

# Development of yeast additives for feeding ruminants in Cuba

## Desarrollo de aditivos con levaduras para la alimentación de rumiantes en Cuba

Yoandra Marrero<sup>1</sup>, Juana Galindo<sup>1</sup>, Yamicela Castillo<sup>2</sup> and O. Ruiz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Ciencia Animal, Carretera Central km 47 1/2, Apartado Postal 24, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

<sup>2</sup>Universidad Autónoma de Chihuahua, México

Email: [ymarrero@ica.co.cu](mailto:ymarrero@ica.co.cu)

Yoandra Marrero: <https://orcid.org/0000-0001-6213-5857>

Juana Galindo: <https://orcid.org/0000-0001-8639-4693>

Yamicela Castillo: <https://orcid.org/0000-0002-1902-8869>

Oscar Ruiz: <https://orcid.org/0000-0002-7279-7325>

The information obtained in the Institute of Animal Science of Cuba about the effect of additives with viable yeasts for ruminants is presented. Institutions from Mexico, Colombia and Brazil helped to gather all this information. The document is structured as follows: 1) effect of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* L25/7/13 on ruminal fermentation and milk production, 2) isolation, characterization and molecular identification of yeast strains from the ruminal ecosystem under the edaphoclimatic conditions of Cuba, 3) Effect of Levica-25 (*Candida tropicalis*) strain on ruminal microbial fermentation of animals that consume fibrous diets and 4) Evaluation of factors affecting the use of yeasts as microbial additives for ruminants (strain, culture medium, inclusion level and diet). This review is a valuable contribution, mainly intended for specialists in nutrition biochemistry, who project the use of viable yeasts as activating additives for ruminal fermentation.

Key words: *ruminal activators, Saccharomyces, Candida, Pichia*

In animal feed, the use of yeasts as microbial additives activating ruminal fermentation contributes to improvement health and to a better use of food, allowing the increase of productive yields and, consequently, availability of milk and meat destined for population (Di Francia *et al.* 2008 and Bruno *et al.* 2009). Among the most described actions of yeasts are the stimulation of the number and activity of ruminal bacteria, mainly cellulolytic (Kumar *et al.* 2013 and Moya *et al.* 2017) and, therefore, fiber degradability (Elghandour *et al.* 2014). Increases of fungi (Mao *et al.* 2013), protozoa (Kumar *et al.* 2013) and acetogenic bacteria (Hristov *et al.* 2013) populations were also observed, as well as it is stated that they can reduce the concentration of lactic acid (Mohammed *et al.* 2017) and the production of short chain fatty acids (SCFA) (Thurne *et al.* 2009).

Since the last decade of the last century, available scientific references demonstrate the use of several additive products that use commercial yeast strains, mainly of *S. cerevisiae* species, which is defined as one of the most promising microorganisms (Newbold *et al.* 1998). However, other species have been studied

Se compendia la información obtenida en el Instituto de Ciencia Animal de Cuba, en lo que respecta al efecto de aditivos con levaduras viables para rumiantes, que es el resultado de la colaboración de instituciones de México, Colombia y Brasil. El documento tiene la siguiente estructura: 1) Efecto de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* L25/7/13 en la fermentación ruminal y la producción de leche; 2) Aislamiento, caracterización e identificación molecular de cepas de levaduras provenientes del ecosistema ruminal en las condiciones edafoclimáticas de Cuba; 3) Efecto de la cepa Levica-25 (*Candida tropicalis*) en la fermentación microbiana ruminal de animales que consumen dietas fibrosas y 4) Evaluación de factores que afectan el empleo de levaduras como aditivos microbiales para rumiantes (cepa, medio de cultivo, nivel de inclusión, dieta). Esta información contribuye a la formación de especialistas en bioquímica de la nutrición, que proyectan la utilización de levaduras viables como aditivos activadores de la fermentación ruminal.

Palabras clave: *activadores ruminales, Saccharomyces, Candida, Pichia*

En la alimentación animal, la utilización de levaduras como aditivos microbianos activadores de la fermentación ruminal contribuye a mejorar la salud de los animales y a un mayor aprovechamiento de los alimentos. Esto permite incrementar los rendimientos productivos y, consecuentemente, la disponibilidad de leche y carne destinadas a la población (Di Francia *et al.* 2008 y Bruno *et al.* 2009). Entre las acciones más descritas de las levaduras se encuentran la estimulación del número y la actividad de las bacterias ruminales, fundamentalmente las celulolíticas (Kumar *et al.* 2013 y Moya *et al.* 2017) y, por ende, de la degradabilidad de la fibra (Elghandour *et al.* 2014). También se ha informado el aumento de las poblaciones de hongos (Mao *et al.* 2013), protozoos (Kumar *et al.* 2013) y bacterias acetogénicas (Hristov *et al.* 2013). Se plantea que pueden además, reducir la concentración de ácido láctico (Mohammed *et al.* 2017) y de ácidos grasos de cadena corta (AGCC) (Thurne *et al.* 2009).

Desde la última década del siglo pasado, la literatura científica refiere el uso de diversos productos aditivos que utilizan cepas comerciales de levaduras, fundamentalmente de la especie *S. cerevisiae*, definida como uno de los microorganismos más promisorios (Newbold *et al.* 1998).

recently, which have also demonstrated a stimulating effect on ruminal fermentation of different foods (Castillo *et al.* 2016 and Fernandes *et al.* 2019).

There are different hypotheses about the action mechanisms of yeasts to exert their effects on the digestive processes of ruminants (Salazar *et al.* 2016), but it was also confirmed that the response to the inclusion of yeasts can vary due to multiple factors such as diet, species or strain used, dose and even the animal (Fonty and Chaucheyras 2006). For all the above, it is considered necessary to carefully select the microbial additives to be used, according to the specific characteristics of each production system.

For the above reasons, in Cuba, the Institute of Animal Science (ICA, initials in Spanish) conducted research aimed at obtaining additives with yeasts that have a stimulating effect on ruminal fermentation of diets with high fiber content, as one of the ways described to manipulate ruminal microbial fermentation (Galindo and Marrero 2005). Thus, studies began with *S. cerevisiae* L25/7/13 strain, which is used in all distilleries for alcohol production in Cuba and as a protein source for animal feed (Solano *et al.* 2001 and Carro *et al.* 2006). Subsequently, researches with other types of yeast, isolated from the ruminal ecosystem, were widened under edaphoclimatic conditions of the country and their potentialities under *in vitro* and *in vivo* conditions were studied.

The objective of the following review was to present the main results of the characterization and evaluation of yeasts as additive candidates for ruminant feeding in Cuba.

### **EFFECT OF *S. CEREVISIAE* L25/7/13 ON RUMINAL FERMENTATION AND MILK PRODUCTION**

Studies were conducted with *S. cerevisiae* L25/7/13 strain from the collection of the Instituto Cubano de Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA) in order to study its possible activating action of ruminal fermentation. These were carried out in Cuba and Colombia and incubation techniques were used in fermentation tubes and gas production, respectively, with the use of star grass (*Cynodon nlemfuensis*) as substrate. The maximum growth time of this strain and the effect of inclusion (at a rate of 20 % of total incubation volume) of its live cells and the product of its metabolism were determined in the microbial population and some ruminal fermentative indicators (Marrero *et al.* 2006 b and 2010).

As results, *S. cerevisiae* L25/7/13, in its culture medium, favored the development of cellulolytic bacteria and total populations (table 1) and fungi. However, no effect was found on protozoan population. This increase in microbial populations generated a positive response on *in vitro* fiber degradation rate, and, as a consequence, on accumulated gas production (figure 1). However, the

Sin embargo, se estudian recientemente otras especies que también demuestran efecto estimulador en la fermentación ruminal de diferentes alimentos (Castillo *et al.* 2016 y Fernandes *et al.* 2019).

Existen diferentes hipótesis acerca de los mecanismos de acción de las levaduras para ejercer sus efectos en los procesos digestivos de los rumiantes (Salazar *et al.* 2016). Aunque también se ha comprobado que la respuesta a la inclusión de levaduras puede variar, debido a múltiples factores: dieta, especie o cepa empleada, dosis e incluso, el animal (Fonty y Chaucheyras 2006). Por ello es necesario seleccionar cuidadosamente los aditivos microbianos a utilizar, según las características específicas de cada sistema productivo.

