

Efecto de *Aspergillus oryzae* en las poblaciones microbianas del rumen y en los productos finales de la fermentación de *Pennisetum purpureum* vc. Cuba CT-115

Areadne Sosa, Juana Galindo, Ana I. Aldana, Onidia Moreira y Niurca González

Instituto de Ciencia Animal, Apartado Postal 24, San José de las Lajas, La Habana

Correo electrónico: asosa@ica.co.cu

En una dieta basada en *Pennisetum purpureum* vc. Cuba CT-115, en condiciones *in vitro*, se determinó el efecto de la adición de *Aspergillus oryzae* en la microbiota ruminal y en algunos productos finales de la fermentación. El experimento se realizó según diseño completamente aleatorizado, con arreglo factorial 4 x 3 para los microorganismos, y 4 x 6 para los productos finales de la fermentación. Los tratamientos consistieron en un control, sin inocular, y tres vías de inclusión del aditivo: cultivo del hongo, biomasa sin medio y caldo de cultivo. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento. Como indicadores fermentativos se determinaron las concentraciones de bacterias anaerobias totales, celulolíticas, proteolíticas, hongos y protozoos, ácidos grasos de cadena corta totales (AGCCt), amoníaco y pH ruminal. Se tomaron muestras para determinar las poblaciones microbianas a las 0, 3 y 6 h, y para el pH y los productos finales de la fermentación a las 0, 3, 6, 9, 12 y 24 h. Con la adición de este aditivo aumentaron las poblaciones de bacterias anaerobias totales, celulolíticas y hongos. La concentración de AGCC totales aumentó 1.66 veces y los niveles de NH₃ disminuyeron. Con respecto a las bacterias proteolíticas, los protozoos y el pH, no se encontraron diferencias en relación con el control sin inocular. Se concluye que la adición de *Aspergillus oryzae* con su medio de cultivo favorece la fermentación ruminal *in vitro* de *Pennisetum purpureum* vc. Cuba CT-115, al incrementar determinadas poblaciones microbianas y la concentración de AGCC totales.

Palabras clave: aditivos microbianos, *Aspergillus oryzae*, cultivo discontinuo de microorganismos ruminales, alimentos fibrosos

Entre las estrategias de manipulación del ecosistema ruminal, la utilización de aditivos es de especial interés. Un gran número de sustancias, entre las que se destacan los antibióticos, ácidos orgánicos, extractos vegetales y enzimas (Carro *et al.* 2006, Guan *et al.* 2006, Eun y Beauchemin 2007 y Liu *et al.* 2007), se emplean actualmente como promotores del crecimiento. Sin embargo, la aplicación de la mayoría de estos productos químicos requiere de grandes insumos, además de ir en contra de las restricciones para la protección del medio ambiente, que cobran cada día mayor importancia a nivel mundial. Ante esta realidad, es necesario estudiar otro tipo de aditivo de origen microbiano.

Los extractos de la fermentación de *Aspergillus oryzae* se encuentran entre los productos de uso más difundido en las dietas para rumiantes. La inclusión de este tipo de aditivo provoca efectos beneficiosos, al modificar las poblaciones microbianas del rumen. El crecimiento de la microbiota ruminal estimula una mayor velocidad de degradación de la fibra y contribuye a la estabilización del pH ruminal. Esto explica el aumento de la ingestión de alimentos y de la producción de leche que se observa en los animales que consumen estos aditivos (Gómez-Alarcón *et al.* 1991, Humphry *et al.* 2002 y Kim *et al.* 2006).

Este estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de diferentes vías de inclusión de una cepa de *Aspergillus oryzae* en los microorganismos del rumen y en algunos productos finales de la fermentación de *Pennisetum purpureum* vc. Cuba CT-115, en condiciones *in vitro*.

Materiales y Métodos

Preparación del material vegetal. Como sustrato se utilizó forraje de *Pennisetum purpureum* vc. Cuba

CT-115, de 112 d de rebrote. Las plantas se sembraron en junio y estaban plenamente establecidas en un suelo ferralítico rojo típico (Hernández *et al.* 1999), sin riego ni fertilización. Se recolectaron, aproximadamente, 2 kg de tallos y hojas, de 25 plantas tomadas al azar. El corte se realizó a 20 cm del suelo. El material recolectado se secó en estufa a 60 °C, durante 48 h. Se molió hasta alcanzar tamaño de partícula de 1 mm. La MS fue de 23.5 %. La composición química del forraje se determinó mediante los métodos descritos por Herrera *et al.* (1980) y se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Composición química de *Pennisetum purpureum* vc. Cuba CT-115 que se empleó como sustrato.

