS DE SIGNIFICANCIA

Los resultados experimentales fueron sometidos a las siguientes técnicas estadísticas:

- Análisis de la Varianza (ADEVA), utilizando el software estadístico IBM SPSS v21.
- Se utilizó el estadístico Tukey, a un nivel de significancia ( $P > 0,01$ ) y ( $P < 0,05$ ) para la separación de medias.

## G. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Zootecnia y Ecología de la Universidad Autónoma de Chihuahua México. Se aplicó la técnica de producción de gas *in vitro* (pgiv), se utilizó una muestra de heno de alfalfa, que se molió hasta un tamaño de partícula de 1 mm. De la muestra molida 0,5 g fueron colocados en una bolsa ANKOM F57, sellada, posteriormente colocada en una unidad de fermentación ANKOM de 250 ml, donde se incubó para medir tasa de producción de gas y digestión.

Los tratamientos fueron: un control (T1), basado en heno de alfalfa sin adición de ningún tipo de levaduras, (T2) basado en heno de alfalfa más levadura “GANADERO PLUS”, levaduras vivas (*Saccharomyces cerevisiae*) con una concentración de células de  $2 \times 10^9$  UFC/g inoculándose en dosis de 0,040 g/ botella y (T3) consistió de heno de alfalfa mas levadura “LEVUCCELL SC-10” (T3) a base de levaduras vivas (*Saccharomyces cerevisiae*) a una concentración de



células de  $10 \times 10^9$  UFC/g inoculándose en dosis de 0,0026 g/botella. La inoculación de las levaduras se realizó con la finalidad de igualar la concentración de UFC de las botellas de fermentación ANKOM. Cada tratamiento fue repetido 6 veces como unidad de fermentación individual.

El líquido ruminal fue recolectado de dos vacas fistuladas ruminalmente, alimentadas con una ración a base de heno de alfalfa, el líquido ruminal se filtró a través de una tela de manta y dos litros fueron colocados en un termo y llevados al laboratorio para el uso inmediato, donde se les agregó cuatro litros de solución buffer y de esta mezcla se colocarán 200ml en cada unidad de fermentación

Las unidades de fermentación ANKOM fueron incubadas a  $39^\circ\text{C}$  con agitación y las mediciones inalámbricas de gas fueron registradas cada 30 minutos por 72 horas en una base de datos. Cumplido el tiempo se suspendió la fermentación removiendo los módulos de la incubadora y extrayendo con jeringa de insulina un ml de gas producto de la fermentación e inyectado el gas en el cromatógrafo Gow-Mac para la determinación de metano y dióxido de carbono.

Posteriormente las bolsas ANKOM fueron removidas y secadas para calcular desaparición de materia seca y proceder al análisis del contenido de fibra detergente neutra (FDN), fibra detergente ácida (FDA) y lignina y después calcular la tasa de digestión *in vitro*.

## **H. METODOLOGÍA DE LA EVALUACIÓN**

### **1. Heno de alfalfa**

De las pacas de heno de alfalfa se extrajo una muestra de aproximadamente 500 g, que se molió a un tamaño de partícula de 1 mm y fue guardada herméticamente.

### **2. Bolsas ANKOM F57**

Se utilizaron 18 bolsas ANKOM F57, que primero fueron codificadas y llenadas con 0,5 g de muestra de heno alfalfa y selladas.

La cantidad de material requerido para evaluar la cinética de fermentación varía desde 0,1 a 1 g (Williams, B. 2000). Con un aumento en el tamaño de la muestra se produce una disminución en la producción de gas por cada gramo de MS, debido a la baja proporción de microorganismos en relación al sustrato o al agotamiento del tampón (Getachew, G. *et al.*, 1998).

### **3. Líquido ruminal**

El líquido ruminal fue recolectado de dos vacas fistuladas, que fueron alimentadas 7 días antes de la recolección con heno de alfalfa y agua *ad libitum*. El líquido ruminal fue recolectado por la mañana, ya que los microorganismos son menos activos pero más consistentes en su composición y actividad (Menke, K. y Steingass, H. 1998).

Se debe considerar que para la recolección el termo debe estar a una temperatura semejante a la del interior del animal es decir 37°C, también que se debe ocupar con la mayor brevedad posible, razón por la cual se recolectó 15 minutos antes de iniciar la prueba. Para esta investigación se necesitaron dos litros de líquido ruminal.

### **4. Saliva artificial**

La técnica de producción de gas al igual que otros procedimientos de digestibilidad usan sustratos molidos, medio anaeróbico, temperatura de 39°C e inóculo ruminal (Williams, B. 2000).

Todos los medios en uso tienen en común tampón de bicarbonato y fosfato, un agente reductor, una fuente de nitrógeno, varios minerales, y resazurina como indicador de potencial redox. En todos los casos, el CO<sub>2</sub> es usado durante la preparación del medio para asegurar un bajo potencial redox al momento de la

inoculación, ya que la ausencia de anaerobiosis resulta en pérdidas de bacterias celulolíticas y amilolíticas (Williams, B. 2000).

Grant, R. y Mertens, D. (1992), indican que el gaseo continuo con CO<sub>2</sub> y los agentes reductores promueven un menor tiempo de colonización y una más rápida digestión de la FDN.

El medio ruminal se preparó de acuerdo a la técnica de Menke, K. y Steingass, H. (1988). El medio ruminal *in vitro*, contiene:

- Amortiguador de bicarbonato de fosfato.
- Agente reductor.
- Una fuente de N.
- Minerales.
- Rezasurina.

Entonces se preparó:

- Solución A (micromineral).

Mineral	Cantidad (100 ml)
CaCl <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O	13,2 g
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	10,0 g
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	1,0 g
FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	8,0 g
Agua destilada	100ml (aforar)

- Solución B (amortiguadora).

Reactivo	Cantidad
NaHCO <sub>3</sub>	39,0 g
Agua destilada	1 L (aforar)

- Solución C (macromineral).

Mineral	Cantidad
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5,7 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,2 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	0,6 g
Agua destilada	1L (aforar)

- Solución de Rezasurina.

Reactivo	Cantidad
Rezasurina	100 mg
Agua destilada	100 ml (aforar)

- Solución Reductora.

Mineral	Cantidad
1NaOH	4,0 ml
NaS <sub>9</sub> H <sub>2</sub> O	625 mg
Agua destilada	100 ml (aforar)

La solución A, B, C y rezasurina se agregó dentro de un matraz con agua destilada y se aforo, introduciéndolo a un baño maría a 39°C (Terlab), posteriormente se agregó la solución reductora y se burbujeo con CO<sub>2</sub> a toda la mezcla hasta que el color se torne de azul a rosa y finalmente transparente. Para realizar la mezcla de la saliva con el líquido ruminal se lo realizo en una relación 2:1, por lo que se preparó 4 litros de saliva artificial y 2 litros de líquido ruminal para obtener una cantidad adecuada.

## 5. Fermentación ruminal

Los 18 módulos de unidad de fermentación fueron llevados hacia la incubadora Shaker Thermo, con agitación automática, en donde permanecieron por 72 horas, con una temperatura de 39°C y con agitaciones constantes. El mismo equipo tiene un sensor inalámbrico el cual registró los datos en una computadora, datos que se obtuvieron cada 30 minutos durante las 72 horas, que fueron guardados automáticamente por el sistema.

## **6. Producción de gas metano y bióxido de carbono *in vitro***

El procedimiento de producción de gas metano y bióxido de carbono *in vitro* (PGIV), se realizó de acuerdo a la técnica de Menke, K. y Steingass, H. (1988). Cada unidad o módulo de fermentación fue adaptado al inicio del experimento con una válvula, para la introducción de una jeringa de insulina con la que se recolectó el gas producto de la fermentación al término del periodo de 72 horas, inyectado inmediatamente en el cromatógrafo de gases GOW-MAC (serie 580) para cuantificar la cantidad particular de los gases en cuestión producidos. Las cantidades obtenidas se guardaron en la base de datos de la computadora del equipo de cromatografía.

## **7. Secado de las muestras**

El secado de las muestras se lo realizó en una estufa a 55 – 60°C de temperatura.

## **8. Digestibilidad de FDN, FDA y lignina**

La FDN, así como la FDA fueron medidas por medio de los métodos descritos por Van Soest, P. *et al.*, (1991), utilizando un digestor de fibras ANKOM®. Fibra detergente neutra con  $\alpha$ -amilasa (FDN), fibra detergente ácido (FDA), y lignina detergente ácido con ácido sulfúrico (ADL SA).

## **9. Análisis proximal**

Este tipo de análisis nos indica el contenido de humedad, proteína cruda, fibra cruda, lípidos, ceniza y extracto libre de nitrógeno en la muestra, según las técnicas descritas por el AOAC. (2003).

#### **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

##### **A. ANÁLISIS PROXIMAL DE LA RACIÓN DE HENO DE ALFALFA**

El análisis proximal del heno de alfalfa se puede observar detalladamente en el cuadro 2.

Cuadro 2. ANÁLISIS PROXIMAL DE LA MUESTRA DE HENO DE ALFALFA.

Variable	Heno de alfalfa
Humedad, %	3,06
Materia seca, %	96,94
Proteína, %	15,04
Grasa, %	0,64
Fibra, %	46,12
Cenizas, %	7,83

PANNAR. (2010), reportó un contenido de materia seca del heno de alfalfa de 90,7 %, humedad 9,30 % y proteína 21,11 %, el contenido de proteína que reporta este autor es más alto en comparación a la presente investigación, posiblemente se deba a la variedad de alfalfa utilizada, el estado fenológico de la planta, el manejo de las misma, al igual que (Jaurena, G.*et al.* 1993), quien reporta un contenido de humedad del 16,75 %, materia seca 83,25 %, proteína 15,89 %, cenizas 10,32 %, fibra 39,22 %.