Teniendo en cuenta las razones antes referidas, el Instituto de Ciencia Animal (ICA) de la República de Cuba ha llevado a cabo investigaciones encaminadas a la obtención de aditivos con levaduras, que tengan efecto estimulador de la fermentación ruminal de dietas con alto contenido en fibra, como una de las vías descritas para manipular la fermentación microbiana ruminal (Galindo y Marrero 2005). Con esta finalidad, comenzaron los estudios con la cepa *S. cerevisiae* L25/7/13, que se emplea en todas las destilerías para la producción de alcohol en Cuba, y también como fuente proteica en la alimentación animal (Solano *et al.* 2001 y Carro *et al.* 2006). Posteriormente, se ampliaron los trabajos con la utilización de otros géneros de levaduras aisladas del ecosistema ruminal en las condiciones edafoclimáticas de Cuba, y se estudiaron sus potencialidades en condiciones *in vitro* e *in vivo*.

La siguiente reseña tiene como objetivo exponer los principales resultados obtenidos en la caracterización y evaluación de levaduras, como candidatas a aditivos destinados a la alimentación de rumiantes en Cuba.

### **EFFECTO DE *S. CEREVISIAE* L25/7/13 EN LA FERMENTACIÓN RUMINAL Y LA PRODUCCIÓN DE LECHE**

Se realizaron estudios con la cepa *S. cerevisiae* L25/7/13, procedente de la colección del Instituto Cubano de Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), con el objetivo de estudiar su posible acción activadora de la fermentación ruminal. Estas investigaciones se llevaron a cabo en Cuba y Colombia, con el empleo de las técnicas de incubación en tubos de fermentación y producción de gas respectivamente. Se utilizó como sustrato el pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*). Se determinó el tiempo de máximo crecimiento de dicha cepa y el efecto de la inclusión (a razón del 20 % del volumen total de incubación) de sus células vivas y el producto de su metabolismo en la población microbiana y en algunos indicadores fermentativos ruminales (Marrero *et al.* 2006 b y 2010).

Como resultado se obtuvo que *S. cerevisiae* L25/7/13 en su medio de cultivo favoreció el desarrollo de las poblaciones de bacterias totales y celulolíticas (tabla 1) y hongos. Sin embargo, no se encontró efecto en la población de protozoos. Este aumento en las poblaciones

inclusion of yeast pellets showed a positive effect with the use of DM fraction and not in the NDF. Yeast culture supernatant caused deleterious effects on all response variables.

microbianas generó una respuesta positiva en la tasa de degradación de la fibra *in vitro* y, como consecuencia, en la producción de gas acumulada (figura 1). Sin embargo, la inclusión de granulado de levadura mostró efecto

Table 1. Effect of the inclusion of *S. cerevisiae* L25/7/13 on cellulolytic bacteria population ( $10^3$  cfu mL<sup>-1</sup>) according to Marrero *et al.* (2006 b)

Hours	Treatments					SE ± Sign
	Control without yeast	Culture medium	Culture of <i>S. cerevisiae</i>	Pellet	Supernatant	
0	0.28 <sup>ab</sup> (2.12)	0.31 <sup>abc</sup> (2.55)	0.27 <sup>a</sup> (1.60)	0.41 <sup>cde</sup> (7.42)	0.39 <sup>bcd</sup> (4.90)	0.03***
4	0.36 <sup>abcd</sup> (4.07)	0.40 <sup>cd</sup> (6.37)	0.56 <sup>f</sup> (29.12)	0.52 <sup>e f</sup> (17.97)	0.46 <sup>de</sup> (15.70)	
8	0.32 <sup>abc</sup> (2.85)	0.33 <sup>abc</sup> (4.15)	0.58 <sup>f</sup> (40.12)	0.57 <sup>f</sup> (31.32)	0.40 <sup>cd</sup> (6.02)	
12	0.26 <sup>a</sup> (2.45)	0.32 <sup>abc</sup> (2.95)	0.57 <sup>f</sup> (33.50)	0.51 <sup>e f</sup> (17.32)	0.33 <sup>abc</sup> (3.00)	

Data transformed according to Ln X. Original means between parentheses

<sup>abcdef</sup>Different letters differ at  $p < 0.05$  (Duncan 1955) \*\*\*  $P < 0.001$

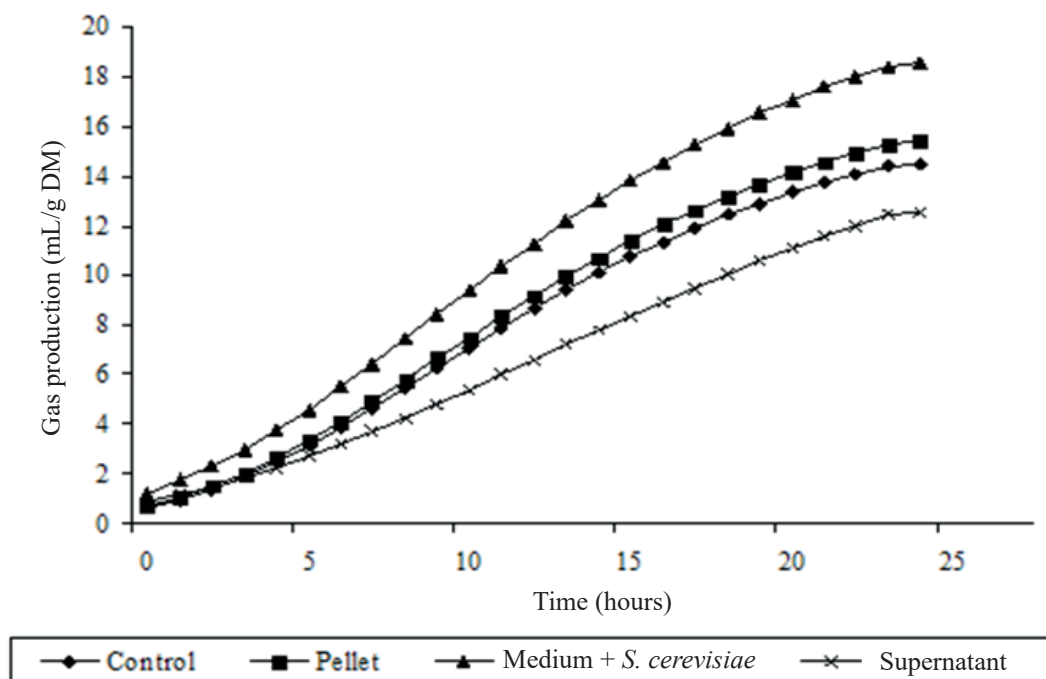


Figure 1. Effect of inclusion of *S. cerevisiae* L25/7/13 on accumulated gas production with DM of *C. nlemfuensis* as substrate modelled with Gompertz ( $P < 0.05$ ) according to Marrero *et al.* (2010)

Previously described *in vitro* studies indicated the activating effect of ruminal fermentation of *S. cerevisiae* L25/7/13 yeast, associated with the actions of its live cells and the products of its metabolism. In this sense, Montes de Oca *et al.* (2016) described several action mechanisms for *S. cerevisiae*, such as consumption of the oxygen present in the rumen that favors the growth and activity of anaerobic microorganisms, pH regulation and limitation of acidosis risks through the control of bacteria populations that produce and consume lactate as well as the fact of providing nutrients such as peptides, vitamins, organic acids and cofactors required by ruminal microorganisms. Results were encouraging, considering that not all strains of *S. cerevisiae* are capable of stimulating digestion in the rumen as described by Newbold *et al.* (1998) in the 90s of last century. Therefore, it was verified whether the effects

positivo, cuando se empleó la fracción MS y no en la FDN. El sobrenadante del cultivo de levadura causó efectos deletéreos en todas las variables de respuesta.

Los estudios *in vitro* descritos anteriormente indicaron el efecto activador de la fermentación ruminal de la levadura *S. cerevisiae* L25/7/13, asociado a las acciones de sus células vivas y los productos de su metabolismo. Montes de Oca *et al.* (2016) describieron varios mecanismos de acción para *S. cerevisiae*. Entre ellos se encuentran el consumo del oxígeno presente en el rumen, que favorece el crecimiento y la actividad de los microorganismos anaerobios; la regulación del pH y la reducción de riesgos de acidosis mediante el control de las poblaciones de bacterias, productoras y consumidoras de lactato; además de proveer de los nutrientes (péptidos, vitaminas, ácidos orgánicos y cofactores) requeridos por los microorganismos ruminales. Los resultados de estos trabajos fueron alentadores, si se tiene en cuenta que no todas las cepas de *S. cerevisiae*

of yeast in the fermentation of fibrous substrates were reflected in the productivity of the animals.

An experiment was carried out in a productive unit of the Institute of Animal Science, under controlled conditions, with the aim of studying the effect of inclusion of *S. cerevisiae* L25/7/13 on milk production (García *et al.* 2020). Medium potential commercial Holstein cows were used, which were in the middle stage of lactation and consumed a high fiber diet. They were provided with 10g L<sup>-1</sup> of yeast microbial preparation every day. The preparation increased (P <0.01) milk production by 0.7 liters and influenced directly on milk protein and total solids, which indicates a better use of final resources of digestion. These productive responses were in correspondence with the increases found in ruminal populations of yeast, bacteria and cellulolytic fungi.