Indicador	% Base Seca
PB	9.20
FDN	75.56
FDA	42.46
Celulosa	38.89
Lignina	5.85
Calcio	0.52
Fósforo	0.28
Cenizas	11.28

Obtención del contenido ruminal. Como donantes del contenido ruminal, se utilizaron dos toros mestizos Holstein x Cebú, con 450 kg como peso promedio, canulados en rumen. Se mantuvieron en condiciones de estabulación y se adaptaron a la dieta que se utilizó como sustrato, durante los 14 d previos a la toma de muestra. El líquido de rumen se extrajo mediante la cánula, con la

utilización de una bomba de vacío, antes del consumo de alimento en la mañana, según lo descrito por Kamra y Agawal (2003). Inmediatamente, las muestras se trasladaron al laboratorio, en termos con capacidad para 750 mL, con cierre hermético. Después se filtraron a través de muselina.

Determinación de las poblaciones microbianas, pH y productos finales de la fermentación. El experimento se realizó según diseño completamente aleatorizado, con arreglo factorial 4 x 3 para los microorganismos, y 4 x 6 para los productos finales de la fermentación. Se evaluaron cuatro tratamientos: 1) dieta base (*Pennisetum purpureum* vc. Cuba CT-115), 2) dieta más cultivo de *Aspergillus oryzae* (cepa H/6.28.1 de la colección del Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar, ICIDCA), 3) dieta más biomasa de *A. oryzae*, sin medio (sedimento) y 4) dieta más caldo de cultivo de *A. oryzae* (sobrenadante). Se realizaron tres repeticiones por tratamiento.

Se utilizaron tubos de centrífuga de 250 mL de capacidad, que contenían 1.5 g de forraje de *Pennisetum purpureum* vc. Cuba CT-115 y 150 mL de una mezcla de líquido de rumen y solución de saliva artificial (McDougall 1948), en proporción 1:3 (v/v). La mezcla de los componentes y la distribución en los tubos se realizó bajo corriente de CO₂, con el propósito de garantizar las condiciones de anaerobiosis.

Los tubos se incubaron y se colocaron de forma aleatoria en un baño de agua, a temperatura controlada de 39 °C, con agitación a 100 r.p.m. Se retiraron a las 0, 3, 6, 9, 12 y 24 h para la toma de muestras.

Para determinar las poblaciones microbianas, las siembras se realizaron a las 0, 3 y 6 h, en tubos rodados, en condiciones de anaerobiosis estricta (Hungate 1969). Las bacterias anaerobias totales, celulolíticas y proteolíticas se sembraron en los medios de cultivo descritos por Elías (1971). Para el cultivo de los hongos del rumen, se utilizó el medio propuesto por Joblin (1981). Las diluciones se realizaron en el medio NRF, sin agar (Elías 1971). Los conteos de colonias se hicieron con lupa. Las bacterias anaerobias totales y proteolíticas se contaron a las 72 h; las celulolíticas y los hongos a las 120 h. El pH se midió en un pH metro digital. Los protozoos se tiñeron con solución de violeta genciana (0.01 %) en ácido acético glacial (1%) (v/v) y se contaron con el microscopio óptico, en cámara de Neubauer. Los AGCC se determinaron por el método de Pennington (1952). El amoníaco se determinó según Conway (1957).

Análisis biométrico. Los resultados experimentales se procesaron mediante el programa InfoStat versión 1.1 (InfoStat 2002). Para los conteos de microorganismos, los datos se transformaron según Ln X. Para la comparación de las medias se utilizó la dócima de Duncan (1955) (P < 0.05).

Resultados y Discusión

Al analizar el comportamiento en el tiempo de los diferentes indicadores para cada tratamiento, se encontró interacción para las bacterias celulolíticas, hongos, bacterias anaerobias totales y AGCC totales. Para el resto de los indicadores, no existió esta interacción.

Con la adición de *Aspergillus oryzae* hubo aumento de las bacterias celulolíticas, los hongos y las bacterias anaerobias totales (figura 1). Estos resultados concuerdan con los informados por Varel *et al.* (1993), Varel y Kreikemeier (1994) y Beharka y Nagaraja (1998). En todos los casos, los valores máximos de crecimiento de estos microorganismos se obtuvieron a las seis horas después de iniciado el experimento, cuando se adicionó el hongo con su medio de cultivo.