Guevara, H. (2000), estudió el valor nutritivo de la alfalfa en diferentes estados fenológicos, determinando que a medida que aumenta la edad de la alfalfa el contenido de proteína disminuyó de 25,30 % antes de la aparición de yemas florales hasta 18,20 % en la floración, al comparar este valor con la investigación identificamos que la alfalfa utilizada se encontraba en un estadofenológico tardío.

El contenido de fibra en la alfalfa se comporta de manera inversa, a medida que aumenta la edad de la alfalfa, el contenido de fibra aumenta, desde un 22,10 % antes de la aparición de yemas florales hasta 29,40 % en la floración, estos valores son inferiores al reportado en nuestra investigación posiblemente a que la alfalfa fue cosechada en un estado fenológico postfloración.

López, K. (1998), realizó un análisis proximal de la alfalfa en diferentes edades, desde los 46 hasta los 76 días. El análisis de la proteína determinó contenidos desde un 24 % a los 46 días de edad hasta 19,44 % a los 76 días, por lo que podemos observar que el contenido de proteína disminuye a medida que la edad aumenta, en la presente investigación es inferior a estos valores probablemente debido a que la alfalfa era mucho más madura. El extracto etéreo se comporta de manera similar a medida que aumenta la edad de la planta el contenido de grasa disminuye desde 2,23 % a los 46 días hasta 1,25 % a los 76 días, en esta investigación el porcentaje reportado es menor posiblemente al estado de madurez de la planta. El contenido de fibra en la alfalfa se comporta de manera inversa a lo anteriormente reportado, es así, que a medida que la edad de la planta aumenta el contenido de fibra en la alfalfa también aumenta desde un 25,72 % a los 46 días hasta un 30,70 % a los 76 días de evaluación, de igual manera estos datos son inferiores a los reportados en esta investigación posiblemente por la madurez de la alfalfa al momento de su corte.

En estudios de la alfalfa en pre floración (Almaraz, I. *et al.*, 2012), determinó un mayor contenido de humedad (11,2 %), cenizas (10,9 %); proteína (21,9 %), en comparación con los resultados obtenidos en la investigación, probablemente se deba a que la alfalfa utilizada se encontraba en un estado de pre floración, en comparación con el heno de alfalfa utilizado en esta investigación.

## **B. DIGESTIBILIDAD IN VITRO DE LA FIBRA DETERGENTE NEUTRA (FDN), FIBRA DETERGENTE ÁCIDA (FDA) Y LIGNINA**

La digestibilidad in vitro de la fibra detergente neutra (FDN), de la fibra detergente ácida (FDA) y de la lignina no presentaron diferencias significativas ( $P > 0,05$ ), por

efecto de los tratamientos (cuadro 3), obteniendo una digestibilidad in vitro (T1) de 43,88 % de FDN, 39,84 % de FDA, y 0,50 % para la lignina (gráfico 1).



Cuadro 3. DIGESTIBILIDAD IN VITRO DE LA FIBRA DETERGENTE NEUTRA (FDN), FIBRA DETERGENTE ÁCIDA (FDA) Y LIGNINA.

Variables	Tratamientos			E.E.	Probabilidad
	T1	T2	T3		
FDA, %	39,84 a	39,33 a	39,76 a	0,19	0,53
FDN, %	43,88 a	43,55 a	43,68 a	0,20	0,79
Lignina, %	0,50 a	0,51 a	0,50 a	0,23	0,60

E.E.: Error Estándar.

Probabilidad > 0,05, no existen diferencias estadísticas (ns).

Probabilidad < 0,05, existen diferencias significativas (\*).

Probabilidad < 0,01, existen diferencias altamente significativas (\*\*).

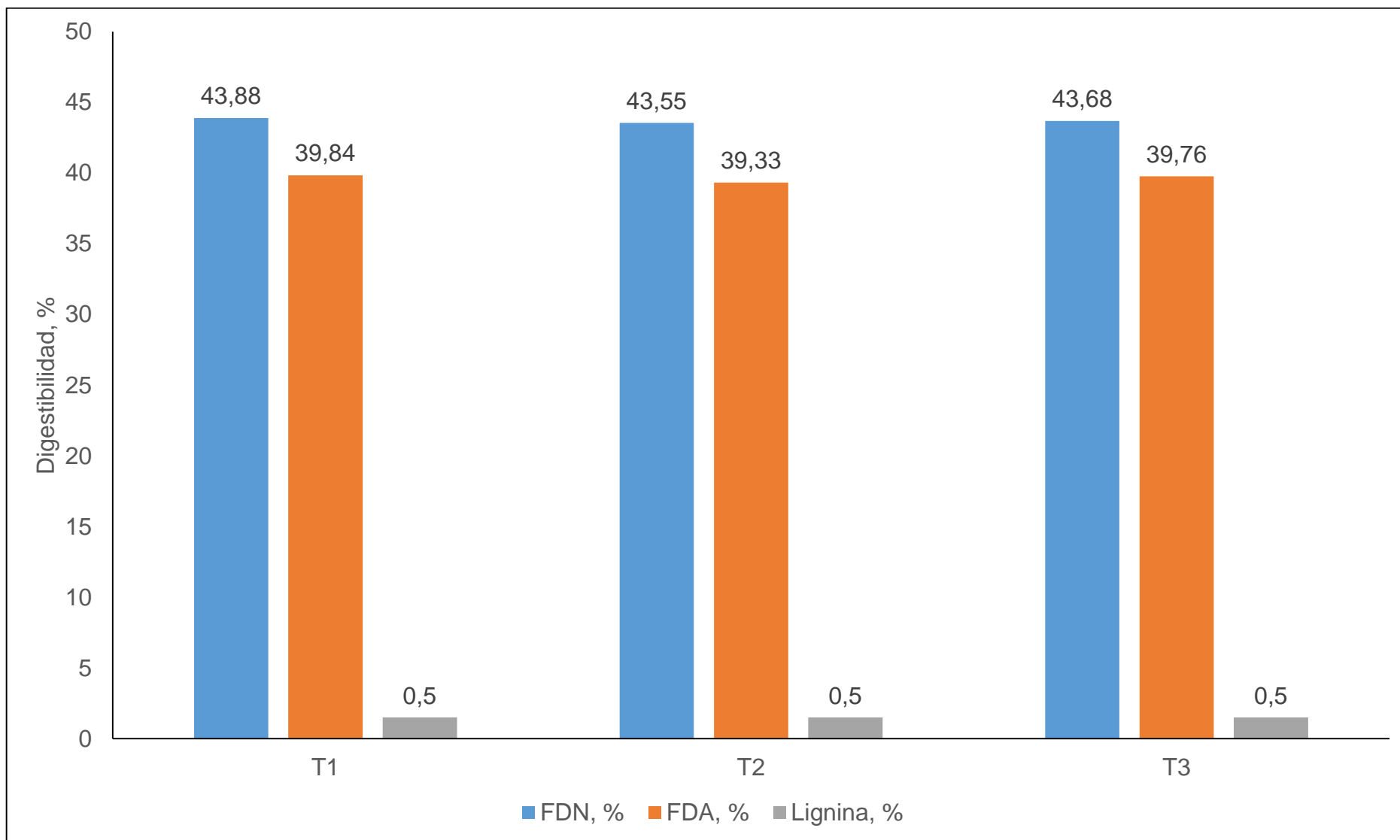


Gráfico 1. Digestibilidad in vitro de la fibra detergente neutra (FDN), fibra detergente ácida (FDA) y lignina.

Estos datos contrastan con lo presentado por BIOTECAP. (2015), quien manifiesta que el uso de Ganadero Plus incrementa la tasa de degradación de la celulosa, al igual a lo manifestado por LALLEMAND. (2010), quien demuestra que el LEVUCCELL SC 10, estimula la actividad celulolítica. Rojo, R. *et al.*, (2000), no encontró diferencias significativas en la digestibilidad de la FDN al adicionar cultivos de levaduras, resultados que relacionaron con una reducción en el pH ruminal el cual deprimió el crecimiento de las bacterias celulolíticas. En otros estudios (Mir, Z. y Mir, P. 1994), evaluaron el efecto de *Saccharomyces cerevisiae* en dietas con altos niveles de forraje y grano, en la digestibilidad de la FDN y de la FDA; no hubo efecto del cultivo microbiano para las dietas que contenían niveles altos de forraje, pero sí para las dietas de granos, lo cual fue asociado a un pH ruminal más estable. Es importante mencionar que las mejores respuestas con cultivo de levadura se han obtenido cuando las dietas contienen forrajes de buena calidad

Serna, O. (2010), estudió la madurez del heno de alfalfa en la producción de gas *in vitro* y en la degradabilidad ruminal de la fibra y proteína, reportando una mayor digestibilidad de la FDN en la época de inicio al verano 53,54 % y una menor digestibilidad en otoño 44,96 %; estas valores son superiores a los reportados en esta investigación, posiblemente a que la alfalfa utilizada en esta investigación fue madura.