Studies conducted with *S. cerevisiae* L25/7/13 strain were very promising for obtaining microbial additives for ruminants. However, many questions remained to be answered. In this sense, it is known that yeasts do not belong to the ruminal ecosystem and their representation in there is mainly due to their presence in the food consumed by animals, which is why they are classified as allochthonous. This knowledge was evident with *S. cerevisiae* L25/7/13 strain, which was able to remain in the rumen for a certain period of time and stimulate fermentative processes that occur in it. However, it is known (Zoumpopoulou *et al.* 2018) that adaptation to a certain ecosystem is an important characteristic in the selection of probiotic candidates and the efficacy of selected microorganisms may depend on the original host.

Considering the above concepts, a new field of research was opened in ICA for obtaining additives with yeasts for ruminants. In this sense, it was logical to think that when foods rich in yeasts are offered to an animal for a certain time, there could be some species resistant to the stressful conditions offered by the rumen and, therefore, their action within it could be more effective.

#### **ISOLATION, CHARACTERIZATION AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF YEAST STRAINS FROM RUMINAL ECOSYSTEM UNDER CUBAN EDAPHOCLIMATIC CONDITIONS**

The inclusion of a fermented product that contained populations between 106-108 cfu mL<sup>-1</sup> of live yeasts, in the diet of cows, allowed to increase the populations of these microorganisms in the rumen. In this way, a total of 24 strains were isolated, which demonstrated a permanence in the organ for up to 12 hours after the product was ingested by the animal. These strains were characterized by biochemical tests and it was determined that none belonged to *Saccharomyces* genus. These studies made it possible to propose a new

son capaces de estimular la digestión en el rumen, como describió Newbold *et al.* (1998). Por ello, se comprobó si los efectos de la levadura en la fermentación de sustratos fibrosos se reflejaban en la productividad de los animales.

Se llevó a cabo un experimento en una unidad productiva del Instituto de Ciencia Animal, en condiciones controladas, con el objetivo de estudiar el efecto de la inclusión de *S. cerevisiae* L25/7/13 en la producción de leche (García *et al.* 2020). Se emplearon vacas Holstein comercial de mediano potencial, que se encontraban en la etapa media de lactación y consumían una dieta alta en fibra. Se les ofertó 10g L<sup>-1</sup> diarios del preparado microbial de la levadura. El preparado incrementó (P<0.01) en 0.7 L la producción de leche e influyó, directamente, en la proteína láctea y en los sólidos totales, lo que indica la mejor utilización de los recursos finales de la digestión. Estas respuestas productivas estuvieron en correspondencia con los incrementos que se encontraron en las poblaciones de levaduras, bacterias y hongos celulolíticos ruminales.

Los estudios que se condujeron con la cepa *S. cerevisiae* L25/7/13 fueron muy promisorios en la línea de obtención de aditivos microbianos para rumiantes. Sin embargo, muchas incógnitas quedaron por responder. Se sabe que las levaduras no pertenecen al ecosistema ruminal, y que su representación en él se debe, mayoritariamente, a su presencia en los alimentos que consumen los animales, por lo que se clasifican como alóctonas. Estos conocimientos se corroboraron con la cepa de *S. cerevisiae* L25/7/13, que fue capaz de permanecer en el rumen durante cierto período y estimular los procesos fermentativos que en él ocurren. Sin embargo, se conoce que la adaptación a un determinado ecosistema es una característica importante en la selección de candidatos a probióticos y la eficacia de los microorganismos seleccionados puede depender del huésped original (Zoumpopoulou *et al.* 2018).

Al tener en cuenta los conceptos anteriores, en el ICA se abrió un nuevo campo de investigación en la obtención de aditivos con levaduras para rumiantes. Fue lógico pensar que cuando se ofertan alimentos ricos en levaduras a un animal por un determinado tiempo, se pueden encontrar algunas especies resistentes a las condiciones estresantes que les ofrece el rumen y, por lo tanto, su acción dentro del mismo podría ser más efectiva.

#### **AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE LEVADURAS PROVENIENTES DEL ECOSISTEMA RUMINAL EN LAS CONDICIONES EDAFOCLIMÁTICAS DE CUBA**

La inclusión de un producto fermentado, que contenía poblaciones entre 106-108 ufc mL<sup>-1</sup> de levaduras vivas en la dieta de vacas, permitió aumentar las poblaciones de estos microorganismos en el rumen. De esta forma se aislaron un total de 24 cepas, que demostraron su permanencia en el órgano de hasta 12 h después de ingerido el producto por parte del animal. Estas cepas se caracterizaron mediante pruebas bioquímicas, y



methodology for isolating and characterizing yeast strains present in the ruminal ecosystem (Marrero *et al.* 2005) that was applied in joint research projects with the Autonomous University of Chihuahua, Mexico (Castillo *et al.* 2016).

The result of the characterization was verified with karyotyping technique and it was confirmed that the electrophoretic profile of 20 of the isolated strains was different from that of *S. cerevisiae*. Later, 14 of the strains isolated from the ruminal ecosystem were identified by using polymerase chain reaction (PCR). For this, primers that amplified for D1/D2 region of the larger 26S rDNA subunit were used. Out of the 14 strains under study, seven belong to *Pichia* genus with a similarity percentage between 88 and 98 % and it was also confirmed that six of them belong to *Pichia guillermondii* species with more than 90 % of maximum identity except of strain 17 that had 88 %. Five other strains were identified as *Issatchenkia orientalis*, strain 18 as *Rodotorula mucilaginosa*, and strain 25 as *Candida tropicalis*. These strains were named, for the purposes of the Laboratory of the Institute of Animal Science, as Levica plus the isolate number (Marrero *et al.* 2013).

In another experiment, gas production was studied, in which *C. nlemfuensis* was used as substrate with the inclusion of 20 mg of DM mL<sup>-1</sup> of isolated yeasts. It showed, through a grouping of the values by cluster (table 2), that Levica-25 strain produced the greatest stimulating effect of ruminal fermentation.

se pudo determinar que ninguna pertenecía al género *Saccharomyces*. Estos estudios permitieron proponer una nueva metodología para el aislamiento y caracterización de cepas de levaduras presentes en el ecosistema ruminal (Marrero *et al.* 2005), que se aplicó en proyectos de investigación conjuntos con la Universidad Autónoma de Chihuahua, México (Castillo *et al.* 2016).

El resultado de la caracterización se comprobó con la técnica de cariotipaje y se corroboró que el perfil electroforético de 20 de las cepas aisladas fue diferente al de *S. cerevisiae*. Posteriormente, se identificaron de 14 de las cepas aisladas del ecosistema ruminal mediante el empleo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para ello, se emplearon primers que amplificaron para la región D1/D2 de la subunidad mayor de 26S ADNr. De las 14 cepas en estudio, siete pertenecen al género *Pichia*, con porcentaje de similitud entre 88 y 98 %. Además se confirmó que seis de ellas pertenecen a la especie *Pichia guillermondii*, con más del 90 % de máxima identidad, a excepción de la cepa 17 que tuvo 88 %. Otras cinco cepas se identificaron como *Issatchenkia orientalis*, la cepa 18 como *Rodotorula mucilaginosa* y la cepa 25 como *Candida tropicalis*. Estas cepas se denominaron, a los efectos del laboratorio del Instituto de Ciencia Animal, como Levica más el número de aislado (Marrero *et al.* 2013)

En otro experimento se estudió la producción de gas con el empleo del sustrato *C. nlemfuensis* y la inclusión de 20 mg de MS mL<sup>-1</sup> de las levaduras aisladas. Mediante una agrupación de los valores por cluster (tabla 2), el sustrato mostró que la cepa Levica-25 produjo el mayor

Table 2. Accumulated gas production at 24 hours of fermentation in yeast groups isolated from ruminal ecosystem

Groups	Accumulated gas production (mL)	SE ± Sign
Group 1 (13 strains)	55.82 <sup>d</sup>	0.85*
Group 2 (3 strains)	38.01 <sup>b</sup>	
Group 3 (7 strains)	47.53 <sup>c</sup>	
Group 4 (strain 25)	70.83 <sup>e</sup>	
Group 5 (control without yeast and <i>S. cerevisiae</i> )	28.90 <sup>a</sup>	

<sup>abcde</sup>Different letters differ p<0.05 (Duncan 1955)

All identified strains were preserved in a specific culture medium for freezing conditions that allows better conservation of the collection for future studies. Viability of these strains was evaluated after six months of cryopreservation at -80 °C, in a malt extract medium with glycerol and the effectiveness of the method was confirmed (Sosa *et al.* 2017). Yeast collection was registered in GenBank and it is part of the ICA collection in the World Data Center for Microorganisms (WDCM) with registration number 980.