Para las bacterias celulolíticas, los resultados coinciden con los de diversos autores, quienes en estudios *in vitro* encontraron incremento de estas bacterias con la adición del hongo (Wiedmeier *et al.* 1987, Frumholtz *et al.* 1989 y Newbold *et al.* 1991). Además, en estudios con cultivos puros de bacterias ruminales, se demostró que la adición de *A. oryzae* aumenta la velocidad de crecimiento de dos de las principales especies celulolíticas, *Ruminococcus albus* y *Fibrobacter succinogenes* (Beharka y Nagaraja 1998). Las bacterias celulolíticas son el grupo principal que participa en la degradación de los alimentos fibrosos. Teóricamente, el aumento en el crecimiento de estas especies implica mayor digestión de la fibra. Aunque en este estudio no se evaluó el efecto de *A. oryzae* en la digestibilidad de las fracciones fibrosas, en otras investigaciones sí se demostró incremento en este indicador, como consecuencia del aumento de las poblaciones celulolíticas (Gómez-Alarcón *et al.* 1991 y Bertrand y Grime 1997).

El incremento de las poblaciones fúngicas obtenido en este experimento coincide con los resultados de la Universidad Estatal de Washington, donde se demostró que en presencia de *A. oryzae* aumentó en 27 % la población del hongo *Neocallimastix frontalis*, predominante en el rumen (Welch *et al.* 1996). Sin embargo, Fondevila *et al.* (1990) y Oellermann *et al.* (1990) no encontraron diferencias en los hongos del rumen con la adición de *A. oryzae*. Los hongos anaerobios del rumen poseen una habilidad única para penetrar alimentos fibrosos y colonizar los tejidos altamente lignificados de los forrajes. Sus celulasas se consideran las más activas en la degradación de la celulosa cristalina. Todo esto hace que su incremento sea de gran utilidad en la degradación de forrajes de baja calidad.