Serna, O. (2010), también estudió la digestibilidad *in vitro* de la FDN, de acuerdo a diferentes días de corte, obteniendo una digestibilidad de la FDN a los 0 días de 56,91 %; ésta digestibilidad se reducía conforme la edad de la planta aumentaba por lo que a los 20 días de corte la digestibilidad de la FDN fue 47,97 %; estos valores siguen siendo superiores a los reportados en la investigación, posiblemente a lo manifestado por Muro, R. (2007), quien menciona que la altura de la alfalfa está relacionada con la madurez, además de correlaciones positivas entre la altura con la FDN.

Hoffman, P. (2007), reporta la digestibilidad *in vitro* de forrajes y subproductos alimenticios, obteniendo una digestibilidad de la FDN del heno de alfalfa desde un

44,2% hasta 55,4 % a las 48 horas, estos valores son superiores a los aquí reportados, posiblemente debido al estado fenológico de la alfalfa.

Varios estudios señalan que el estímulo de las bacterias ruminales dependen del tipo de dieta y cepa de levadura, por ejemplo el *Saccharomyces cerevisiae*, es más utilizado en dietas 50:50 de forraje con concentrado y en dietas altas en granos (Lyons, T. 1998).

### C. PRODUCCIÓN DE GAS RUMINAL

El análisis de la producción de gas ruminal, presentaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ), por efecto de los tratamientos (cuadro 4), obteniendo una mayor producción de gas ruminal para (T1) 99,03 ml / 500 mg MS, seguido del (T2) 94,62 ml/500 mg MS y finalmente la menor producción de gas ruminal lo obtuvo(T3) 82,73 ml/500 mg MS (gráfico 2). Zaragoza, C. (2001), al recopilar información de 11 trabajos donde se mide el efecto de la levadura únicamente dos trabajos muestran efectos significativos, pero cabe señalar que estos trabajos se utilizó dietas altas en granos.

La producción de gas ruminal se vio afectada por los tratamientos, es así que (T1) presentó mayores niveles de gas ruminal junto con (T2) en comparación (T3), probablemente debido al tipo del sustrato utilizado, que en este caso es el heno de alfalfa, ya que como lo manifiesta Fiems, L. (1993), los efectos de las levaduras dependen de muchos factores internos (raza, dieta) y externos (medio ambiente). Incluso Marrero, Y. *et al.*, (2015), explica la influencia de las diferentes cepas de levadura, de la dieta y del medio ambiente del rumen, por lo que recomienda muy bien analizar la cepa adecuada en toda producción.

Marrero, Y. *et al.*, (2015), evaluó la producción de gas in vitro de tres levaduras *Candida tropicalis*, *Candida norvegensis* y *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando como sustrato la alfalfa, durante esta experimentación las levaduras del género *Candida* mostraron mejores producciones de gas 89,72 y 109,46 ml respectivamente, en comparación con la *Saccharomyces cerevisiae* 71,75 ml; estos datos son mayores respecto a los valores reportados en nuestra investigación, este autor atribuye las diferentes

respuestas de producción de gas a la prevalencia de una población sobre otra en el rumen, ya que estos producen

Cuadro 4. PRODUCCIÓN DE GAS RUMINAL FINAL DE ACUERDO A LOS TRATAMIENTOS.

Variable	Tratamientos			E.E.	Probabilidad
	T1	T2	T3		
Producción de gas total, (ml / 500 mg MS)	99,03 a	94,62 ab	82,73 b	2,42	0,02

E.E.: Error estándar.

Probabilidad > 0,05, No existen diferencias estadísticas (ns).

Probabilidad < 0,05, existen diferencias significativas (\*).

Probabilidad < 0,01, existen diferencias altamente significativas (\*\*).

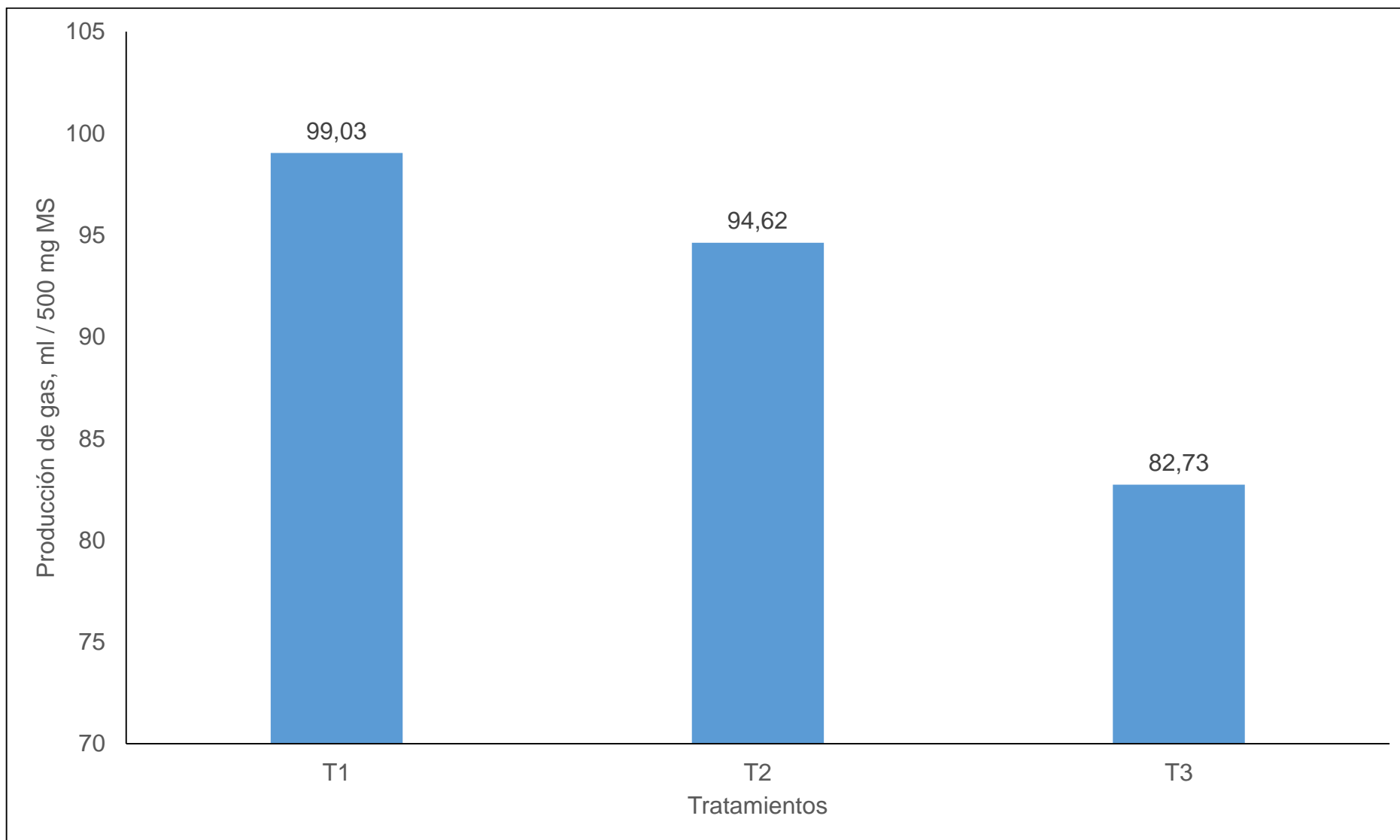


Gráfico 2. Producción de gas ruminal final de acuerdo a los tratamientos.

cambios en la respuesta de las levaduras probablemente debido a la especificidad de su acción, ya que esta experimentación se realizó con una alfalfa que contenía un mayor contenido de proteína (18,02 %) y mayor contenido de extracto etéreo (2,02 %).

Siempre se debe tener en cuenta que las levaduras tienen una acción directa sobre la degradación de los alimentos que llega al rumen y que la acción de cualquier levadura trabaja a través de la estimulación de determinadas poblaciones microbianas y como la dieta de la microbiota define el tipo que se instala en el ecosistema, por lo tanto se debe esperar respuestas variables al incluir levaduras en diferentes dietas (Marrero, Y. *et al.*, 2015).

En estudios de la alfalfa en pre floración Almaraz, I. *et al.*, (2012), obtuvo 219,6 ml de producción de gas, sin embargo este autor utilizó inóculo ruminal de borregos alimentados con ensilado de maíz y un suplemento comercial, estos datos son superiores respecto al presente estudio, posiblemente debido a que los concentrados presentan mayor cantidad de nutrientes.

Marrero, Y. *et al.*, (2014), al estudiar la producción de gas *in vitro* de sustratos fibrosos con la inclusión de levaduras, concluye que la especie y cepa de levaduras, así como su dosis de inclusión, tienen efecto determinante en la producción de gas *in vitro* de diferentes sustratos fibrosos, lo que reafirma la importancia de seleccionar las cepas adecuadas para su utilización como aditivo en dietas para rumiantes, de acuerdo con el alimento que se desee utilizar.

Pinos, J. (1999), estudió el uso de cultivos de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*), en la alimentación de vacas lecheras, concluyendo que los niveles de gas tienden a incrementarse por efecto de los cultivos de levaduras, cuando las dietas utilizadas tienen un nivel alto de concentrado, pero disminuyen cuando la dieta tienen una mayor proporción de forraje.

La producción de gas ruminal, presentó diferencias altamente significativas ( $P < 0,01$ ), por efecto del tiempo (gráfico 3).