Taking into account the results with Levica-25, another study was carried out that included new biochemical tests and the phylogenetic study due to

efecto estimulador de la fermentación ruminal

Todas las cepas identificadas se conservaron en un medio de cultivo específico para condiciones de congelación, el cual permite una mejor preservación de la colección para estudios futuros. La viabilidad de dichas cepas se evaluó a los seis meses en crioconservación a -80 °C en medio extracto de malta con glicerol y se comprobó la efectividad del método (Sosa *et al.* 2017). La colección de levaduras se registró en el GenBank y forma parte de la colección del ICA en el World Data Centre for Microorganisms (WDCM), con número de registro 980.

Al tener en cuenta los resultados con Levica-25, se realizó otro estudio que incluyó nuevas pruebas bioquímicas y el estudio filogenético, dada la

the associated pathogenicity of *Candida tropicalis* species. Thus, the sequence obtained from strain 25 was compared with the sequence of *C. tropicalis* reported in GenBank (HM627137.1) and the phylogenetic tree based on D1/D2 region of the 26S rDNA gene was studied. The analysis showed that Levica-25 strain is a new strain, very close to *Candida tropicalis* that could present different characteristics regarding pathogenicity referred for this species (Marrero *et al.* 2011).

Results described in the previous sections were encouraging considering that there were not abundant studies in which strains other than *S. cerevisiae* were used as additives for ruminants, so studies were continued with Levica-25 strain and *S. cerevisiae* L25/7/13 was used as a pattern. However, it was known that species and yeast strains, and the inclusion dose, as well as the diet used, have an important influence on physiological response and, therefore, on animal productivity (Enjalbert *et al.* 1999). For this reason, in parallel, comparative studies of all isolated strains were carried out with the use of different diets and inclusion doses.

#### **EFFECT OF LEVICA-25 (*C. TROPICALIS*) STRAIN ON RUMINAL MICROBIAL FERMENTATION OF ANIMALS THAT CONSUME FIBROUS DIETS**

A Latin square design was used to study the effect of biological preparations with viable yeasts in the ruminal microbial population and fermentative indicators in cows consuming fibrous diets (Marrero *et al.* 2006a). For this purpose, preparations of *S. cerevisiae* L25/7/13 and Levica-25 yeast, alone and combined, in a dose of 10 g/animal/d were included in diets. The inclusion of preparations caused a stimulation of the ruminal microbial population and, especially, of the cellulolytic one. The most marked effect was caused by Levica-25. However, no effects of yeasts were found on the populations of proteolytic bacteria and protozoa in the rumen, nor on pH values and SCFA concentrations.

In a second study, *in vitro* gas production technique was used to evaluate the inclusion of the same strains at a rate of 20 % of total incubation volume, in the fermentation process of *C. nlemfuensis* with the use of water buffalo rumen liquid (Galindo *et al.* 2010). The inclusion of microbial preparation with Levica-25 increased *in vitro* gas production and *S. cerevisiae* L25/7/13 produced intermediate gas values between the control and Levica-25. Gas production was modified with respect to fermentation time and the highest values were found at 24 h of fermentation. On the other hand, *S. cerevisiae* increased the population of cellulolytic bacteria by 1.75 times and Levica-25 multiplied the total viable population by 2.25. In addition, both yeasts reduced the populations of methanogens after four hours of fermentation. This

patogenicidad asociada de la especie *Candida tropicalis*. La secuencia obtenida de la cepa 25 se comparó con la de *C. tropicalis*, registrada en el GenBank (HM627137.1), y se estudió el árbol filogenético basado en la región D1/D2 del gen 26S ADNr. El análisis mostró que Levica-25 es una cepa nueva, muy cercana a *Candida tropicalis*, que pudiera tener características diferentes en cuanto a la patogenicidad referida para esta especie (Marrero *et al.* 2011).

Los resultados descritos en los acápite anteriores fueron alentadores, si se tiene en cuenta que no existían abundantes trabajos donde se emplearan cepas diferentes de *S. cerevisiae* como aditivo para rumiantes, por lo que se continuaron estudios con Levica-25 y se utilizó como patrón *S. cerevisiae* L25/7/13. No obstante, se conoce que la especie, como las cepas de levadura y la dosis de inclusión, así como la dieta utilizada, influyen de manera importante en la respuesta fisiológica y, por ende, en la productividad del animal (Enjalbert *et al.* 1999). Por ello, paralelamente, se llevaron a cabo estudios comparativos de todas las cepas aisladas con la utilización de diferentes dietas y dosis de inclusión.

#### **EFFECTO DE LA CEPA LEVICA-25 (*C. TROPICALIS*) EN LA FERMENTACIÓN MICROBIANA RUMINAL DE ANIMALES QUE CONSUMEN DIETAS FIBROSAS**

Se utilizó un diseño cuadrado latino para estudiar el efecto de preparados biológicos con levaduras viables en la población microbiana ruminal e indicadores fermentativos de vacas que consumen dietas fibrosas (Marrero *et al.* 2006a). Para ello se incluyeron en las dietas preparados de las levaduras *S. cerevisiae* L25/7/13 y Levica-25, solas y combinadas en una dosis de 10 g/animal/d. La inclusión de preparados originó la estimulación de la población microbiana ruminal y, en especial, de la celulolítica. El efecto más marcado lo provocó Levica-25. Sin embargo, no se encontraron efectos de las levaduras en las poblaciones de bacterias proteolíticas y en los protozoos del rumen. Tampoco los hubo en los valores de pH y concentraciones de AGCC.

En un segundo estudio se utilizó la técnica de producción de gas *in vitro* para evaluar la inclusión de las mismas cepas, a razón del 20 % del volumen total de incubación, en el proceso fermentativo de *C. nlemfuensis*, con el empleo de líquido de rumen de búfalos de río (Galindo *et al.* 2010). La inclusión del preparado microbiano con Levica-25 incrementó la producción de gas *in vitro*. *S. cerevisiae* L25/7/13 produjo valores intermedios de gas entre el control y Levica-25. La producción de gas se modificó con respecto al tiempo de fermentación. Los mayores valores se hallaron a las 24 h de fermentación. *S. cerevisiae* incrementó en 1.75 veces la población de bacterias celulolíticas, y Levica-25 multiplicó por 2.25 la población de viables totales. Ambas levaduras redujeron las poblaciones de metanógenos a cuatro horas de fermentación, lo que se

was reflected in the ruminal methane concentrations (table 3).

reflejó en las concentraciones de metano ruminal (tabla 3).

Table 3. Effect of *S. cerevisiae* L25/7/13 and Levica-25 on *in vitro* methane production (µL) at 24 h of fermentation, according to Galindo *et al.* (2010)

Treatments				
Control	<i>S. cerevisiae</i>	Levica-25	SE (±)	Sig
78.97 <sup>c</sup>	45.21 <sup>b</sup>	21.52 <sup>a</sup>	6.74	**
Time, h				
4	8	12	24	SE (±) Sig
13.12 <sup>a</sup>	56.54 <sup>b</sup>	59.61 <sup>b</sup>	64.99 <sup>b</sup>	9.32*

<sup>a, b</sup>Means with different letters in the same line differ at P < 0.05 (Duncan 1955)

\* P < 0.05      \*\*P < 0.01

In other experiments developed at the Facultad de Zootecnia of the Universidad Autónoma de Chihuahua (UACH), Mexico, the effect of yeast inclusion of *Candida* genus on *in vitro* ruminal fermentation of different fibrous substrates was studied: oat straw (*Avena sativa*) and alfalfa (*Medicago sativa*). In both, the previously described strain Levica-25 (*Candida tropicalis*) was compared to the so-called Levazoot 15 (*Candida norvegensis*), also of ruminal origin and belonging to the collection of the Mexican institution (Castillo *et al.* 2016).

It was possible to verify (figure 2) that both strains stimulated (P < 0.0001) ruminal fermentation of the substrates under study. However, Levazoot 15 strain stimulated the fermentation of alfalfa DM by 21.43 % above Levica-25 (Marrero *et al.* 2015). The foregoing corroborated the influence of the strain and diet on the action of yeasts within the rumen and the importance of selecting the correct strain under each production condition. These results laid the foundations for studies of other factors that could influence on the action of yeasts in the rumen.

En otros experimentos desarrollados en la Facultad de Zootecnia de la Universidad Autónoma de Chihuahua (UACH), México, se estudió el efecto de la inclusión de levaduras del género *Candida* en la fermentación ruminal *in vitro* de diferentes sustratos fibrosos: paja de avena (*Avena sativa*) y alfalfa (*Medicago sativa*). En ambos se comparó la cepa Levica-25 (*Candida tropicalis*), antes descrita y la denominada Levazoot 15 (*Candida norvegensis*), también de origen ruminal, perteneciente a la colección de la institución mexicana (Castillo *et al.* 2016).