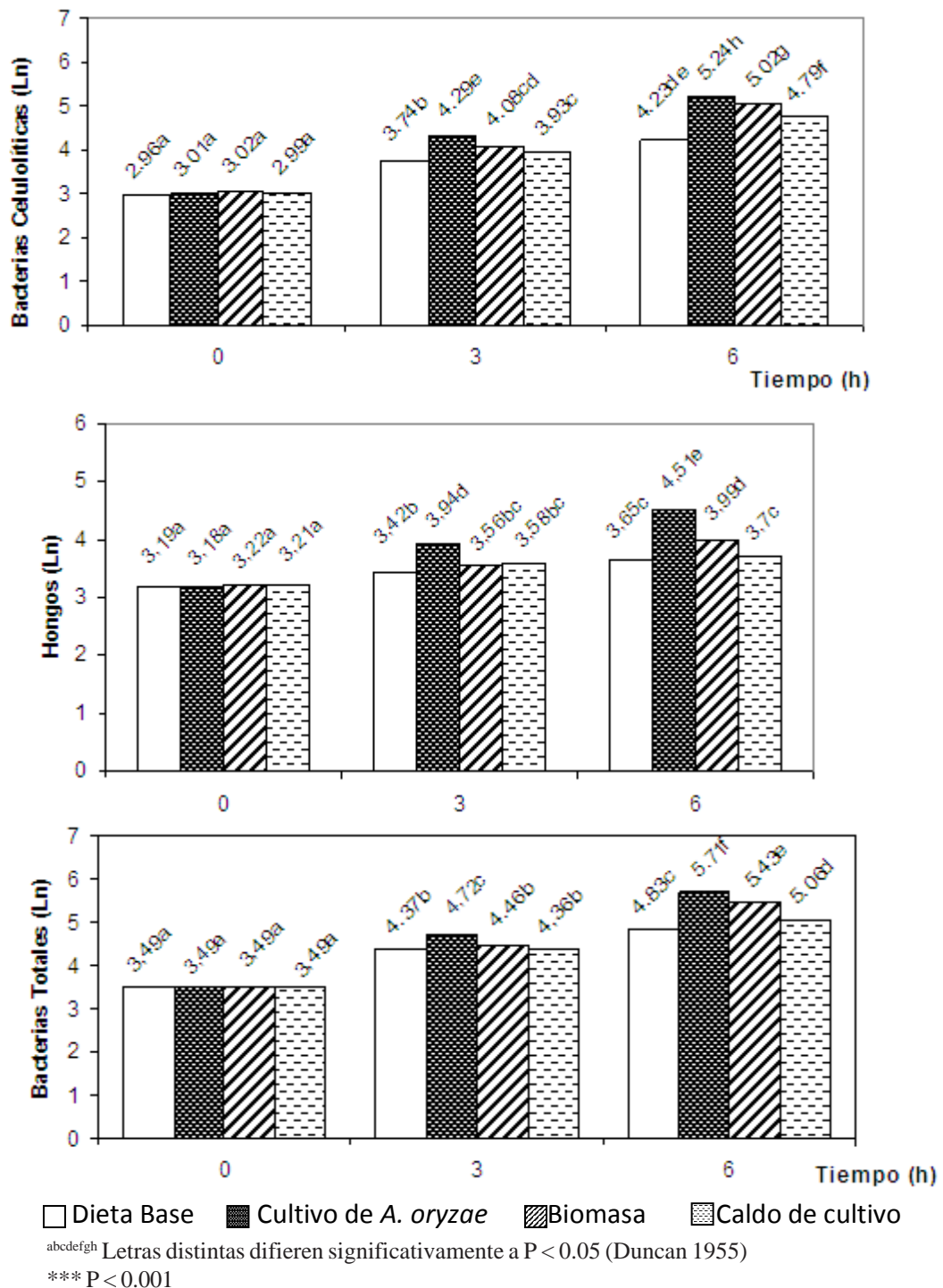


Figura 1. Efecto de las diferentes vías de inclusión de *A. oryzae* en las poblaciones de bacterias celulolíticas (10^6 ufc mL⁻¹), hongos celulolíticos (10^3 ufc » mL⁻¹) y bacterias anaerobias totales (10^{11} ufc mL⁻¹)

El incremento en el número de bacterias totales, como consecuencia de la inoculación de *A. oryzae*, ha sido informado también por Newbold *et al.* (1991), Varel *et al.* (1993) y Varel y Kreikemeier (1994), quienes utilizaron sustratos similares al de este estudio. El aumento de las poblaciones de bacterias anaerobias totales se traduce en mayor síntesis de proteína microbiana disponible para el animal. El efecto estimulador de *A. oryzae* en estos grupos microbianos conduce a pensar que esta cepa es capaz de mejorar el ecosistema ruminal, lo que podría

implicar incremento en la utilización de forrajes de baja calidad; además de contribuir a mejorar el comportamiento general del animal.

Aún no se han esclarecido los mecanismos por los que el hongo aerobio *A. oryzae* estimula el crecimiento de las poblaciones ruminales. La hipótesis de que solo pudiera ser por la acción de algún metabolito segregado durante su crecimiento es inconsistente, al observar que los mejores resultados se obtuvieron con la adición del microorganismo en su medio de cultivo, y no con los productos de su crecimiento.

En estudios con *Saccharomyces cerevisiae* se sugiere que la levadura provee factores estimuladores del crecimiento para las bacterias ruminales, como las vitaminas del complejo B o AGCC de cadena ramificada (Wiedmeier *et al.* 1987 y Jouany 2006). En el caso del hongo *A. oryzae*, algunos autores plantean que se adicionan cantidades muy pequeñas, como para que la producción de factores de crecimiento explique el incremento de las poblaciones microbianas. Sin embargo, Elías (1971) demostró que concentraciones de 0.002 mg.mL⁻¹ de vitaminas del complejo B podrían estimular el crecimiento de las bacterias del rumen. Sería necesario estudiar la producción de estas sustancias por *Aspergillus oryzae* en las condiciones del rumen, para determinar si un posible mecanismo de acción es la producción de estos factores de crecimiento.

La tabla 2 presenta el comportamiento de las bacterias proteolíticas y los protozoos ante los diferentes tratamientos. En las poblaciones de bacterias proteolíticas no hubo diferencias entre las tres vías de adición del aditivo y el control sin inocular.

No se ha encontrado información que demuestre la acción de *A. oryzae* en el crecimiento de cultivos puros de especies proteolíticas. Pocas investigaciones evaluaron el efecto del hongo en este grupo fisiológico. Solo Oellermann *et al.* (1990) observaron disminución de estas bacterias con la adición *A. oryzae*.

A pesar de su importancia en el buen funcionamiento del rumen, se presta poca atención al efecto de los aditivos microbianos en las poblaciones de protozoos. Con los tratamientos evaluados, en este estudio no se observaron diferencias en este grupo de microorganismos.

El análisis de trabajos realizados por otros autores demuestra que los resultados son variables. Frumholtz

et al. (1989) encontraron reducción de 45 % en el número de protozoos, con la adición de *A. oryzae* en condiciones *in vitro*. Sin embargo, en estudios *in vivo*, hubo aumento en el número de estos microorganismos (Oellermann *et al.* 1990).