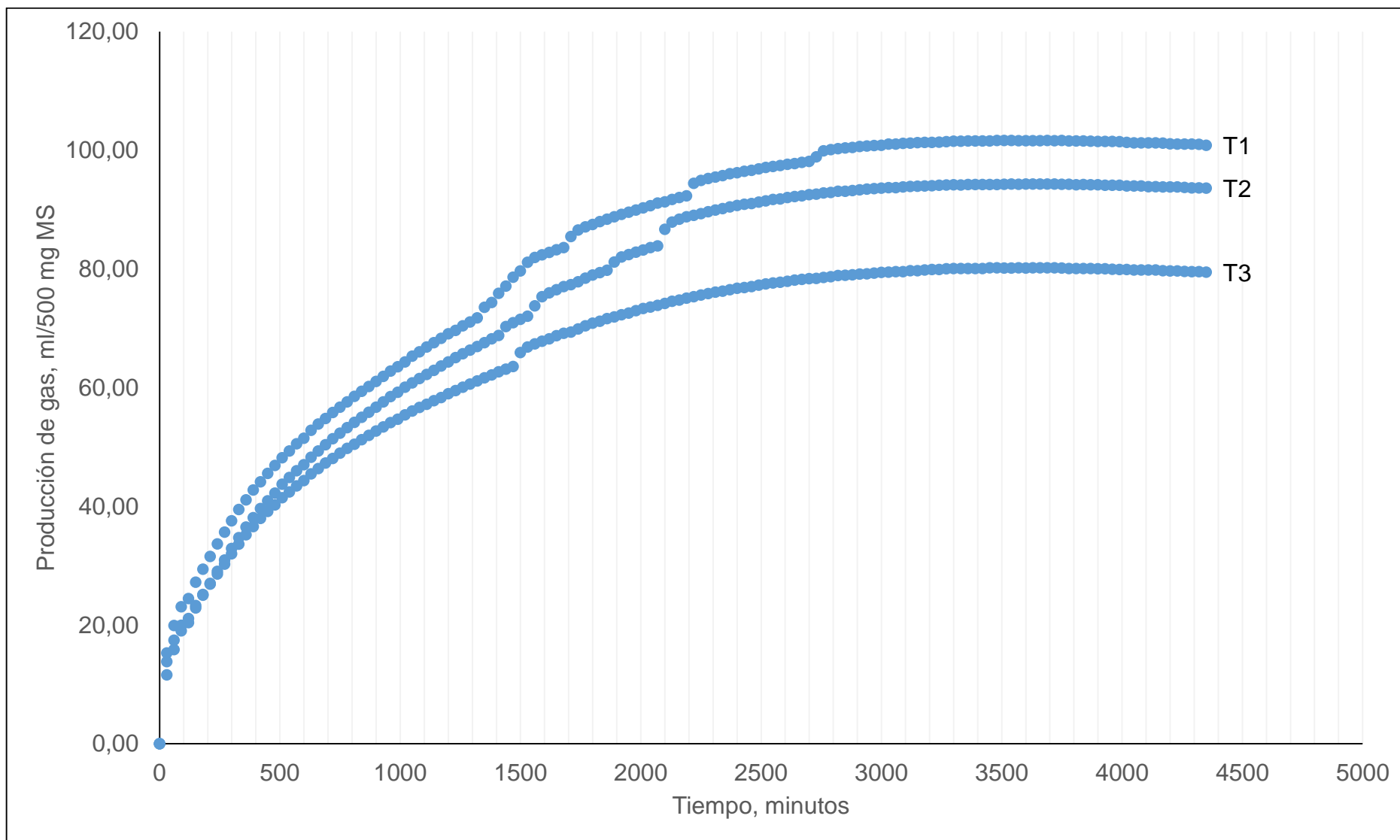


Gráfico 3. Producción de gas del heno de alfalfa de acuerdo a los diferentes tratamientos.

La producción de gas ruminal presentó diferencias hasta los 1530 minutos (25,5 h), a partir de este momento la producción se estabilizó, lo que difiere con lo expresado por BIOTECAP. (2015), quienes manifiestan que el cultivo de levadura Ganadero Plus tiene una vida útil de 48 horas.

#### **D. ANÁLISIS DE LOS GASES PARTICULARES DE LA FERMENTACIÓN (CH<sub>4</sub> Y CO<sub>2</sub>)**

El análisis de la cantidad de dióxido de carbono presentó diferencias altamente significativas ( $P < 0,01$ ), por efecto de los tratamientos, siendo superior (T1) con 63,60 ml/500mg de MS, seguido (T2) con 57,38 ml/500mg de MS y por último (T3) con 50,69 ml/500mg de MS (cuadro 5). Mientras que para el metano no presentó diferencias ( $P > 0,01$ ), entre tratamientos, estos datos se pueden observar de mejor manera en el gráfico 4.

Estos datos contrastan con lo manifestado por BIOTECAP. (2015), quienes manifiestan que el uso de Ganadero Plus reduce la emisión de metano, al igual que lo manifestado por LALLEMAND. (2010), quien declara que el LEVUCCELL SC 10, reduce las emisiones de metano.

La reducción de metano es una de las partes más importantes de la presente investigación ya que en términos de energía constituye una pérdida y en términos ambientales contribuye al calentamiento y al cambio climático global, en este caso la producción de metano no presentó diferencias lo que concuerda con lo manifestado por Bonilla, J. y Lemus, C. (2012), quienes propone la utilización de forrajes de alta calidad, alta proporción de granos en la dieta, el uso de aditivos, modificación de las prácticas de alimentación y suplementación de dietas basadas en pajas, para reducir las emisiones de metano por partes de los rumiantes.

Lobón, A. (2015), estudió la emisión de metano de la alfalfa in vitro, reportando 29,6 ml/g de MS; este valor es inferior para el (T1),(T2) y superior para el (T3), esto se debe posiblemente al tiempo de incubación, ya que este autor incubó la muestra durante 24 horas mientras que en esta investigación la producción de gas se estabilizó a las 25,5 horas.

Vargas, J., *et al.*, (2014), evaluó la producción de metano de varias mezclas de leguminosas y gramíneas, reportando una producción de la mezcla kikuyo y trébol en una proporción 90:10 (61,00 ml/g de MS), 70:30 (54,10 ml/g de MS), 50:50 (53,30 ml/g de MS); de la mezcla kikuyo y lotus en la proporción 90:10 (53,60 ml/g de MS), 70:30 (48,80 ml/g de MS), 50:50 (45,50 ml/g de MS); en la mezcla ray grass y trébol 90:10 (46,80 ml/g de MS), 70:30 (49,30 ml/g de MS), 50:50 (48,70 ml/g de MS); y de la mezcla ray grass lotus 90:10 (46,80 ml/g de MS), 70:30 (47,40 ml/g de MS), 50:50 (48,20 ml/g de MS). Al comparar la producción de metano de la alfalfa frente a la investigación, observamos que esta es inferior frente a todas las combinaciones de kikuyo, ray grass, trébol y lotus reportadas por Vargas, J., *et al.*, (2014), esto está en relación también a la producción total de gas la cual fue también inferior.

El uso de levaduras como aditivos para mejorar la eficiencia alimenticia, el comportamiento productivo y la salud animal se ha venido incrementado a través de los años; sin embargo, existe poca información del efecto de las levaduras sobre los mecanismos de transferencia del hidrógeno y sobre la metanogénesis. En estudios previos no se ha encontrado efecto de la adición de *Saccharomyces cerevisiae* sobre la producción de CH<sub>4</sub>, siendo sólo 3 % menor en los animales que recibieron la levadura, respecto al testigo, estos datos concuerdan con los reportados en esta investigación. En otros estudios al evaluar tres aditivos comerciales de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*), sobre la producción de CH<sub>4</sub> in vitro a 72h, usando alfalfa como sustrato, no se encontró diferencia estadísticas (P>0,05) entre los tres tratamientos respecto al testigo en la producción de CH<sub>4</sub>, concluyendo que la utilización únicamente de forraje como sustrato, las levaduras no tuvieron efecto sobre la producción de CH<sub>4</sub>, aunque esto pudo deberse a la dosis usada y a la cepa de levadura (Bonilla, J y Lemus, C. 2012).

Cuadro 5. ANÁLISIS DE LOS GASES PARTICULARES DE LA FERMENTACIÓN.

Variables	Tratamientos			E.E.	Probabilidad
	T1	T2	T3		
CH <sub>4</sub> , ml/500 mg MS	34,67 a	36,1 a	29,42 a	0,74	0,11
CO <sub>2</sub> , ml/500 mg MS	63,68 a	57,38 ab	50,69 b	0,74	0,01

E.E.: Error estándar.

Probabilidad > 0,05, No existen diferencias estadísticas (ns).

Probabilidad < 0,05, existen diferencias significativas (\*).

Probabilidad < 0,01, existen diferencias altamente significativas (\*\*).