Se pudo comprobar (figura 2) que ambas cepas estimularon (P < 0.0001) la fermentación ruminal de los sustratos en estudio. Sin embargo, Levazoot 15 estimuló la fermentación de la MS de alfalfa en 21.43 % por encima de Levica-25 (Marrero *et al.* 2015). Lo anterior corroboró la influencia de la cepa y la dieta en la acción de las levaduras en el rumen y la importancia de seleccionar la cepa correcta en cada condición de producción. Estos resultados crearon las bases para realizar estudios de otros factores que pudieran influir en la acción de las levaduras en el rumen.

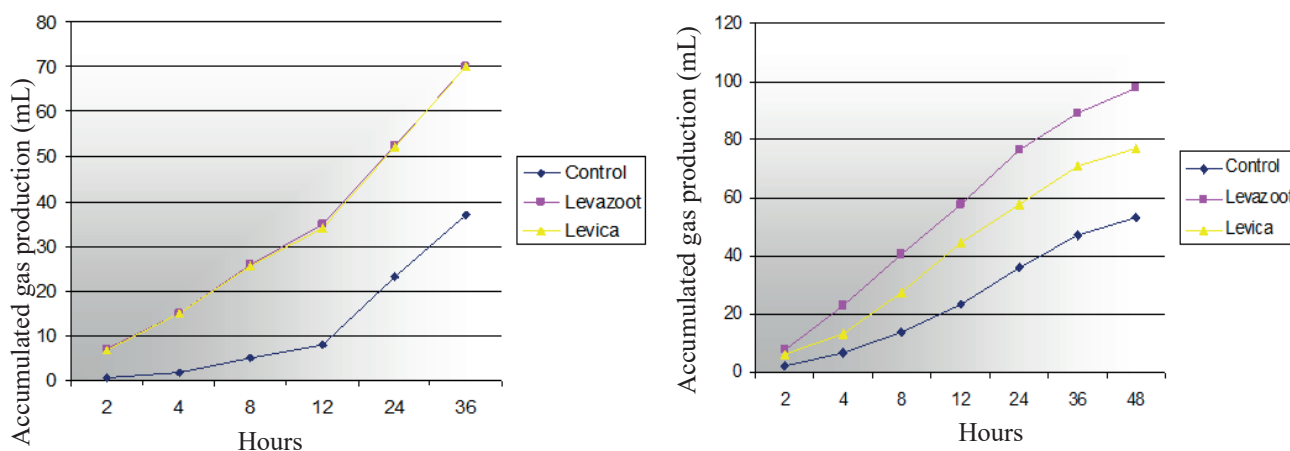


Figure 2. Effect of the inclusion of Levica-25 and Levazoot 15 strains on accumulated gas production of DM of oat straw (left) and alfalfa (right) P<0.0001, according to Marrero *et al.* (2015)

**EVALUATION OF FACTORS THAT AFFECT THE USE OF YEASTS AS MICROBIAL ADDITIVES FOR RUMINANTS (CULTURE MEDIUM, INCLUSION LEVEL AND DIET)**

**EVALUACIÓN DE FACTORES QUE AFECTAN LA UTILIZACIÓN DE LEVADURAS COMO ADITIVOS MICROBIANOS PARA RUMIANTES (MEDIO DE CULTIVO, NIVEL DE INCLUSIÓN, DIETA)**

For the study of factors that affect the use of yeasts as microbial additives for ruminants, gas production technique was used and several experiments were carried out. Marrero *et al.* (2014), in a first study, evaluated the dose of 5 mg of DM mL<sup>-1</sup> equivalent to 10 g of DM/animal of yeast cultures, as it is the one that is mostly reported in references. Strains isolated from the ruminal ecosystem were compared with the reference strain *S. cerevisiae* L25/7/13 and a *S. cerevisiae* strain isolated from LEVUCCELL ®SC product was also included. In addition, a control treatment without yeast and a control with the culture medium without inoculation were included. It was found that all treatments had superior performance to control except in which strain 15 was included (figure 3, table 4). Although Levica-25 strain stimulated gas production, the best-performing treatment was the one that included Levica-27 strain, which belongs to *Pichia guilliermondii* species. Hence, in a second study, the inclusion of two levels (5 and 10 mg of DM mL<sup>-1</sup>) of it in the ruminal fermentation of corn stubble was evaluated and the best results were obtained when the highest dose of yeast was included.

Para el estudio de factores que afectan el empleo de levaduras como aditivos microbianos para rumiantes se aplicó la técnica de producción de gas y se ejecutaron varios experimentos. En un primer estudio, Marrero *et al.* (2014) evaluaron la dosis de 5 mg de MS mL<sup>-1</sup>, que es la que mayormente se informa en la literatura, equivalente a 10 g de MS/animal de cultivos de levaduras. Se compararon las cepas aisladas del ecosistema ruminal con la cepa de referencia *S. cerevisiae* L25/7/13, y se incluyó además una cepa de *S. cerevisiae* aislada del producto LEVUCCELL ®SC. Además, se incorporó un tratamiento control, sin levadura, y un blanco con el medio de cultivo sin inocular. Se pudo comprobar que todos los tratamientos tuvieron un comportamiento superior al control, excepto en el que se incluyó la cepa 15 (figura 3, tabla 4). Aunque Levica-25 estimuló la producción de gas, el tratamiento de mejor comportamiento fue el que incluyó la cepa Levica-27, que pertenece a la especie *Pichia guilliermondii*. En un segundo estudio se evaluó la inclusión de dos niveles (5 y 10 mg de MS mL<sup>-1</sup>) de dicha cepa en la fermentación ruminal del rastrojo de maíz. Los mejores resultados se obtuvieron cuando se incorporó la mayor dosis de levadura.

Recently, a study was carried out under similar *in vitro* conditions in order to corroborate the effect of diet on the inclusion of different species of yeasts in ruminal fermentation. For this, in addition to *C.*

Recientemente se llevó a cabo un estudio en condiciones similares *in vitro*, con el objetivo de corroborar el efecto de la dieta en la inclusión de levaduras de diferentes especies en la fermentación ruminal.

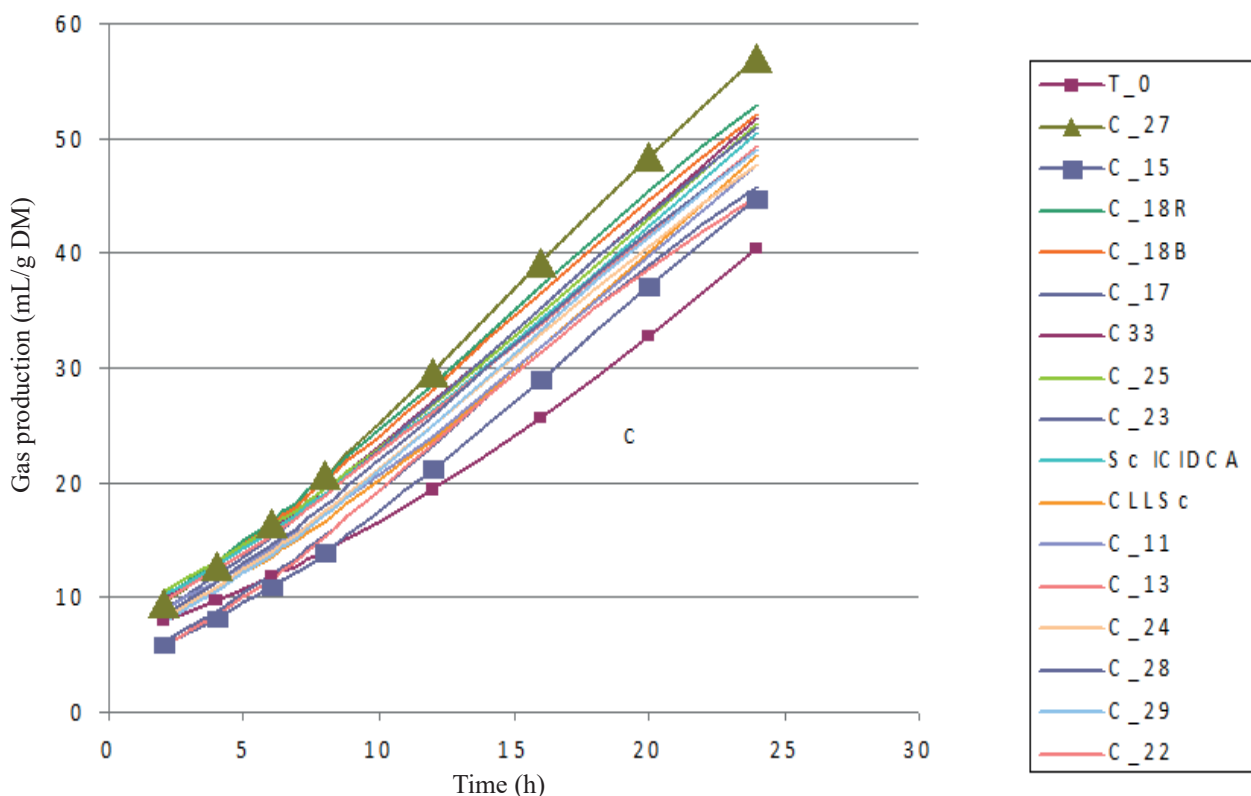


Figure 3. Accumulated gas production (mL) for 24 hours of *in vitro* fermentation of *C. nlemfuensis*. Inclusion dose: 5 mg of DM.mL<sup>-1</sup>, according to Marrero *et al.* (2014)



