

Procesos implicados en la digestión microbiana de los forrajes de baja calidad

Factors involved in microbial digestion of low-quality forages

Manuel Fondevila¹

Resumen

En este artículo se revisan los mecanismos de unión y actividad enzimática contra los polisacáridos de la pared celular de los forrajes en el rumen, los organismos envueltos en la degradación y las restricciones físicas, químicas y ambientales que afectan al proceso. La adhesión microbiana a las partículas de es un paso esencial en la digestión de los polisacáridos de la pared celular. La adhesión específica de las bacterias envueltas es mediada por tres estructuras: glicocalix, celulosomas y dominios de unión celulásica, dichos mecanismos y su importancia son discutidos. La degradación de la celulosa, hemicelulosa o pectina es llevada a cabo por diferentes complejos enzimáticos, donde varias enzimas actúan específicamente a los enlaces entre las unidades de carbohidratos. La habilidad de los organismos para digerir la pared celular depende de la forma, diversidad y modo de acción de estas enzimas. Los microorganismos de los tres grupos principales presentes en el rumen son capaces de degradar polisacáridos estructurales, pero la importancia de los géneros envueltos y especies de protozoarios, hongos o bacterias en la digestión total de la pared celular de los forrajes depende de tres tipos de factores: ecológicos, como su abundancia en el rumen o su relación con otras especies microbianas; factores relacionados al sustrato, como la estructura anatómica y composición química de los forrajes; y las condiciones ambientales para la fermentación. Excepto para interacciones microbianas, que serán tratadas en otra parte, los restantes puntos serán discutidos.

Palabras claves: digestión microbiana, adhesión, estructura del forraje, condiciones ambientales.

Abstract

This paper reviews the mechanisms of microbial attachment to and enzymatic activity against forage cell wall polysaccharides in the rumen, the organ-

Recibido el 08-07-1997 • Aceptado el 10-12-1997

1. Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Universidad de Zaragoza. M. Servet 177, 50013 Zaragoza, España. Fax: 976-761612. e-mail: mfonde@posta.unizar.es

isms involved in degradation and the physical, chemical and environmental constraints that affect the process. Microbial adhesion to forage particles is an essential step in digestion of cell wall polysaccharides. Specific adhesion of the bacteria involved is mediated by three structures: glicocalix, cellulosomes and cellulase binding domains, whose mechanisms and importance are discussed. Degradation of cellulose, hemicellulose or pectin is carried out by different enzymatic complexes, where various enzymes attack specifically the bonds among the carbohydrate units. The ability of organisms to digest cell wall depends on the kind, diversity and mode of action of these enzymes. Microorganisms of the three main groups present in the rumen are capable of degrading structural polysaccharides, but the importance of the involved genus and species of protozoa, fungi or bacteria in the overall digestion of forage cell wall depends on three types of factors: ecological, such as their abundance in the rumen or their relationship with other microbial species; substrate-related factors, like the anatomic structure and chemical composition of forages; and the environmental conditions for fermentation. Except for microbial interactions, which will be treated elsewhere, the remaining points are discussed.

Key words: microbial digestion, adhesion, forage structure, environmental conditions.

Introducción

El principal interés productivo del ganado rumiante reside en su capacidad de aprovechar como nutrientes los productos de la digestión microbiana de la pared celular vegetal, que tiene lugar fundamentalmente en el rumen. Desde este punto de vista, la explotación de recursos lignocelulósicos de baja calidad, por su relativa abundancia y bajo costo económico, tiene especial trascendencia en sistemas extensivos y semi-intensivos de producción, especialmente en regiones con escasa disponibilidad de otras fuentes de alimento para el ganado. El conocimiento de los mecanismos implicados en la acción de la población ruminal sobre los forrajes es fundamental para la optimización de la utilización de éstos.

Dos son las etapas en que se lleva

a cabo la digestión microbiana de los polisacáridos estructurales en el rumen: en primer lugar, la colonización de los substratos que llegan al rumen y la adhesión íntima de los microorganismos a estas estructuras vegetales; en segundo lugar, la acción enzimática sobre dichos substratos, independientemente de la posible utilización de los productos resultantes. La magnitud de estos procesos está mediatizada por la naturaleza de la pared celular vegetal, por las características de la población microbiana implicada en dichos procesos, y por las condiciones del ambiente ruminal para favorecer o limitar estos procesos.