El efecto del tiempo en las poblaciones de bacterias proteolíticas y protozoos se muestra en la tabla 3. En las bacterias proteolíticas hubo aumento de estas poblaciones a la hora seis. Este resultado se pudiera relacionar con la mayor disponibilidad de nutrientes, producto de la degradación del sustrato. Como se trata de un material con alto contenido de fibra, su degradación tiene lugar a menor velocidad que otros alimentos ricos en carbohidratos solubles. Estos, al utilizarse en menor tiempo, posibilitan que el crecimiento microbiano ocurra a horas más cercanas al inicio de la fermentación.

Con respecto a los protozoos, se observó disminución de este grupo microbiano a las 24 h. Al tratarse de un sistema *in vitro*, en el cual no hay suministro de nutrientes y el sistema presenta las condiciones de una fermentación Batch, los nutrientes se agotan y comienzan a acumularse metabolitos secundarios. Ambos aspectos pudieran influir en la disminución del número de protozoos.

En la tabla 4 se presenta el efecto de *A. oryzae* en la concentración de AGCC totales (mmol L⁻¹). Es importante destacar que las mayores concentraciones de AGCC totales se encontraron al adicionar *A. oryzae* en su medio de cultivo, a las 9, 12 y 24 h después de iniciada la fermentación, aunque la adición de la biomasa sin el medio (sedimento) también mostró diferencias, con respecto al control sin inocular.

Estos resultados concuerdan con los de otros autores, como Martin y Nisbet (1990). La explicación de

Tabla 2. Efecto de las diferentes vías de inclusión de *A. oryzae* en las poblaciones de bacterias proteolíticas y protozoos del rumen

Indicadores	Tratamientos				EE ± Sign.
	Dieta Base	Cultivo de <i>A. oryzae</i>	Biomasa	Caldo de cultivo	
Bacterias proteolíticas (10 ⁶ ufc mL ⁻¹)	3.28 (26.71)	3.33 (28.22)	3.26 (26.41)	3.28 (26.88)	0.04
Protozoos (10 ⁴ célula mL ⁻¹)	1.67 (5.85)	1.74 (6.05)	1.73 (6.10)	1.61 (5.74)	0.11

Datos transformados según Ln X.

Media de los datos originales entre paréntesis

Tabla 3. Efecto del tiempo en las poblaciones de bacterias proteolíticas y protozoos del rumen

Indicadores	Horas						EE ± Sign.
	0	3	6	9	12	24	
Bacterias proteolíticas (10 ⁶ ufc mL ⁻¹)	3.19 ^a (24.52)	3.21 ^a (24.83)	3.46 ^b (31.82)	-	-	-	0.04***
Protozoos (10 ⁴ célula mL ⁻¹)	1.71 ^b (5.82)	1.86 ^b (6.68)	1.77 ^b (7.25)	1.84 ^b (6.44)	1.68 ^b (5.71)	1.26 ^a (3.72)	0.14*

^{ab} Valore con letras no comunes por fila difieren a P<0.005 (Duncan 1955). Datos transformados según Ln X. Media de los datos originales entre paréntesis. * P < 0.01 *** P < 0.001

Tabla 4. Efecto de las diferentes vías de inclusión de *A. oryzae* en la concentración de AGCC totales (mmol/L)

Horas	Tratamientos				EE ± Sign.
	Dieta Base	Cultivo de <i>A. oryzae</i>	Biomasa	Caldo de cultivo	
0	35.16 ^a	34.69 ^a	34.93 ^a	34.69 ^a	
3	42.01 ^b	46.73 ^c	44.13 ^{bc}	41.42 ^b	
6	47.08 ^c	62.30 ^f	56.29 ^e	51.68 ^d	1.45***
9	51.92 ^d	75.52 ^h	71.04 ^g	58.53 ^{ef}	
12	55.69 ^d	84.96 ⁱ	79.30 ^h	59.47 ^{ef}	

abcedefghij Letras distintas difieren significativamente a P < 0.05 (Duncan 1955)

*** P < 0.001

este aumento podría ser la mayor utilización del sustrato, debido al incremento de determinadas poblaciones del rumen. Sin embargo, en algunos estudios *in vivo*, no se observaron cambios en las concentraciones de AGCC totales (Gómez -Alarcón *et al.* 1990, Caton *et al.* 1993 y Varel y Kreikemeier 1994).

La magnitud de la síntesis de AGCC es un indicador de la utilización potencial del alimento en los animales rumiantes (Kamra y Agarwal 2004). El hecho de que en este estudio aumentaran las concentraciones de AGCC totales con la adición del hongo, indica que hubo mayor utilización del sustrato. Por tanto, el uso de este aditivo podría mejorar la eficiencia de producción de los animales que lo consuman.