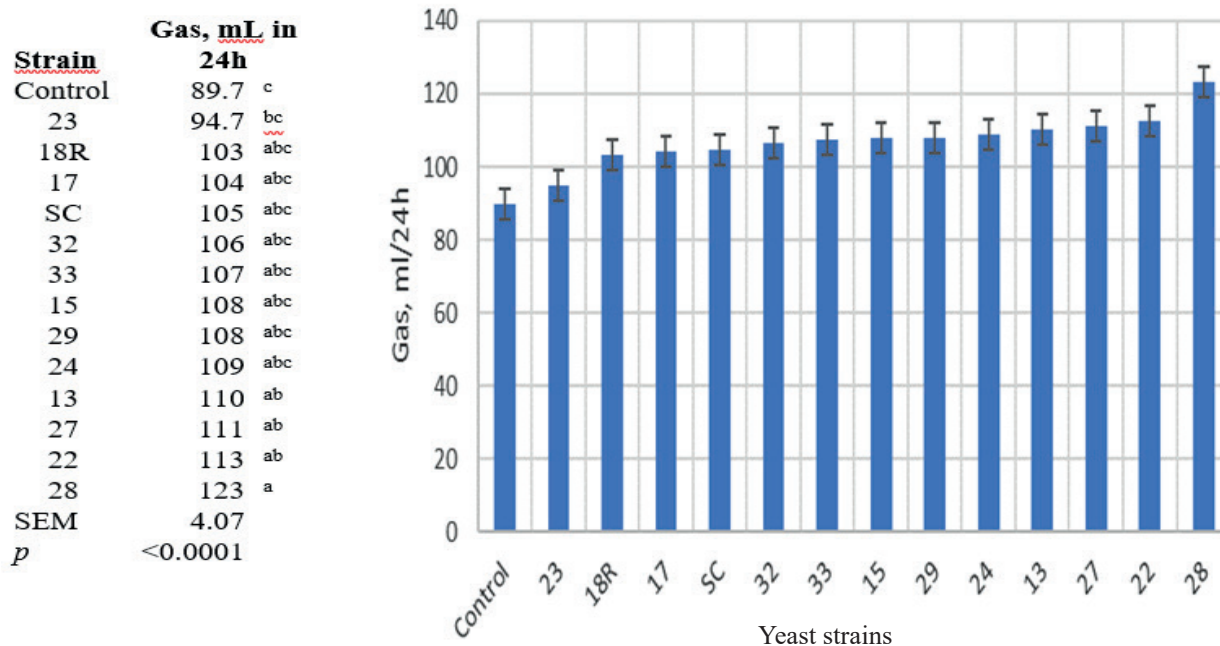
Table 4. Curve comparison by CIAC test and group formation by Tukey test, according to Marrero *et al.* (2014)

C11 <sup>a</sup>	C13 <sup>b</sup>	C15 <sup>c</sup>	C17 <sup>d</sup>	C22 <sup>d</sup>	C28 <sup>be</sup>	C18B <sup>f</sup>	C18R <sup>f</sup>
C23 <sup>beg</sup>	C24 <sup>abc</sup>	C29 <sup>ac</sup>	C33 <sup>fg</sup>	C27 <sup>h</sup>	CLLSc <sup>ca</sup>	C25 <sup>bfg</sup>	Sc ICIDCA <sup>beg</sup>
SE±0.12							

Different letters represent significant differences at  $P < 0.05$

*nlemfuensis*, a corn-soy bean supplement was added (Marrero *et al.* 2020). Gas production technique was used and the evaluated strains are part of the collection of the Institute of Animal Science that previously showed effectiveness as activators of ruminal fermentation. The same dose of the previous study, equivalent to 10 g of DM in an adult bovine, was added and the presence of live cells in them was in the order of  $10^6$  cel mL<sup>-1</sup>. The stimulatory effect of yeast addition on gas production was observed with increases that varied from 6% (strain 23) to 37% (strain 28) (figure 4). In this case, although *P. guilliermondii* Levisa-27 strain caused increases in gas production, strain 28, which belongs to the same species, achieved better results.

Además de *C. nlemfuensis*, se adicionó un suplemento de maíz-soya (Marrero *et al.* 2020). Se utilizó la técnica de producción de gas con las cepas evaluadas, que forman parte de la colección del Instituto de Ciencia Animal, las que habían demostrado antes su efectividad como activadoras de la fermentación ruminal. Se adicionó la misma dosis que en el estudio anterior, equivalente a 10 g de la MS en un bovino adulto. La presencia de células vivas en estos animales estuvo en el orden de  $10^6$  cel mL<sup>-1</sup>. Se observó el efecto estimulador de la adición de las levaduras en la producción de gas, con incrementos que variaron de 6% (cepa 23) a 37% (cepa 28) (figura 4). En este caso, aunque *P. guilliermondii*, cepa Levisa-27, provocó incrementos en la producción de gas, la cepa 28, que es de la misma especie, logró mejores resultados.



# 70 % of corn, 19 % of soy bean, 2 % of salt and 2 % of minerals

Figure 4. Gas production in 24h of a mixture of 70% of *C. nlemfuensis* y 30% of a supplement incubated alone (control) or with different yeast strains, according to Marrero *et al.* 2020

Finally, the culture medium was considered as a factor that could influence the activating effect of microbial additives. There are specifically formulated media for yeast growth, such as malt extract broth (MEB) and yeast-peptone-glucose (YPG) extract. Previous studies with *P. guilliermondii* (Levisa-27) demonstrated with indirect methods of growth determination (biomass and optical density) that there are differences between both culture media at 16 h. It was found that the highest biomass concentrations

Finalmente, se consideró el medio de cultivo como factor que podría influir en el efecto activador de los aditivos microbianos. Existen medios formulados, específicamente para el crecimiento de levaduras, como el caldo extracto de malta (CEM) y el extracto de levadura-peptona-glucosa (YPG). En estudios previos con *P. guilliermondii* (Levisa-27) se demostró con métodos indirectos de determinación de crecimiento (biomasa y densidad óptica) que existen diferencias a las 16 h entre ambos medios de cultivo. Las mayores

were obtained for YPG medium, with values of 3.88 mg mL<sup>-1</sup>, while it was 2.33 mg mL<sup>-1</sup> in MEB. An increase in pH was also observed when the strain was cultivated in MEB medium (Sosa *et al.* 2015). These results indicated that the culture medium influences on the nature of metabolites produced by the strain, so it is possible that it also affects the ruminal fermentative process, when it is included as an additive in animal feed.

With this background, another study was carried out to evaluate the effect of the cultivation of *P. guilliermondii*, in different media, on the *in vitro* fermentation of *C. nlemfuensis* (Marrero *et al.* 2016). Gas production technique was used and five treatments were evaluated, including *P. guilliermondii* strain (Levica-27), grown in the malt extract broth (MEB) and yeast-peptone-glucose (YPG) extract media. The supernatant of each medium was used after centrifugation and resuspension of the pellet of cells in a buffered medium. A control without yeast was also included. Results showed that Levica-27, grown in YPG medium, stimulated the gas production of *C. nlemfuensis* in a greater proportion ( $P < 0.001$ ) than when it was cultivated in MEB medium. The influence of metabolites produced by yeasts and their stimulating effect on a certain culture medium was confirmed and the importance of selecting the appropriate strains and culture medium for their use as an additive in ruminant diets, according to the food to be used, was confirmed.

It is known that the design of the culture medium is one of the most important tasks in biological technology. According to Winkler (1988), in the total cost of biotechnological products, raw materials can represent between 30 and 80%. Furthermore, the composition of the culture medium has to satisfy all nutritional requirements of the microorganism. Therefore, studies were conducted with the objective of evaluating different culture media that would allow selecting the most appropriate and economical one for obtaining Levica-27 on a larger scale.

With these studies, a more economical culture medium was obtained with national sources with which a higher cell concentration and maximum growth rate were achieved with respect to the commercial medium and, consequently, a lower biomass duplication time (González *et al.* 2018). This constituted the prelude for additive production and its subsequent scaling and evaluation in animals under production conditions.