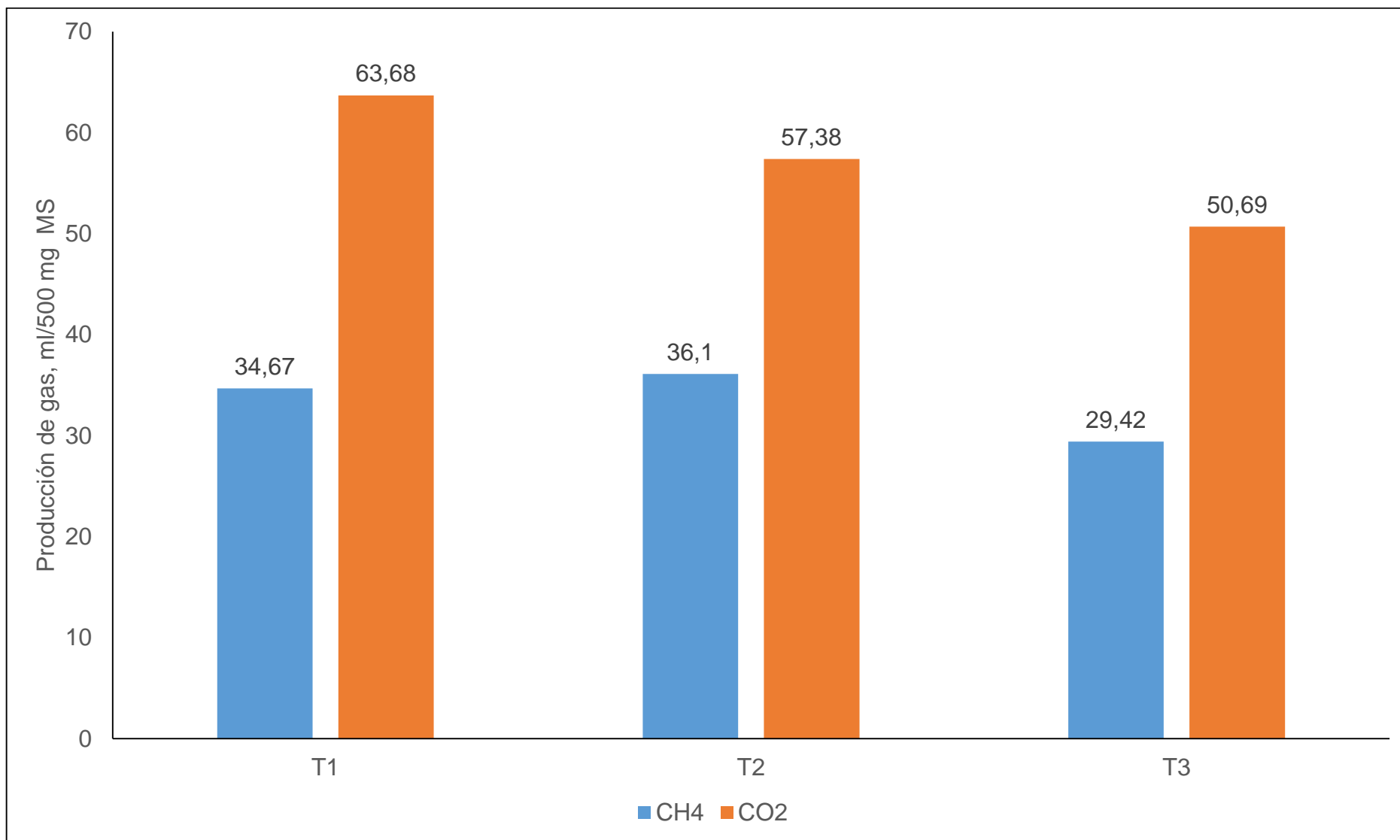


Gráfico 4. Producción de gases en la fermentación.

## V. CONCLUSIONES

En base a los resultados alcanzados en la presente investigación podemos llegar a las siguientes conclusiones:

- Al evaluar la digestibilidad in vitro de la fibra detergente neutra (FDN), fibra detergente ácida (FDA) y lignina de los diferentes tratamientos no se reportaron diferencias significativas, obteniendo un porcentaje de digestibilidad (T1) para la FDA de 39,84 %, FDN 43,88 % y de la lignina 0,50 %.
- Al evaluar la fermentación ruminal de los diferentes tratamientos se encontró que (T1) produjo más gas 99,03ml/ 500mg MS; seguido (T2) con 94,62 ml/500mg MS y finalmente (T3) produjo menos gas 82,73 ml/500mg MS.
- Al analizar las diferencias en la tasa de producción de gases, producto de la fermentación ruminal en los tres tratamientos, se presentaron diferencias significativas hasta los 1530 minutos, después de este tiempo la producción de gas se estabilizó.
- Los gases producidos por la fermentación (metano y dióxido de carbono), no presentaron diferencias significativas, en relación al porcentaje presente en cada tratamiento, sin embargo al evaluar la cantidad de gas producido se encontró diferencias en el CO<sub>2</sub> (T1) produjo 63,69 ml/500 mg MS, seguido (T2) 57,38 ml/500 mg MS y por último (T3) 50,69 ml/500 mg MS; la cantidad de metano producida no reportaron diferencias significativas.

## VI. RECOMENDACIONES

- La Levadura *Saccharomyces cerevisiae* puede utilizarse en otro tipo de sustrato como, concentrados y forrajes de alto valor nutritivo
- Realizar estudios de fermentación y digestibilidad *in vitro* con inóculos de otros rumiantes (ovinos, caprinos, etc.).
- Realizar pruebas de fermentación y digestibilidad *in vitro* con las mismas condiciones de esta investigación pero en diferentes estados fenológicos de la alfalfa.

## VII. LITERATURA CITADA

1. ALMARAZ, I. LOSADA, H. CORTÉS, J. VARGAS, J. MIRANDA, L. Y SÁNCHEZ, J. (2012). Producción de gas in vitro de desechos de verduras usados para alimentar vacas lecheras. *Lives Res Rural Develop*, 24(8).
2. ALVÍDREZ, A. GONZÁLEZ, B. Y JIMÉNEZ, Z. 2003. Tendencias en la producción de alimentos: alimentos funcionales. Disponible en: [http://www.respyn.uanl.mx/iii/3/ensayos/alimentos\\_funcionales.html](http://www.respyn.uanl.mx/iii/3/ensayos/alimentos_funcionales.html).
3. ALVIR, M. Y J. GONZÁLEZ. 1992. Efecto de la relación forraje-concentrado de la ración sobre la degradabilidad ruminal de las materias nitrogenadas de cuatro henos. *Investigación Agraria: Producción y Sanidad Animales*. pp 21 - 29.
4. AOAC. 2003. *Official methods of analysis*. 17th ed. Association of Official Analytical Chemists. Arlington. Virginia, E.U.A.
5. BANDYOPADHYAY, T. GOYAL, P. Y SINGH, M. 1996. Generation of methane from paddy fields and cattle in India, and its reduction at source. *Atmospheric Environment*. pp 30 – 39.
6. BEAUCHEMIN, K. Y MCGINN, S. 2006. Methane emissions from beef cattle: Effects of fumaric acid, essential oil, and canola oil. *J. Animal Science*. pp 84 – 1489.
7. BONILLA, J. Y LEMUS, C. 2012. Emisión de metano entérico por rumiantes y su contribución al calentamiento global y al cambio climático: Revisión. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*. pp 215 - 246.
8. BORBA, A. GONÇALVES, P. VOUZELA, F. REGO, O. Y BORBA, A. 2000 Effect of donor feeding in the use of alternative sources of inocula in the



prevision of digestibility by the gas production method. Revista Portuguesa de Zootecnia. pp 43 – 50.

9. BRUNI, M. Y CHILIBROSTE, P. (2001). Artículo Invitado: Simulación de la digestión ruminal por el método de la producción de gas. Archivos Latino Americanos de Production Animal. pp 43 - 51.
10. CABRERA, E. MENDOZA, I. ARANDA, C. GARCIA, G. BARCENA, G. Y RAMOS, A. 2000. *Saccharomyces cerevisiae* and nitrogenous supplementation in growing steers grazing tropical pastures. Anim. Feed. Sci. and Tech. pp 49-55.
11. CAJA, G. GONZÁLEZ, C. FLORES, E. ALBANELL, Y. Y CARRO, M. 2003 Alternativas a los antibióticos de uso alimentario en rumiantes: Probióticos, Enzimas y Ácidos Orgánicos” Disponible en: [nutriciondebovinos.com.ar/.../Alternativas\\_a\\_los\\_antibióticos\\_de\\_uso\\_alimentario\\_en\\_rumiantes](http://nutriciondebovinos.com.ar/.../Alternativas_a_los_antibióticos_de_uso_alimentario_en_rumiantes).
12. CALLAWAY, T. Y MARTIN, S. 1997. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose. Journal of Dairy Science. pp 2035 - 2044.
13. CHAUCHEYRAS, F. WALKER, N. Y BACH, A. 2008. Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: Past, present and future. Animal Feed Science and Technology. pp 5 – 14.
14. DEMEYER, D. Y FIEVEZ, V. 2000. Ruminants et environnement: la méthanogenèse. Animal. Zotech. pp 49 – 95.
15. DUMITRU, R. PALENCIA, H. SCHROEDER, S. DEMONTIGNY, B. TAKACS, J. RASCHE, M. MINER, J. Y RAGSDALE, S. 2003. Targeting methanopterin biosynthesis to inhibit methanogenesis. Applied and Environmental Microbiology. pp 69 – 7236.