La adhesión como proceso previo a la digestión de polisacáridos estructurales. Los microorganismos ruminales son clasificados

por Czerkawski y Cheng (19) en tres subpoblaciones, atendiendo a su interacción con las partículas de alimento: 1) los vehiculados con el fluido ruminal; 2) los débilmente asociados con las partículas; y 3) los firmemente adheridos a dichas partículas. Dentro del primer grupo se encuentran los microorganismos que utilizan los nutrientes solubles del líquido ruminal, además de los que se van desprendiendo de las partículas de alimento. Como organismos libres, tienen escaso papel en la digestión de las partículas sólidas, pero muchos de ellos poseen capacidad de adhesión, y son los que de hecho inician el proceso de colonización de nuevas partículas.

Los dos grupos restantes suponen entre el 70 y el 80% de la población ruminal (31). Los organismos débilmente adheridos pueden ser desprendidos por lavado de las partículas, y se adhieren generalmente por mecanismos inespecíficos que implican atracciones fisicoquímicas (60), o interactúan con otros microorganismos adheridos a las partículas (66).

La adhesión íntima al sustrato permite una mayor eficiencia de hidrólisis enzimática y una mayor disponibilidad de los productos de la digestión de la pared, además de proteger de la predación de otras especies y de aumentar el tiempo de retención en el rumen (17, 26). La importancia de la adhesión de las bacterias celulolíticas a la pared celular para la degradación de ésta ha sido puesta de manifiesto en diversos trabajos (47, 55), y Cheng y col. (16) llegan a considerarlo como requisito indispensable. Especies bacterianas sin

capacidad adherente, o cepas no adherentes de las especies celulolíticas tienen una trascendencia mínima en la digestión de los polisacáridos de la pared celular (53, 55). La adhesión puede estar sujeta a adaptación (51), como muestra la pérdida de la capacidad adherente a celulosa de *Fibrobacter succinogenes* tras cultivos sucesivos en un medio con celobiosa como único sustrato (62).

El conocimiento de los mecanismos celulares de adhesión de los protozoos y hongos ruminales es escaso (51). Las estructuras específicas implicadas en la adhesión bacteriana han sido revisadas por Pell y Schofield (60), que las resumen en 3: glicocálix, celulosomas y sectores de enlace de enzimas celulolíticas. Estos últimos serán comentados en el Apartado 3. La cápsula glicoproteica externa que envuelve a las bacterias celulolíticas principales (*F. succinogenes*, *Ruminococcus albus* y *R. flavefaciens*) es denominada glicocálix, y ha sido puesta en evidencia fundamentalmente a partir de estudios de microscopía electrónica (49, 65). Los glicocálices de ambas especies de *Ruminococcus* son más gruesos que el de *F. succinogenes*, por lo que su adhesión es menos sensible a la incidencia de factores ambientales que la de este último (62), como se desprende del cuadro 1. En *F. succinogenes*, diversas proteínas, junto con algunos lípidos, de la superficie celular, deben estar implicadas en los procesos de adhesión (33)

Los celulosomas son estructuras extracelulares identificadas empleando cultivos de *Clostridium thermoceilum*

no ruminal, como modelo (48). Son complejos polipeptídicos esféricos que incluyen un paquete enzimático con actividad celulasa, agrupando las enzimas entre sí por la acción de un polipéptido sin actividad hidrolítica, que además está implicado en la adhesión del celulosoma al substrato (10, 50). Los celulosomas, al favorecer el contacto íntimo de la bacteria y de sus enzimas con las partículas vegetales, aumentan la magnitud de la acción enzimática sobre éstas. Aunque se ha constatado la presencia de celulosomas en las especies celulolíticas ruminales (42), se desconoce si su función y modo de acción es similar a la de los de *Cl. thermocellum*.

Actividad enzimática frente a polisacáridos estructurales. Este tema ha sido objeto recientemente de numerosas revisiones (25, 26, 70). Las enzimas implicadas en los diversos procesos de degradación de celulosa y hemicelulosas de la pared celular vegetal (figura 1) parecen estar muy distribuidas entre las especies celulolíticas de microorganismos ruminales. Como ejemplo, *F. succinogenes*, uno de los organismos más estudiados, produce al menos 8 glucanasas diferentes, una celodextrinasa, una celobiosidasa y una celobiasa, además de una endoxilanasas, una β -glucuronidasa, varias esterases y una arabinofuranosidasa (26). Los hongos ruminales también producen un complejo enzimático celulasa muy activo frente a celulosa cristalina, además de xilanasas muy activas y altos niveles de ferúlico y cumárico esterases (15). El protozoo *Polyplastron multivesiculatum* produce una endoglucanasa y una β -

glucosidasa (13).