In sum, field results of obtaining additives with yeasts for their use in ruminants in Cuba demonstrate its complexity and the influence of multiple factors to be taken into account to achieve good productive results. They also confirm that it is necessary to obtain products that respond to specific production situations, based on the use of medium and low quality fibrous diets as a

concentraciones de biomasa se obtuvieron para el medio YPG, con valores de 3.88 mg mL<sup>-1</sup>, mientras que para CEM fue de 2.33 mg mL<sup>-1</sup>. También hubo aumento en el pH, cuando se cultivó la cepa en medio CEM (Sosa *et al.* 2015). Estos resultados indicaron que el medio de cultivo influye en la naturaleza de los metabolitos que la cepa produce, por lo que es posible que también afecte el proceso fermentativo ruminal, cuando se incluye como aditivo en la alimentación animal.

A partir de estos antecedentes, se realizó otro trabajo para estudiar el efecto del cultivo de *P. guilliermondii* en diferentes medios en la fermentación *in vitro* de *C. nlemfuensis* (Marrero *et al.* 2016). Se utilizó la técnica de producción de gas y se evaluaron cinco tratamientos, en los que se incluyó la cepa de *P. guilliermondii* (Levica-27), cultivada en los medios caldo extracto de malta (CEM) y extracto de levadura-peptona-glucosa (YPG), se utilizó el sobrenadante de cada medio después de centrifugación y resuspensión del granulado de las células en medio tamponado. Se adicionó además, un control sin levadura. Los resultados demostraron que Levica-27, cultivada en medio YPG, estimuló la producción de gas de *C. nlemfuensis* en mayor proporción ( $P < 0.001$ ) que cuando se cultivó en medio CEM. Se corroboró la influencia de los metabolitos que producen las levaduras y su efecto estimulador en determinado medio de cultivo. Se reafirmó también la importancia de seleccionar las cepas y el medio de cultivo adecuados para su utilización como aditivo en dietas para rumiantes, de acuerdo con el alimento que se desee emplear.

Se conoce que el diseño del medio de cultivo es una de las tareas más importantes en la tecnología biológica. Según Winkler (1988), en el costo total de los productos biotecnológicos, las materias primas pueden representar entre 30 y 80 %. Además, la composición del medio de cultivo tiene que satisfacer todos los requerimientos nutricionales del microorganismo. Es por ello que las investigaciones desarrolladas se plantearon como objetivo evaluar diferentes medios de cultivo y seleccionar el que resultara más adecuado y económico para la obtención de Levica-27 a mayor escala.

Con estos estudios se obtuvo un medio de cultivo con fuentes nacionales, que resultó más económico, y con el que se logró una concentración celular y velocidad máxima de crecimiento superior con respecto al medio comercial y, consecuentemente, un tiempo inferior de duplicación de la biomasa (González *et al.* 2018). Lo antes descrito constituyó la antesala para la producción del aditivo y su posterior escalado y evaluación en animales en condiciones de producción.

A modo de resumen, los resultados en la obtención de aditivos con levaduras para su utilización en rumiantes en Cuba demuestran la complejidad de este proceso y la influencia de múltiples factores que se deben considerar para lograr buenos resultados productivos. También confirman que es necesario obtener productos que respondan a las situaciones específicas de las producciones

characteristic of Cuba and tropical countries.

### FINAL CONSIDERATIONS

Studies conducted in Cuba with yeasts demonstrate the potential of these microorganisms as activators of ruminal fermentation and their contribution to the use of fibrous diets and milk production.

The methodology for isolation and characterization of yeasts from the ruminal environment and for additive evaluation is available, useful by the Cuban and international scientific community.

There is a collection of autochthonous yeast strains, isolated from the ruminal ecosystem, with potential for use as additive for ruminants that consume fibrous diets and their records are included World Data Center for Microorganisms (WDCM) and Gen Bank

The determining effect of diet, dose, species, strain and culture medium of yeasts in ruminal fermentation is confirmed, which states the importance of selecting the appropriate strains to be used as additive in ruminant diets, in accordance with the food to be use.

It is necessary to accelerate studies to achieve the production technologies for a yeast-based additive and increase animal production with its use.

basadas en el uso de dietas fibrosas, de mediana y baja calidad, propias de Cuba y de países tropicales.

### CONSIDERACIONES FINALES

Los estudios desarrollados con levaduras en Cuba demuestran el potencial de estos microorganismos como activadores de la fermentación ruminal y su contribución a la utilización de dietas fibrosas y a la producción de leche.

Con estas investigaciones, se dispone de una metodología para el aislamiento y caracterización de levaduras procedentes del ambiente ruminal y para la evaluación de aditivos, que se hallan disponibles para la comunidad científica cubana e internacional.

Se cuenta con una colección de cepas de levaduras autóctonas, aisladas del ecosistema ruminal, con potencialidades de uso como aditivo destinado a rumiantes que consumen dietas fibrosas. Estas cepas se hallan registradas en World Data Centre for Microorganisms (WDCM) y Gen Bank

Se corrobora el efecto determinante de la dieta, dosis, especie, cepa y medio de cultivo de las levaduras en la fermentación ruminal. Esto reafirma la importancia de la selección de cepas adecuadas para su utilización como aditivo en dietas destinadas a rumiantes, de acuerdo con el alimento que se desee utilizar.

Es necesario impulsar las investigaciones para lograr las tecnologías para producir un aditivo basado en levaduras y aumentar la producción animal con el empleo de este.

### REFERENCES

- Bruno, R.G.S., Rutigliano, H.M., Cerri, R.L., Robinson, P.H. & Santos, J.E.P. 2009. "Effect of feeding *Saccharomyces cerevisiae* on performance of dairy cows during summer heat stress". *Animal Feed Science and Technology*, 150(3-4): 175-186, ISSN: 0377-8401, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2008.09.001>.
- Carro, M.D., Ranilla, M.J. & Tejido, M.L. 2006. "Utilización de aditivos en la alimentación del ganado ovino y caprino". *Pequeños Rumiantes*, 7(3): 26-37, ISSN: 1888-4865.
- Castillo, Y., Ruiz, O., Burrola, M.E., Marrero, Y., Salinas, J., Angulo, C., Corral, A., Arzola, C., Itza, M. & Camarillo, J. 2016. "Isolation and characterization of yeasts from fermented apple bagasse as additives for ruminant feeding". *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(4): 889-895, ISSN: 1678-4405, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.07.020>.
- Di Francia, A., Masucci, F., De Rosa, G., Varricchio, M.L. & Proto, V. 2008. "Effects of *Aspergillus oryzae* extract and a *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on intake, body weight gain and digestibility in buffalo calves". *Animal Feed Science and Technology*, 140(1-2): 67-77, ISSN: 0377-8401, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.02.010>.
- Elghandour, M.M.Y., Vázquez, J.C., Salem, A.Z.M., Kholif, A.E., Martínez, J.S., Camacho, L.M. & Cerrillo, M.A. 2014. "Effects of *Saccharomyces cerevisiae* at direct addition or pre-incubation on *in vitro* gas production kinetics and degradability of four fibrous feeds". *Italian Journal of Animal Science*, 13(2): 295- 301, ISSN: 1828-051X, DOI: <https://doi.org/10.4081/ijas.2014.3075>.
- Fernandes, T., Carvalho, B.F., Mantovani, H.C., Schwan, R.F. & Avila, C.L.S. 2019. "Identification and characterization of yeasts from bovine rumen for potential use as probiotics". *Journal of Applied Microbiology*, 127(3): 845-855, ISSN: 1364-5072, DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.14350>.
- Fonty, G. & Chaucheyras-Durand, F. 2006. "Effects and modes of action of live yeasts in the rumen". *Biologia*, 61(6): 741-750, ISSN: 1336-9563, DOI: <https://doi.org/10.2478/s11756-006-0151-4>.
- Galindo, J. & Marrero, Y. 2005. "Manipulation of ruminal microbial fermentation". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 39(Special Issue): 427-438, ISSN: 2079-3480.
- Galindo, J., Marrero, Y., González, N., Sosa, A., Miranda, A.L., Aldana, A.I., Moreira, O., Bocourt, R., Delgado, D. Torres, V., Sarduy, L. & Noda, A. 2010. "Effect of preparations with the viable yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and Levica-25 on methanogens and *in vitro* ruminal methanogenesis". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 44(3): 267-273, ISSN: 2079-3480.
- García, R., Marrero, Y., Galindo, J., Moreira, O., González, M. & Noda, A. 2020. "Efecto de la inclusión de *S.cerevisiae* en la producción leche y población microbiana ruminal". *Livestock Research for Rural Development*, 32(12), ISSN: 0121-3784.
- González, B., Sosa, D., García, Y. & Albelo, N. 2018. Cinética de crecimiento de *P. guilliermondii* Levica-27 en un medio de cultivo con miel de caña de azúcar. In: *Memorias VI Congreso de Producción Animal Tropical*. Palacio de las Convenciones, La Habana, Cuba, ISBN: 9789-959-7171-80-5.