16. ELGHANDOUR, M. SALEM, J. CASTAÑEDA, L. CAMACHO, A. KHOLIF, Y. CHAGOYÁN, A. 2015. Direct-fed microbes: A tool for improving the utilization of low quality roughages in ruminants. *Journal of Integrative Agriculture*. pp 526 - 533.
17. FERRER, L. Y DALMAU, S. (2001). Alimentos funcionales: probióticos. *Acta Pediátrica Española*. pp 150 – 155.
18. FOX, S. 1994. “Probióticos en la nutrición animal”. *Mundo Porcino* - No 17 Enero y Febrero de 1994. pp 28 - 32.
19. FRANCE, J. Y THORNLEY, J. 1987. Growth functions. In: J. France, and J.H.M. Thornley (Ed.). *Mathematical Models in Agriculture*. Butterworth, London. pp 75 - 94.
20. FRIZZOA, L. ZBRUNA, M. SOTOA, L. Y SIGNORINIB, M. 2011. Effects of probiotics on growth performance in young calves: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Association of Official Analytical Chemists*. pp 147 - 156.
21. GALVAO, K. SANTOS, J. COSCIONI, A. VILLASEÑOR, M. SISCHO, W. BERGE, A. 2005. Effect of feeding live yeast products to calves with failure of passive transfer on performance and patterns of antibiotic resistance in fecal *Escherichia coli*. *Reproduction Nutrition Development*. pp 40 - 49.
22. GARCÍA, V. 2002. “Introducción a la microbiología” 2ª ed. pp 116 - 117. Disponible en: [https://books.google.com.mx/books?id=K\\_ETVnqnMZIC&pg=PA108&dq=que+son+las+levaduras&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiA9LSe99\\_PAhVJ34MKHY8eAlwQ6AEIGzAA#v=onepage&q=que%20son%20las%20levaduras&f=false](https://books.google.com.mx/books?id=K_ETVnqnMZIC&pg=PA108&dq=que+son+las+levaduras&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiA9LSe99_PAhVJ34MKHY8eAlwQ6AEIGzAA#v=onepage&q=que%20son%20las%20levaduras&f=false).

23. GETACHEW, G. BLÜMMEL, M. MAKKAR, H. Y BECKER, K. 1998. In vitro measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Animal Feed Science and Technology*. pp 261 - 281.
24. GIRÁLDEZ, F. MANTECÓN, M. CHASO, A. Y MANSO, T. 1994. Efecto del tipo de dieta y de la frecuencia de alimentación sobre la actividad degradativa ruminal. *Investigación Agraria: Producción y Sanidad Animales*. pp 245 – 259.
25. GRANT, R. Y MERTENS, D. 1992. Development of buffer systems for pH control and evaluation of pH effects on fiber digestion in vitro. *Journal of Dairy Science*. pp 1581-1587.
26. GROOT, J. CONE J. WILLIAMS, B. DEBERSAQUES, F.Y LATINGA, E. 1996. Multiphasic analysis of gas production kinetics for in vitro fermentation of ruminant feeds. *Animal feed Science and technology*. pp 77 - 89.
27. GUEVARA, H. 2000. Valor Nutritivo de la Alfalfa (*Medicago Sativa*) con Diferentes Estados Fenológicos en Ovinos. Tesis de grado. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
28. GUEVARA, J. 2011. Probióticos En Nutrición Animal. Sistema de Revisiones En Investigación Veterinaria de San Marcos. Disponible en: [http://veterinaria.unmsm.edu.pe/files/Articulo\\_guevara\\_probioticos.pdf](http://veterinaria.unmsm.edu.pe/files/Articulo_guevara_probioticos.pdf).
29. HIDAYAT, C. HILLMAN, K. NEWBOLD, C. Y STEWART, C. 1993. The contributions of bacteria and protozoa to ruminal forage fermentation in vitro, as determined by microbial gas production. *Animal Feed Science and Technology*. pp 193 – 208.

30. HOOVER, W. KINCAID, C. VARGA, G. THAYNE, W. Y JUNKINS, L. 1984. Effects of solids and liquid flows on fermentation in continuous culture. IV. PH and dilution rate. *Journal of Animal Science*.p 692.
31. INEGI. 2016. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Sistema para la Consulta del Anuario Estadístico del Estado de Chihuahua.
32. ITABASHI, H. BAYARU, E. KANDA, S. NISHIDA, T. ANDO, S. ISHIDA, M. ITOH, T. ISOBE, Y. Y NAGARA, K. 2000. Effect of fumaric acid on methane production, rumen fermentation and digestibility in cattle. The 3rd Joint Symposium of Japan and Korea on Rumen Metabolism and Physiology. pp 11 - 72.
33. JAAKOLA, S. Y HUHTANEN, P. 1993. The effects of forage preservation method and proportion of concentrate on nitrogen digestion and rumen fermentation in cattle. *Grass and Forage Science*. pp 146 - 154.
34. JAURENA, S. VIDART, Y. Y DANELON, J. 1993. Tablas de composición de forrajes de la Región pampeana Suplementación de vacunos. CREA, Cuaderno de Actualización Técnica N° 53. pp 81 - 91.
35. JOHNSON, K. 1995. Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*. pp 2483 - 2492.
36. KAWAS, J. LOPES, D. Y LU, C. 1991. Influence of forage to concentrate ratio on intake, digestibility, chewing and milk production in dairy cows. *Small Ruminant Research*. pp11-18.
37. LOBÓN, A. MOLINO, G. LEGUA, A. ESEVERRI, A. CÉSPEDES, M. Y JOY, T. (2015). Efecto del forraje y de la inclusión de concentrado en la dieta sobre la producción de gas y metano en ovino. *Sociedad Española para el Estudio de los Pastos*.

38. LÓPEZ, S. CARRO, M. GONZÁLEZ, J. Y OVEJERO, F. 1998. Comparison of different in vitro and in situ methods to estimate the extent and rate of degradation of hays in the rumen. *Animal Feed Science and Technology*. pp 99 - 113.
39. LOPEZ. K. 1998. Digestibilidad in vivo de la alfalfa (*Medicago sativa*) a diferente edad en ovinos y efecto del tiempo de corte en la producción. Tesis de grado. Facultad de Ciencias Pecuarias, ESPOCH. Riobamba, Ecuador.
40. MARTEN, G. Y BARNES, F. 1980. Prediction of energy digestibility of forages with in vitro rumen fermentation and fungal enzyme systems. In: W.J. Pidgen, CC Balch, M. Graham (Eds.). *Standardization of Analytical Methodology for Feeds*. IDRC. Ottawa, Canada. pp 61 - 71.
41. MCBEE, R. 1953. Manometric method for evaluation of microbial activity in the rumen with application to utilization of cellulose and hemicelluloses. *Applied microbiology*. pp 106-110.
42. MENKE, K. Y STEINGASS, H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Animal Research Development*. pp 7 – 55.
43. MIR, Z. Y MIR, P. 1994. 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. *Journal of Animal Science*. p 72.
44. MOSS, A. 2002. Environmental control of methane production by ruminants. En: *Greenhouse gases and animal agriculture*. Takahashi, J. & Young, B.A. Eds. Elsevier, Amsterdam. The Netherlands. p 67.
45. MOSS, A. JOUNANY, A. Y NEEWBOLD, J. 2000. Methane production by ruminants: Its contribution to global warming. *Animal Zootech*. pp 231 - 253.

46. MOULD, F. 1988. Associative effects of feeds. In: Orskov, E.R. (Ed). Feed Science. Elsevier. Amsterdam. pp 279 - 292.
47. MURO, R. 2007. Cinética de degradación ruminal de tres fuentes de forraje mediante la técnica de digestibilidad in vitro por producción de gas. Tesis de doctorado. Chihuahua: Universidad Autónoma de Chihuahua.
48. NEWBOLD, C. MCINTOSH, F. WALLACE, R. 1998. Changes in the microbial population of a rumensimulating fermenter in response to yeast culture. Canada. Journal Animal Science. pp 241-244.
49. NEWBOLD, C. Y RODE, L. 2005. Dietary additives to control methanogenesis in the rumen. 2nd International Conference on Greenhouse gases and Animal Agriculture. Soliva, C.R., Takahashi, J. & Kreuzer, M. Eds. Publication Series, Institute of animal Science, ETH Zurich, Switzerland. p 60.
50. NS AHLAI, I. UMUNNA, N. Y NEGASSA, D. 1995. The effect of multi purpose tree digesta on in vitro gas production from napier grass or neutral detergent fibre. Journal of the Science of Food and Agriculture. pp 519 – 528.
51. OPATPATANAKIT, Y. KELLAWAY, R. LEAN, I. ANNISON, G. Y KIRBY, A. 1994. Microbial fermentation of cereal grains in vitro. Australian. Journal of Agricultural Research. pp 1247 - 1263.
52. PANNAR, 2010. Tabla de composición de alimentos y requerimientos nutricionales de novillos en engorde. Disponible en: [http://www.pannar.com.ar/downloads/tabla\\_novillos.pdf](http://www.pannar.com.ar/downloads/tabla_novillos.pdf).

53. PASCUAL, G. 1998. Utilización de aditivos en piensos para rumiantes: minerales forma orgánica, levaduras, enzimas, ionóforos y otros. Alianza Editorial. pp 173 – 194.
54. PELL, A. DOANE, P. Y SCHOFIELD, P. 1997. In vitro digestibility and gas production. In: Simpósio sobre Tópicos Especiais em Zootecnia, Lavras. pp 109 - 132.
55. PELL, A. Y SCHOFIELD, P. 1993. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion in vitro. *Journal of Dairy Science*. pp 1063 - 1073.
56. PINOS, J. GONZÁLEZ, S. Y COBOS, M. (1999). Análisis retrospectivo del uso de cultivos de levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) en vacas lecheras.
57. PULIDO, R. WOOD, C. Y LEAVER, J. (1998). Estudio de la cinética de la fermentación in vitro y del residuo no fermentado del forraje disponible en la pradera y del aparentemente consumido por vacas lecheras. *Archivos de medicina veterinaria*. pp 101 - 107.
58. PUNIYA, A. SALEM, S. KUMAR, S. DAGAR, G. GRIFFITH, M. PUNIYA, A. Y KUMAR, R. 2015. Role of live microbial feed supplements with reference to anaerobic fungi in ruminant productivity. *Journal of Integrative Agriculture*. pp 550 - 560.
59. RAMANZIN, M. BAILONI, A. Y SCHIAVON, S. 1997. Effect of forage to concentrate ration on comparative digestion in sheep, goats and fallon deer. *Animal Science*. pp 163 - 170.
60. ROJO, R., MENDOZA, G., GARCÍA, C., BÁRCENA, J., Y ARANDA, E. (2000). Consumo y digestibilidad de pastos tropicales en toretes con suplementación nitrogenada y *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista de la Facultad de Agronomía*. p 17.