Las enzimas de *F. succinogenes* son muy activas frente a celulosa cristalina, pero esta acción es mínima en extractos libres de células. Por contra, las celulasas de *R. flavefaciens* mantienen su actividad en ausencia de las células productoras (25).

Se ha observado que algunos de los complejos enzimáticos celulolíticos de los organismos ruminales poseen, además de su parte catalítica, responsable de la actividad hidrolítica *per se*, una parte responsable de la adhesión de la enzima al substrato (32, 52), que aumenta por ello la eficiencia de la acción enzimática. Considerando la localización superficial de las enzimas celulolíticas en las bacterias ruminales, estos sectores de enlace de las enzimas (*cellulose binding domains*) contribuyen también a la adhesión microbiana al substrato.

En la práctica, la especificidad de acción de estas enzimas no es tanta como lo que sugieren sus nombres. De hecho, es el tipo de enlace sobre el que actúan lo que determina su especificidad, pudiendo atacar un mismo tipo de enzima tanto las cadenas de celulosa como de xilano. La gran diversidad de enzimas que se aprecia en la figura 1 se justifica teniendo en cuenta la variabilidad y complejidad de la estructura química de la pared celular vegetal (ver apartados posteriores). Por otra parte, es curioso que cada microorganismo, en lugar de una sola, produce varias enzimas que actúan de forma muy similar.

Se asume que el proceso de digestión enzimática de la celulosa en el rumen sigue el modelo observado en

Cuadro 1. Efecto de diversos factores ambientales sobre la adhesión de las principales bacterias celulolíticas (60).

Tratamiento	<i>R. albus</i>	<i>F. succinogenes</i>	<i>R. flavefaciens</i>
Oxígeno	↔	↓ 80 %	↔
Temperatura	4 °C ↓100 % 38 °C ↔	4 °C ↓100 % 38 °C ↔	4 °C ↓100 % 38 °C ↔
pH	4,5 - 5 ↓; 5,5 - 8 ↔	5,3 - 6,8 ↔	4 ↓55 %; 6 ↔; 8 ↓ 40 %
Glucosa	1 % ↑		0,01 M ↔; 0,18 % ↔
Celobiosa	1 % ↓ 8 %; 1 % ↑	1 % ↓ 73 %	1 % ↓ 24 %; 0,34 % ↔
Amilopectina	0,25 % ↓ 70 %	0,25 % ↓ 43 %	0,25 % ↓ 68 %
Cationes	Ca ⁺⁺ ↓; ↔	Ca ⁺⁺ y Mg ⁺⁺ ↔	Ca ⁺⁺ y Mg ⁺⁺ ↑
Metilcelulosa	0,05 % ↓ 97 %; 0,1 % ↓ 30 %	0,05 % ↓ 90 %; 0,1 % ↓ 70-80 %; ↓30%	0,1 % ↓ 100 %; ↓ 30 %
Proteasa	↓	↓	

los hongos aerobios. Este proceso se inicia con el ataque de endo-1,4 β glucanasa (celobiohidrolasa) a las regiones más amorfas de la celulosa, rompiendo aleatoriamente las cadenas en celodextrinas y creando así extremos libres para la acción de exo-1,4 β glucanasa, que liberan unidades de celobiosa a partir del extremo de la cadena. Estas celobiosas son final-

mente hidrolizadas a glucosa por β -glucosidasas. Las xilanasas están más ampliamente distribuidas entre las bacterias ruminales que las celulasas, aunque hay que tener en cuenta la mayor diversidad de las enzimas implicadas en la hidrólisis de las hemicelulosas, debida a la propia variabilidad en la composición de este polisacárido.

Organismos implicados en la digestión de la pared celular vegetal

Protozoos. El efecto de los protozoos sobre la digestión de la fibra vegetal depende del papel y de la importancia relativa de los distintos géneros y especies en el ecosistema ruminal (45, 71). En general, la presencia de protozoos aumenta, directa o indirectamente, la digestión ruminal de celulosa y hemicelulosas respecto a animales defaunados. Aunque las actividades enzimáticas endoglucanasa, β -celobiosidasa y β -glucosidasa —implicadas en la hidrólisis de celulosa— por una parte, y hemicelulasa y xilanasas, por otra, están ampliamente distribuidas entre los protozoos del rumen (72), se continúa especulando si su acción puede ser debida, al menos en parte, a las bacterias que contienen (20).