- Hristov, A.N., Oh, J., Firkins, J.L., Dijkstra, J., Kebreab, E., Waghorn, G., Makkar, H.P.S., Adesogan, A.T., Yang, W., Lee, C., Gerber, P.J., Henderson, B. & Tricarico, J.M. 2013. "Special Topics-Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options". *Journal of Animal Science*, 91(11): 5045-5069, ISSN: 1525-3163, DOI: <https://doi.org/10.2527/jas.2013-6583>.
- Kumar, D.S., Srinivasa-Prasad, Ch. & Prasad, R.M.V. 2013. "Effect of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on ruminal microbial population in buffalo bulls". *Buffalo Bulletin*, 32(2): 116-119, ISSN: 0125-6726.
- Mao, H.L., Mao, H.L., Wang, J.K., Liu, J.X. & Yoon, I. 2013. "Effects of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on *in vitro* fermentation and microbial communities of low-quality forages and mixed diets". *Journal of Animal Science*, 91(7): 3291-3298, ISSN: 1525-3163, DOI: <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5851>.
- Marrero, Y., Castillo, Y., Burrola, E., Lobaina, T., Rosa, C.A., Ruiz, O., González, E. & Basso, L.C. 2011. "Morphological, biochemical, and molecular identification of the yeast Levica-25: a potential ruminal microbial additive". *Global Veterinaria*, 7(1): 60-65, ISSN: 1992-6197.
- Marrero, Y., Castillo, Y., Burrola, E., Lobaina, T., Rosa, C.A., Ruiz, O., González, E. & Basso, L.C. 2013. "Identification of Levica yeast: as potencial ruminal microbial additive". *Czech Journal of Animal Science*, 58(10): 460-469, ISSN: 1805-9309, DOI: <https://doi.org/10.17221/6995-CJAS>.
- Marrero, Y., Castillo, Y., Ruiz, O., Burrola, E. & Angulo, C. 2015. "Feeding of yeast (*Candida spp.*) improves *in vitro* ruminal fermentation of fibrous substrates". *Journal of Integrative Agriculture*, 14(3): 514-519, ISSN: 2095-3119, DOI: [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(14\)60830-3](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(14)60830-3).
- Marrero, Y., Galindo, J., Aldama, A.I., Moreira, O. & Cueto, M. 2006b. "*In vitro* effect of *Saccharomyces cerevisiae* on the microbial rumen population and fermentative indicators". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 40(3): 313-320, ISSN: 2079-3480.
- Marrero, Y., Galindo, J., Álvarez, E., Torres, V., Aldama, A.I., Boucourt, R., Elias, A. & Delgado, D. 2005. "Methodology for the isolation and characterization of yeast from the ruminal ecosystem". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 39(1): 47-52, ISSN: 2079-3480.
- Marrero, Y., Galindo, J., Elias, A., Moreira, O. & Cueto, M. 2006a. "Effect of biological preparations with viable yeasts on the microbial population in rumen and fermentative indicators in cows fed fibrous diets". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 40(3): 321-329, ISSN: 2079-3480.
- Marrero, Y., Martín, E., Rodríguez, D. & Galindo, J. 2010. "Effect of the inclusion of fractions of *Saccharomyces cerevisiae* culture on the *in vitro* ruminal fermentation of star grass (*Cynodon nlemfuensis*)". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 44(2): 157-163, ISSN: 2079-3480.
- Marrero, Y., Rodríguez, R., Torres, V., Jay, O. & Galindo, J. 2020. "Efecto de las levaduras en la producción de gas de *Cynodon nlemfuensis* en una incubación ruminal *in vitro*". *Livestock Research for Rural Development*, 32(1), Article # 1, ISSN: 0121-3784.
- Marrero, Y., Ruiz, O., Corrales, A., Jay, O., Galindo, J., Castillo, Y. & Madera, N. 2014. "*In vitro* gas production of fibrous substrates with the inclusion of yeast". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 48(2): 119-123, ISSN: 2079-3480.
- Marrero, Y., Sosa, D., Rodríguez, R. & García Y. 2016. "Inclusion of *Pichia guilliermondii* on different culture media, on *in vitro* fermentation of *Cynodon nlemfuensis*". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 50(3): 403-409, ISSN: 2079-3480.
- Mohammed, R., Vyas, D., Yang, W.Z. & Beauchemin, K.A. 2017. "Changes in the relative population size of selected ruminal bacteria following an induced episode of acidosis in beef heifers receiving viable and non-viable active dried yeast". *Journal of Applied Microbiology*, 122(6): 1483-1496, ISSN: 1365-2672, DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.13451>.
- Montes de Oca, R., Salem, A.Z.M., Kholif, A.E., Fernandez, P., Zamora, J.L., Monroy, H., Pérez, L.S. & Acosta, J. 2016. Mode of action of yeast in animal nutrition. In: *Yeast Additive and Animal Production*. Salem, A.Z.M., Kholif, A.E. & Puniya, A.K. (eds.). Ed. PubBioMed, Central Research Publishing Services, Kolkata, Bengala Occidental, India, pp. 14-20.
- Moya, D., Ferret, A., Blanch, M., Fuentes, M.C., Fandino, J.I. & Calsamiglia, S. 2017. "Effects of live yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and type of cereal on rumen microbial fermentation in a dual flow continuous culture fermentation system". *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 102(6): 1488-1496, ISSN: 1439-0396, DOI: <https://doi.org/10.1111/jpn.12975>.
- Newbold, C.J., McIntosh, F.M. & Wallace, R.J. 1998. "Changes in the microbial population of a rumen-simulating fermenter in response to yeast culture". *Canadian Journal of Animal Science*, 78(2): 241-244, ISSN: 1918-1825, DOI: <https://doi.org/10.4141/A97-086>.
- Salazar, H.G.M., Salem, A.Z.M., Kholif, A.E., Fernandez, P., Zamora, J.L., Monroy, H., Perez, L.S. & Dibarrat, J.A. 2016. Mode of action of yeast in animal nutrition. In: *Yeast Additive and Animal Production*. Salem, A.Z.M., Kholif, A.E. & Puniya, A.K. (eds.). Ed. Pub Bio Med, Central Research Publishing Services, Kolkata, Bengala Occidental, India, pp. 14-20.
- Solano, G., Cobos, V., Fernández, J.L., Ramírez R. & Cabrales, D. 2001. "Elaboration and evaluation of industrial by-products for animal feeding". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 35(4): 321-324, ISSN: 2079-3480.
- Sosa, A., González, N., García, Y., Marrero, Y., Valiño, E., Galindo, J., Sosa, D., Alberto, M., Roque, D., Albelo, N., Colomina, L. & Moreira, O. 2017. "Collection of microorganisms with potential as additives for animal nutrition at the Institute of Animal Science". *Cuban Journal of Agricultural Science*, 51(3): 311-319, ISSN: 2079-3480.
- Sosa, D., García, Y., Marrero, Y., Albelo, N. & Moreira, B. 2015. Characterization of *Pichia guilliermondii* (Levica-27) for use as microbial additive in animal production. In: *Memorias II Seminario Internacional de Sanidad Agropecuaria*. Centro de Convenciones Plaza América, Varadero, Matanzas, Cuba, p. 297, ISBN: 978-959-7125-45-7
- Thurne, M., Bach, A., Ruiz-Mereno, M., Stern, M.D. & Linn, J.G. 2009. "Effect of *Saccharomyces cerevisiae* on ruminal pH and microbial fermentation in dairy cows: yeast supplementation on rumen fermentation". *Livestock Science*, 124(1-3):



261-265, ISSN: 1871-1413, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2009.02.007>.

Winkler, M.A. 1988. "Optimisation and time-profiling in fermentation processes". *Progress in Industrial Microbiology*, 25: 91-150, ISSN: 0079-6352.

Zoumpopoulou, G., Kazou, M., Alexandraki, V., Angelopoulou, A., Papadimitriou, K., Pot, B. & Tsakalidou, E. 2018. Probiotics and prebiotics: an overview on recent trends. In: *Probiotics and Prebiotics in Animal Health and Food Safety*. Di Gioia, D. & Biavati, B (eds.). Ed. Springer. Cham, Switzerland, pp. 1-34, ISBN: 978-3-319-71950-4, DOI: [https://doi.org/10.1007/978-3-319-71950-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-71950-4_1).

**Received: September 23, 2020**

**Accepted: November 11, 2020**