En la tabla 5 se muestran los valores de pH y amoníaco. La adición de *A. oryzae* no modificó el pH del medio en las condiciones experimentales de esta investigación. En la mayoría de los trabajos, donde se incluye este aditivo microbiano, no se observaron alteraciones en el pH ruminal (Caton *et al.* 1993 y Varel y Kreikemeier 1994).

En el caso del NH₃, hubo disminución en todos los tratamientos, con respecto al control sin inocular. Esto se puede deber al aumento de la síntesis de proteína microbiana, lo que concuerda con el incremento de las poblaciones de bacterias totales, celulolíticas y hongos. Este resultado coincide con lo informado por William y Newbold (1990), quienes afirman que al incorporar cultivos fúngicos a la alimentación de rumiantes, se reducen los niveles de nitrógeno amoniacal, probablemente como consecuencia de la elevada utilización de amonio para la síntesis de proteína microbiana. Kamra y Agarwal (2004) también plantearon que la adición de *A. oryzae* incrementa la síntesis de proteína microbiana, y estimula así el crecimiento de bacterias específicas.

Varios autores observaron que la adición de *A. oryzae* estimula la producción de NH₃ por la microbiota ruminal (Arambel *et al.* 1987, Frumholtz *et al.* 1989 y Martin y Nisbet 1990), lo que sugiere que los aditivos microbianos propician la proteólisis *in vitro*. En el presente estudio, al igual que en otros (Oellermann *et al.* 1990 y Martin y Nisbet 1992), no se observó este incremento. Esto puede obedecer a que el nivel proteico del sustrato utilizado

Tabla 5. Efecto de las diferentes vías de inclusión de *A. oryzae* en el pH y la concentración de amoníaco ruminal.

Indicadores	Tratamientos				EE ± Sign.
	Dieta Base	Cultivo de <i>A. oryzae</i>	Biomasa	Caldo de cultivo	
pH	7.46	7.47	7.46	7.48	0.05
NH ₃ (mmol L ⁻¹)	23.72 ^c	21.37 ^b	20.21 ^c	19.16 ^a	0.69***

abc Letras distintas difieren significativamente a P < 0.05 (Duncan 1955)

*** P < 0.001

Entre las acciones de los aditivos en los rumiantes se encuentra su efecto en la estabilización del pH, debido a que son capaces de estimular el crecimiento y la utilización de lactato por *Megasphaera elsdenii*, *Selenomonas lactilytica* y *Selenomonas ruminantium* (Martin y Nisbet 1992 y Beharka y Nagaraja 1998). La acción estabilizadora del pH de estos microorganismos quizá sea más evidente en dietas altas en concentrado, donde el pH es más bajo, debido a la producción de ácidos orgánicos, fundamentalmente de ácido láctico, producto de la rápida fermentación de alimentos ricos en almidón (Elías 2004).

no era lo suficientemente alto, como para que se expresara el aumento de las bacterias proteolíticas.

En la tabla 6 se muestra el efecto del tiempo en el pH ruminal y en las concentraciones de amoníaco. Con respecto al pH ruminal, hubo aumento a las tres horas de iniciada la fermentación. Esto pudiera deberse a la utilización del CO₂ disuelto en las primeras horas, lo que provoca incremento de la concentración de cationes metálicos (Na⁺, K⁺, Ca²⁺ y Mg²⁺), que a estas horas de fermentación no son neutralizados por el insuficiente incremento en las concentraciones de AGCCt. El pH se

Tabla 6. Efecto del tiempo en el pH y la concentración de amoníaco ruminal.

Indicadores	Horas						EE ± Sign.
	0	3	6	9	12	24	
pH	7.26 ^a	7.64 ^c	7.49 ^{bc}	7.48 ^{bc}	7.49 ^{bc}	7.44 ^{ab}	0.06*
NH ₃ (mmol L ⁻¹)	20.56	21.24	21.39	23.06	19.53	20.90	0.85

^{abc} Letras distintas difieren significativamente a P < 0.05 (Duncan 1955)

* P < 0.01

mantiene constante en el transcurso de la fermentación, debido al efecto amortiguador de la solución de saliva artificial en el incremento de concentraciones de AGCCt.

Para el amoníaco no se constataron diferencias entre los horarios de muestreo. Este comportamiento pudiera obedecer al equilibrio entre la producción de amoníaco, como consecuencia de la degradación de la urea en la solución de incubación, y el sustrato utilizado, así como a la utilización de este amoníaco para la síntesis de proteína microbiana.