A partir de estudios con protozoos cultivados *in vitro*, tratados con antibióticos para eliminar la posible contaminación bacteriana (cuadro 2), se ha observado que la celulosa cristalina (avicel) es degradada en un 30% por protozoos de los géneros *Eudiplodinium* y *Polyplastron*, y en un 10% por *Epidinium* (45). La

capacidad de degradar celulosas sustituidas (hexaetilcelulosa, carboximetilcelulosa) es mayor para todos los géneros, siendo más limitada en *Entodinium* e *Isotricha*. Sin embargo, el crecimiento en medios que incluyen polisacáridos estructurales como única fuente de energía respecto a un medio sin sustrato (cuadro 3) es muy variable, y sólo *Eudiplodinium* y *Epidinium* responden positivamente a la incorporación de una fuente de celulosa o de xilano.

Entre los *Ophryoscolecidos*, los protozoos de los géneros *Eudiplodinium*, *Polyplastron* y *Epidinium* son activos degradadores de xilano, utilizándolo como fuente de nutrientes, y degradan celulosas sustituidas con bajo grado de cristalinidad, aunque no son capaces de utilizar los productos de su hidrólisis. Sólo los dos primeros géneros mencionados son capaces de digerir y utilizar celulosa cristalina. Los protozoos del género *Entodinium* no son capaces de actuar frente a este tipo de sustratos, mientras que los protozoos del género *Isotricha* tienen cierta actividad β -

Cuadro 2. Degradación (%) de sustratos celulósicos (HEC, hexaetilcelulosa; CMC, carboximetilcelulosa) por cultivos puros de protozoos (24 h; 45)

	Avicel	HEC	CMC
<i>Eudiplodinium</i>	24,9 ± 7,8	62,0 ± 3,8	62,8 ± 0,7
<i>Polyplastron</i>	30,6 ± 2,9	55,2 ± 5,5	60,3 ± 1,3
<i>Epidinium</i>	10,0 ± 2,7	62,3 ± 0,9	63,7 ± 2,6
<i>Entodinium</i>	trazas	28,7 ± 1,7	22,7 ± 1,1
<i>Isotricha</i>	5,4 ± 1,7	54,1 ± 0,8	42,3 ± 3,9

glucanasa, pero no utilizan los productos de la hidrólisis para su crecimiento (45, 72). La capacidad de depolimerizar pectina está presente en algunas especies de protozoos, pero la posibilidad de utilizar los productos liberados como fuente de energía es mínima (59).

La capacidad de los protozoos de adherirse a las partículas de pared celular es reducida, excepto en el caso de los holótricos, estimulados probablemente por quimiotactismo hacia azúcares solubles (9, 59), aunque su actividad fibrolítica es escasa. Los *Epidinium* se adhieren a las partículas por una zona situada en su parte anterior; luego, vierten enzimas extracelulares que van rompiendo los tejidos vegetales en pequeños fragmentos que son entonces ingeridos y digeridos intracelularmente (9). Los grandes entodiniomorfos únicamente tienen actividad enzimática intracelular, y por ello ejercen su acción degradativa ingiriendo partículas suspendidas en el medio, que luego digieren intracelularmente (12).

Hongos. La población de hongos anaerobios del rumen está directamente relacionada con el contenido en fibra de la dieta, y su proporción disminuye en dietas ricas en almidón

o azúcares solubles (34). Los hongos ruminales tienen capacidad enzimática de hidrolizar celulosa y xilano, aunque parece que no pectina (29, 39). Lógicamente, su actividad enzimática frente a estos sustratos es variable dependiendo de su origen filogenético, en especial de su estructura rizoidal, pero se ha postulado que algunas especies, como *Neocallimastix frontalis*, *Piromyces comunis* y *Orpinomyces joyonii* son tanto o incluso más eficientes en la digestión de los polisacáridos estructurales como las especies bacterianas más activamente celulolíticas (11, 14).