61. ROSERO, J. 2002. Estudio químico, "in situ", "in vitro" e microscópico da parede celular de cinco genótipos de sorgo colhidos em três épocas de corte. Ph. D. Thesis. Belo Horizonte: Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. p 148.
62. ROSSI, F. LUCCIA, A. VICENTI, D. Y COCCONCELLI, P. 2004. Effects of peptidic fractions from *Saccharomyces cerevisiae* culture on growth and metabolism of the ruminal bacteria *Megasphaera elsdenii*. *Animal Research*. pp 177 - 186.
63. SAXELIN, M. LASSIG, H. KARJALAINEN, S. TYNKKYNEN, A. SURAKKA, H. VAPAATALO Y K. HATAKKA. 2010. Persistence of probiotic strains in the gastrointestinal tract when administered as capsules, yoghurt, or cheese. *International Journal of Food Microbiology*. pp 293 - 300.
64. SCHNEIDER, B. Y FLATT, W. 1975. The Evaluation of Feeds Through Digestibility Experiments. The University of Georgia Press Athens.
65. SCHOFIELD, P. 2000. Gas Production Methods. In: *Farm Animal Metabolism and Nutrition*. Wallingford (UK). CAB International. p 450.
66. SERNA, O. 2010. La madurez del heno de alfalfa en la producción de gas in vitro y en la degradabilidad ruminal de la fibra y proteína. Tesis de Maestría. Chihuahua: Universidad Autónoma de Chihuahua.
67. SILESHI, Z. OWEN, E. DHANOA, M. Y THEODOROU, M. 1996. Prediction of in situ rumen dry matter disappearance of Ethiopian forages from an in vitro gas production technique using a pressure transducer, chemical analyses or in vitro digestibility. *Animal Feed Science and Technology*. pp 73 - 87.
68. TELLES, A. 2010. Evaluación de un sistema de Alimentación para vacas lecheras en período de transición, en el centro de Investigación Santa María, de la Universidad de La Salle, en Sopó Cundinamarca.



69. THEODOROU, M. WILLIAMS, M. DHANOA, A.D.B. MCALLAN, J. FRANCE. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds, *Animal Feed ScienceTechnology*. pp 185-197.
70. VALDÉS, Y. AGUILERA, J. BARRERAS, A. ESTRADA, A. GÓMEZ, A. PLASCENCIA, A. Y TORRENTERA, N. (2011). Comportamiento del crecimiento y características de la canal de novillas en lote seco alimentadas con diferentes niveles de levadura viva enriquecida con cromo o con clorhidrato de zilpaterol. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. p 361.
71. VAN SOEST, P., Robertson, J. y Lewis, A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*. pp 3568-3597.
72. VARGAS, J. PABÓN, M. Y CARULLA, J. (2014). Producción de metano in vitro en mezcla de gramíneas-leguminosas del trópico alto colombiano. *Archivos de zootecnia*. pp 397 - 407.
73. WALLACE, R. ARTHAUD, L. Y NEWBOLD, J. 1994. Influence of *Yucca schidigera* extract on ruminal ammonia concentrations and ruminal microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*. pp 762 – 1767.
74. WEISS, W. 1994. Estimation of digestibility of forages by laboratory methods. In: G.C. Fahey (ed.). *Forage Quality, Evaluation and Utilization*. American Society of Agronomy, Inc. Madison, Wisconsin, USA. pp 644 - 681.
75. WILLIAMS, B. 2000. Cumulative gas-production techniques for forage evaluation. In: Givens D I, Owen E, Omed H M and Axford R F E

(editors). Forage Evaluation in Ruminant Nutrition. Wallingford (UK). CAB International. p 475.

76. WILLIAMS, N. 2010. Probiotics. American Journal of Health-System Pharmacy. pp 449 - 458.
77. ZINDER, S. 1992. Methanogenesis. Encyclopedia of Microbiology, Lederberg, J. Ed. Academic Press, San Diego, vol 3. p 81.

**ANEXOS**

**Anexo 1. ADEVA para la digestibilidad in vitro de la fibra detergente neutra (FDN), fibra detergente ácida (FDA) y lignina**

Origen		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
tratamientos	FDA	,897	2	,448	,655	,534
	FDN	,331	2	,166	,243	,787
	Lignina	,986	2	,493	,525	,602
Error	FDA	10,263	15	,684		
	FDN	10,209	15	,681		
	Lignina	14,070	15	,938		
Total	FDA	28300,175	18			
	FDN	34385,360	18			
	Lignina	45692,671	18			

**Anexo 2. Medias estimadas para la digestibilidad in vitro de la fibra detergente neutra (FDN), fibra detergente ácida (FDA) y lignina**

Variable dependiente	Media	Error típ.	Intervalo de confianza 95%	
			Límite inferior	Límite superior
FDA	39,644	,195	39,228	40,059
FDN	43,700	,194	43,286	44,115
Lignina	50,375	,228	49,888	50,862

### Anexo 3. Comparación de medias con la prueba de TUKEY

Variable dependiente			Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
						Límite inferior	Límite superior
FDA	0	1	0,51	0,48	0,55	-0,73	1,75
		2	0,09	0,48	0,98	-1,15	1,33
	1	0	-0,51	0,48	0,55	-1,75	0,73
		2	-0,42	0,48	0,66	-1,66	0,82
	2	0	-0,09	0,48	0,98	-1,33	1,15
		1	0,42	0,48	0,66	-0,82	1,66
FDN	0	1	0,33	0,48	0,77	-0,91	1,57
		2	0,20	0,48	0,91	-1,04	1,44
	1	0	-0,33	0,48	0,77	-1,57	0,91
		2	-0,13	0,48	0,96	-1,37	1,11
	2	0	-0,20	0,48	0,91	-1,44	1,04
		1	0,13	0,48	0,96	-1,11	1,37
Lignina	0	1	-0,46	0,56	0,70	-1,91	1,00
		2	0,07	0,56	0,99	-1,38	1,53
	1	0	0,46	0,56	0,70	-1,00	1,91
		2	0,53	0,56	0,62	-0,92	1,98
	2	0	-0,07	0,56	0,99	-1,53	1,38
		1	-0,53	0,56	0,62	-1,98	0,92

#### Anexo 4. ADEVA para la producción de gas total

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tratamiento	1510,541	2	755,270	4,482	0,02
Error	4886,801	29	168,510		
Total	280541,692	32			

#### Anexo 5. Medias estimada para la producción de gas total

Tratamiento	Media	Error típ.	Intervalo de confianza 95%	
			Límite inferior	Límite superior
1,00	99,027	3,747	91,362	106,691
2,00	94,624	4,105	86,228	103,019
3,00	82,731	4,105	74,335	91,126

#### Anexo 6. Comparación de medias según TUKEY

(I) Tratamiento		Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1,00	2,00	4,4031	5,55820	,711	-9,3237	18,1299
	3,00	16,2959*	5,55820	,017	2,5691	30,0227
2,00	1,00	-4,4031	5,55820	,711	-18,1299	9,3237
	3,00	11,8929	5,80535	,119	-2,4443	26,2300
3,00	1,00	-16,2959*	5,55820	,017	-30,0227	-2,5691
	2,00	-11,8929	5,80535	,119	-26,2300	2,4443

## ANEXO 7. ADEVA para la producción de gas de acuerdo el tiempo

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Tratamientos	1858,092	2	929,046	338,290	,000
Tiempos	22027,705	145	151,915	55,316	0,000
Tratamientos * Tiempos	339,612	290	1,171	,426	1,000
Error	4410,555	1606	2,746		
Total	297748,471	2044			

## Anexo 8. Estimación de las medias para la producción de gas según el tiempo

Tiempos	Media	Error típ.	Intervalo de confianza 99%	
			Límite inferior	Límite superior
0	0,00	0,45	-1,15	1,15
30	2,07	0,45	0,92	3,22
60	2,71	0,45	1,56	3,86
90	3,16	0,45	2,01	4,31
120	3,36	0,45	2,21	4,50
150	3,74	0,45	2,59	4,88
180	4,05	0,45	2,90	5,20
210	4,35	0,45	3,20	5,50
240	4,65	0,45	3,50	5,79
270	4,93	0,45	3,78	6,08
300	5,21	0,45	4,07	6,36
330	5,49	0,45	4,34	6,63
360	5,74	0,45	4,59	6,89
390	5,98	0,45	4,83	7,13
420	6,19	0,45	5,05	7,34
450	6,40	0,45	5,25	7,54
480	6,58	0,45	5,44	7,73
510	6,79	0,45	5,64	7,94
540	6,95	0,45	5,80	8,10
570	7,12	0,45	5,97	8,27
600	7,27	0,45	6,12	8,42
630	7,46	0,45	6,31	8,61
660	7,61	0,45	6,46	8,76
690	7,76	0,45	6,61	8,91
720	7,90	0,45	6,75	9,05
750	8,04	0,45	6,90	9,19
780	8,17	0,45	7,02	9,32