Se concluye que la adición de *Aspergillus oryzae* influye favorablemente en la fermentación ruminal de *Pennisetum purpureum* vc. Cuba CT-115, al aumentar las poblaciones de bacterias anaerobias totales, bacterias celulolíticas y hongos, y al incrementar la concentración de AGCC totales, en condiciones *in vitro*. Se concluye además, que los mejores resultados en la activación de la fermentación ruminal se obtienen al inocular el hongo *A. oryzae* con su medio de cultivo.

Referencias

- AOAC. 1995. Official Methods of Analysis. 15th Ed. Assoc. Off Anal. Chem. Arlington, V.A.
- Arambel, M.J., Wiedmeier, R.D. & Walters, J.L. 1987. Influence of donor animal adaptation to added yeast culture and/or *Aspergillus oryzae* fermentation extract on *in vitro* rumen fermentation. Nutr. Rep. Int. 35:433
- Beharka, A.A. & Nagaraja, T.G. 1998. Effect of *Aspergillus oryzae* extract alone or in combination with antimicrobial compounds on ruminal bacteria. J. Dairy Sci. 81:1591
- Bertrand, J.A. & Grimes, L.W. 1997. Influence of tallow and *Aspergillus oryzae* fermentation extract in dairy cattle rations. J. Dairy Sci. 80:1179
- Carro, M.D., Ranilla, M.J., Giráldez, F.J. & Mantecón, A.R. 2006. Effects of malate on diet digestibility, microbial protein synthesis, plasma metabolites, and performance of growing lambs fed a high-concentrate diet. J. Anim. Sci. 84:405
- Caton, J.S., Erickson, D.O., Carey, D.A. & Ulmer, D.L. 1993. Influence of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on forage intake, site of digestion, *in situ* degradability, and duodenal amino acid flow in steers grazing cool-season pasture. J. Anim. Sci. 71:779
- Conway, E.C. 1957. Microdiffusion analysis and volumetric error. 4th Edition, Crosby Lackwood, Sons, Ltd, London
- Duncan, D.E. 1955. Multiple range and multiple F. test. Biometrics 11:1
- Elías, A. 1971. The rumen bacteria of animals fed on a high-molasses-urea-diet. Tesis PhD, Aberdeen.
- Elías, A. 2004. Efectos de las fuentes de energía en la población microbiana ruminal de terneros Friesian. Rev. Cubana Cienc. Agríc. 38:381
- Eun, J.S. & Beauchemin, K.A. 2007. Assessment of the efficacy of varying experimental exogenous fibrolytic enzymes using *in vitro* fermentation characteristics. Anim. Feed Sci. Tech. 132:298
- Fondevila, M., Newbold, C.J., Hotten, P.M. & Orskov, E.R. 1990. A note on the effect of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on the rumen fermentation of sheep given straw. Anim. Prod. 51:422
- Frumholtz, P.P., Newbold, C.J. & Wallace, R.J. 1989. Influence of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on the fermentation of a basal ration in the rumen simulation technique (Rusitec). J. Agr. Sci. 113:169
- Gómez -Alarcón, R.A., Dudas, C. & Huber, J.T. 1990. Influence of cultures of *Aspergillus oryzae* on rumen and total tract digestibility of dietary components. J. Dairy Sci. 73:703
- Gómez -Alarcon, R.A., Huber, J.T., Higginbotham, G.E., Wiersma, F., Ammon, D. & Taylor, B. 1991. Influence of feeding *Aspergillus oryzae* fermentation extract on the milk yields, eating patterns and body temperatures of lactating cows. J. Anim. Sci. 69:1733
- Guan, H., Wittenberg, K.M., Ominski, K.H. & Krause, D.O. 2006. Efficacy of ionophores in cattle diets for mitigation of enteric methane. J. Anim. Sci. 84:1896
- Hernández, A., Pérez, J.M. & Bosch, D. 1999. Nueva versión de clasificación genética de los suelos de Cuba. AGRINFORMINAGRI. Ciudad de La Habana, Cuba. p. 26
- Herrera, R.S., González, S.B., Hardy, C., Pedroso, D.M., García, M., Senra, A., Ríos, C., García, R., Irigoyen, E. & Cuesta, A. 1980. Evaluación química de pastos, forrajes y heno. En: Análisis Químico de los Pastos. Metodología para las tablas de su composición. Eds. R.S. Herrera, S.B. González, C. Hardy y D.M. Pedroso. Ciudad de La Habana, Cuba. p. 23
- Humphry, J.B., Coffey, K.P., Moyer, J.L., Brazle, F.K. & Lomas, L.W. 2002. Intake, digestion, and digestive characteristics of *Neotyphodium coenophialum*-infected and uninfected fescue by heifers offered hay diets supplemented with *Aspergillus oryzae* fermentation extract or laidlomycin propionate. J. Anim. Sci. 80:225
- Hungate, R.E. 1969. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. En: Methods in Microbiology. Ed. I.R. Norris and E.W. Rbbons. Vol.3. Academic Press. New York. p.117
- InfoStat. 2002. InfoStat professional. Versión 1.1 Universidad de Córdoba. Estadística y Diseño- F.C.A. Córdoba, Argentina
- Joblin, K.N. 1981. Isolation, enumeration and maintenance of rumen anaerobic fungi in roll tubes. Appl. Environ. Microbiol. 42:1119
- Jouany, J.P. 2006. Optimizing rumen functions in the close-up transition period and early lactation to drive dry matter intake and energy balance in cows. Anim. Reprod. Sci. 96:250
- Kamra, D.N. & Agawal, N. 2003. Sampling of Rumen Contents. En: Techniques in rumen microbiology. Indian Veterinary Res. Institute. Izatnagar. India. p. 7

- Kamra, D.N. & Agawal, N. 2004. Bacteria and fungi of non-rumen origin. En: Probiotics as feed additives for the ruminants. Indian Veterinary Res. Institute. Izatnagar. India. p. 36
- Kim, H.S., Ahn, B.S., Chung, S.G., Moon, Y.H., Ha, J.K., Seo, I.J., Ahn, B.H. & Lee, S.S. 2006. Effect of yeast culture, fungal fermentation extract and non-ionic surfactant on performance of Holstein cows during transition period. *Anim. Feed Sci. Tech.* 126:23
- Liu, C., Li, Z., Du, J. & Shan, A. 2007. The Effect of *Yucca schidigera* extract on ruminal fermentation and parameters traits in sheep. *Agricultural Sci. China.* 6:121
- Martin, S.A. & Nisbet, D.J. 1990. Effects of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on fermentation of amino acids, bermudagrass and starch by mixed ruminal microorganism *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 68:2142
- Martin, S.A. & Nisbet, D.J. 1992. Effect of Direct-Fed Microbials on Rumen Microbial Fermentation. *J. Dairy Sci.* 75:1736
- McDougall, E.I. 1948. Studies on ruminant saliva. I. The composition and output of sheep saliva. *Biochem. J.* 43:99
- Newbold, C.J., Brock, R. & Wallace, R.J. 1991. Influence of autoclaved or irradiated *Aspergillus oryzae* fermentation extract on fermentation in the rumen simulation technique (Rusitec). *J. Agr. Sci.* 116:159
- Oellermann, S.O., Arambel, M.J., Kent, B.A. & Walters, J.L. 1990. Effect of graded amounts of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on ruminal characteristics and nutrient digestibility in cattle. *J. Dairy Sci.* 73:2413
- Pennington, R.G. 1952. The metabolism of short chain fatty acid in sheep. I. Fatty acids utilization by rumen epithelium on other tissues. *Biochem. J.* 51:251
- Varel, V.H. & Kreikemeier, K.K. 1994. Influence of feeding *Aspergillus oryzae* fermentation extract (Amaferm) on *in situ* fiber degradation, ruminal fermentation, and microbial protein synthesis in nonlactating cows fed alfalfa or brome grass hay. *J. Anim. Sci.* 72:1814
- Varel, V.H., Kreikemeier, K.K., Jung, H.G. & Hatfield, R.D. 1993. *In vitro* Stimulation of Forage Fiber Degradation by Ruminal Microorganisms with *Aspergillus oryzae* Fermentation Extract. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:3171
- Welch, R.P., Tsai, K.P., Harper, E.G., Chang, J.S., Calza, R.E. 1996. The effect of *Aspergillus oryzae* fermentation extract on the anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* EB 188: effects on physiology. *Appl. Microb. Biotech.* 45:811
- Wiedmeier, R.D., Arambel, M.J. & Walters, J.L. 1987. Effect of yeast culture and *Aspergillus oryzae* fermentation extract on ruminal characteristics and nutrient digestibility. *J. Dairy Sci.* 70:2063
- Williams, P.E.V. & Newbold, C.J. 1990. Rumen probiosis: the effects of novel microorganisms on rumen fermentation and ruminant productivity. En: Recent advances in animal nutrition. Eds. W. Haresign and D.J.A. Cole. Butterworths, London, England. p. 211

Recibido: 30 de abril de 2009