810	8,30	0,45	7,16	9,45
840	8,43	0,45	7,28	9,58
870	8,55	0,45	7,40	9,70
900	8,68	0,45	7,53	9,82
930	8,80	0,45	7,65	9,95
960	8,93	0,45	7,78	10,07
990	9,03	0,45	7,88	10,18
1020	9,15	0,45	8,00	10,30
1050	9,27	0,45	8,12	10,42
1080	9,38	0,45	8,23	10,52
1110	9,48	0,45	8,33	10,63
1140	9,58	0,45	8,44	10,73
1170	9,68	0,45	8,54	10,83
1200	9,79	0,45	8,64	10,94
1230	9,89	0,45	8,74	11,03
1260	9,99	0,45	8,84	11,13
1290	10,08	0,45	8,93	11,22
1320	10,17	0,45	9,02	11,32
1350	10,32	0,45	9,17	11,47
1380	10,42	0,45	9,27	11,57
1410	10,55	0,45	9,40	11,70
1440	10,72	0,45	9,57	11,86
1470	10,85	0,45	9,70	11,99
1500	11,05	0,45	9,90	12,20
1530	11,20	0,45	10,05	12,35
1560	11,36	0,45	10,21	12,50
1590	11,48	0,45	10,33	12,62
1620	11,55	0,45	10,40	12,70
1650	11,63	0,45	10,48	12,78
1680	11,70	0,45	10,55	12,85
1710	11,82	0,45	10,67	12,97
1740	11,92	0,45	10,78	13,07
1770	12,01	0,45	10,86	13,16
1800	12,08	0,45	10,93	13,23
1830	12,14	0,45	10,99	13,29
1860	12,20	0,45	11,06	13,35
1890	12,31	0,45	11,16	13,46
1920	12,39	0,45	11,24	13,54
1950	12,45	0,45	11,30	13,60
1980	12,51	0,45	11,36	13,66
2010	12,56	0,45	11,41	13,71
2040	12,61	0,45	11,47	13,76
2070	12,67	0,45	11,52	13,81
2100	12,84	0,45	11,69	13,99
2130	12,94	0,45	11,79	14,08
2160	12,99	0,45	11,84	14,14



2190	13,04	0,45	11,89	14,19
2220	13,17	0,45	12,02	14,32
2250	13,22	0,45	12,08	14,37
2280	13,27	0,45	12,12	14,42
2310	13,31	0,45	12,16	14,46
2340	13,34	0,45	12,19	14,49
2370	13,39	0,45	12,24	14,54
2400	13,42	0,45	12,27	14,57
2430	13,45	0,45	12,30	14,60
2460	13,47	0,45	12,32	14,62
2490	13,51	0,45	12,36	14,66
2520	13,54	0,45	12,39	14,69
2550	13,57	0,45	12,42	14,72
2580	13,59	0,45	12,44	14,74
2610	13,62	0,45	12,47	14,77
2640	13,64	0,45	12,49	14,79
2670	13,67	0,45	12,52	14,82
2700	13,69	0,45	12,54	14,84
2730	13,74	0,45	12,59	14,89
2760	13,81	0,45	12,66	14,96
2790	13,83	0,45	12,68	14,98
2820	13,86	0,45	12,71	15,01
2850	13,87	0,45	12,72	15,01
2880	13,88	0,45	12,73	15,03
2910	13,90	0,45	12,75	15,05
2940	13,91	0,45	12,77	15,06
2970	13,93	0,45	12,78	15,08
3000	13,94	0,45	12,79	15,09
3030	13,96	0,45	12,81	15,11
3060	13,96	0,45	12,81	15,11
3090	13,97	0,45	12,82	15,12
3120	13,99	0,45	12,84	15,14
3150	13,99	0,45	12,85	15,14
3180	14,01	0,45	12,86	15,15
3210	14,01	0,45	12,86	15,16
3240	14,02	0,45	12,87	15,16
3270	14,03	0,45	12,88	15,18
3300	14,04	0,45	12,89	15,19
3330	14,03	0,45	12,89	15,18
3360	14,04	0,45	12,89	15,19
3390	14,04	0,45	12,89	15,19
3420	14,04	0,45	12,89	15,19
3450	14,05	0,45	12,90	15,20
3480	14,05	0,45	12,90	15,20
3510	14,05	0,45	12,90	15,20
3540	14,05	0,45	12,91	15,20

3570	14,05	0,45	12,90	15,20
3600	14,05	0,45	12,90	15,20
3630	14,06	0,45	12,91	15,20
3660	14,06	0,45	12,91	15,20
3690	14,06	0,45	12,91	15,21
3720	14,06	0,45	12,91	15,20
3750	14,05	0,45	12,90	15,20
3780	14,04	0,45	12,90	15,19
3810	14,04	0,45	12,89	15,19
3840	14,04	0,45	12,89	15,19
3870	14,04	0,45	12,89	15,19
3900	14,03	0,45	12,88	15,18
3930	14,03	0,45	12,88	15,18
3960	14,02	0,45	12,88	15,17
3990	14,02	0,45	12,87	15,17
4020	14,01	0,45	12,86	15,16
4050	14,00	0,45	12,85	15,15
4080	14,00	0,45	12,85	15,15
4110	13,99	0,45	12,84	15,14
4140	13,99	0,45	12,84	15,14
4170	13,98	0,45	12,83	15,13
4200	13,97	0,45	12,83	15,12
4230	13,97	0,45	12,82	15,12
4260	13,97	0,45	12,82	15,12
4290	13,96	0,45	12,81	15,11
4320	13,96	0,45	12,81	15,10
4350	13,94	0,45	12,80	15,09

---

## Anexo 9. ADEVA para los gases particulares de la fermentación

Origen		Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Intersección	GasmL	224467,000	1	224467,000	1373,866	,000
	CH4	37620,031	1	37620,031	2468,434	,000
	CO2	111916,583	1	111916,583	7343,394	,000
	volCH4	31156,499	1	31156,499	657,686	,000
	volCo2	91537,972	1	91537,972	1485,155	,000
Tratamientos	GasmL	1662,420	2	831,210	5,087	,014
	CH4	51,559	2	25,779	1,692	,205
	CO2	51,559	2	25,779	1,692	,205
	volCH4	224,024	2	112,012	2,364	,115
	volCo2	799,723	2	399,861	6,488	,005
Error	GasmL	4084,586	25	163,383		
	CH4	381,011	25	15,240		
	CO2	381,011	25	15,240		
	volCH4	1184,323	25	47,373		
	volCo2	1540,882	25	61,635		
Total	GasmL	232151,544	28			
	CH4	38035,470	28			
	CO2	112815,470	28			
	volCH4	32726,793	28			
	volCo2	94842,459	28			

## Anexo 10. Medias estimadas para la producción de gases

Variable dependiente	Media	Error típ.	Intervalo de confianza 95%	
			Límite inferior	Límite superior
GasmL	89,65	2,42	84,67	94,63
CH4	36,70	0,74	35,18	38,22
CO2	63,30	0,74	61,78	64,82
volCH4	33,40	1,30	30,72	36,08
volCo2	57,25	1,49	54,19	60,31

## Anexo 11. Separación de medias según TUKEY

Variable dependiente			Diferencia de medias (I-J)	Error típ.	Sig.	Intervalo de confianza 95%	
						Límite inferior	Límite superior
Gasml	1	2	4,87	5,87	0,69	-9,76	19,50
		3	18,238772942325426*	5,87	0,01	3,61	32,87
	2	1	-4,87	5,87	0,69	-19,50	9,76
		3	13,37	6,03	0,09	-1,64	28,38
	3	1	-18,238772942325426*	5,87	0,01	-32,87	-3,61
		2	-13,37	6,03	0,09	-28,38	1,64
CH4	1	2	-3,28	1,79	0,18	-7,75	1,19
		3	-1,22	1,79	0,78	-5,69	3,25
	2	1	3,28	1,79	0,18	-1,19	7,75
		3	2,06	1,84	0,51	-2,53	6,64
	3	1	1,22	1,79	0,78	-3,25	5,69
		2	-2,06	1,84	0,51	-6,64	2,53
CO2	1	2	3,28	1,79	0,18	-1,19	7,75
		3	1,22	1,79	0,78	-3,25	5,69
	2	1	-3,28	1,79	0,18	-7,75	1,19
		3	-2,06	1,84	0,51	-6,64	2,53
	3	1	-1,22	1,79	0,78	-5,69	3,25
		2	2,06	1,84	0,51	-2,53	6,64
volCH4	1	2	-1,43	3,16	0,89	-9,31	6,45
		3	5,25	3,16	0,24	-2,63	13,12
	2	1	1,43	3,16	0,89	-6,45	9,31
		3	6,68	3,24	0,12	-1,40	14,76
	3	1	-5,25	3,16	0,24	-13,12	2,63
		2	-6,68	3,24	0,12	-14,76	1,40
volCo2	1	2	6,30	3,61	0,21	-2,68	15,29
		3	12,992386183012577*	3,61	0,00	4,01	21,98
	2	1	-6,30	3,61	0,21	-15,29	2,68
		3	6,69	3,70	0,19	-2,53	15,91
	3	1	-12,992386183012577*	3,61	0,00	-21,98	-4,01
		2	-6,69	3,70	0,19	-15,91	2,53