La acción fúngica sobre la pared celular vegetal (cuadro 4) y su contribución a la digestión ruminal de ésta, parece estar muy relacionada con su activa colonización. Se ha observado mediante microscopía electrónica que las zoosporas son atraídas por quimiotactismo (9), y se adhieren rápidamente a las partículas, preferentemente en estomas y zonas de corte de los tejidos lignificados (esclerenquima, xilema), aunque los tejidos vegetales no lignificados (floema, parénquima medular) son los más rápidamente degradados (2, 34). En este sentido, los hongos ruminales son especialmente activos

Cuadro 3. Proporción (% respecto al inicio del cultivo) de protozoos vivos respecto a un medio control sin sustrato tras 24 h de cultivo (45).

	Control	Almidón	Avicel	Xilano	CMC
<i>Eudiplodinium</i>	< 5	401	147	200	< 5
<i>Polyplastron</i>	34	85	58	60	15
<i>Epidinium</i> 6	12	9	100	< 5	
<i>Entodinium</i>	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
<i>Isotricha</i>	95	181	89	77	103

frente a sustratos muy lignificados (44). De hecho, aunque no está probada su capacidad de utilización de lignina como fuente de nutrientes, *N. frontalis* puede solubilizar pequeñas cantidades de lignina de la pared celular vegetal (2, 39), probablemente debido a la solubilización de compuestos fenólicos, en mayor medida que las bacterias (14), aumentando la accesibilidad de los polisacáridos estructurales para las bacterias. Los hongos ruminales, a diferencia de algunas bacterias, no son capaces de fermentar los compuestos fenólicos (3). Por otra parte, la acción mecánica de los hongos sobre la pared celular vegetal disminuye la rigidez estructural de los forrajes (14), y favorece la ruptura de las partículas de forraje (59), aumentando también así la superficie accesible para la acción bacteriana.

Cuantitativamente, la magnitud de la contribución de los hongos a la digestión de la pared celular *in vivo* no esta totalmente esclarecida. Fonty y col. (30) observan que la presencia de hongos en el rumen no tiene un gran efecto sobre la desaparición de materia seca o la concentración de ácidos grasos volátiles, a pesar de que la actividad glucosidasa y polisacaridasa

de la población microbiana adherida a las partículas aumenta aprecieblemente.

Bacterias. A pesar del papel de las poblaciones protozoaria y fúngica del rumen en la digestión de la pared celular vegetal, parece claro que son las bacterias los microorganismos más activamente implicados en este proceso, tanto cualitativamente, por su alta actividad enzimática, como a nivel cuantitativo, por la magnitud de su repercusión debida a su elevada concentración en el rumen.

Las tres especies bacterianas celulolíticas predominantes, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* y *R. albus*, tienen características peculiares que las diferencian de otras especies que pueden estar también implicadas en el proceso de digestión de la pared celular vegetal. Algunas, como *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Clostridium locheadii*, *Cl. longisporum* o *Eubacterium cellulosolvens* pueden considerarse también celulolíticas, pero su importancia en la digestión de la pared celular es secundaria, en el caso de las tres últimas, por su escasa concentración en el rumen (20). Tanto *B. fibrisolvens* (4) como *Cl. longisporum*

Cuadro 4. Degradación (% desaparición de materia seca) de diversos sustratos vegetales por distintas especies fúngicas tras 6 días de incubación *in vitro* (fuente: Fonty y Gouet, 1993).

	Paja de trigo	Raygras	Cañote de maíz
<i>Neocallimastix frontalis</i> MCH3	35,1	30,0	59,8
<i>Piromyces comunis</i> FL	26,5	37,5	60,0
<i>Orpinomyces joyonii</i> NJ1	33,5	35,2	58,7
<i>Caecomyces comunis</i> FG10	4,8	11,0	58,0

(68) carecen de estructuras de adhesión de tipo celulosoma, limitándose en gran medida su capacidad de digestión del sustrato. Además, es necesario considerar otras especies no celulolíticas que utilizan productos resultantes de la hidrólisis de las paredes vegetales, que pueden contribuir a evitar efectos de retroinhibición enzimática por acúmulo de catabolitos en el medio y a su vez aportar nutrientes esenciales (amoníaco, ácidos grasos ramificados) a las bacterias más activamente implicadas.

Las bacterias celulolíticas se caracterizan por su alta especialización nutritiva. Como muestra el cuadro 5 (69), la mayoría de las especies bacterianas que fermentan carbohidratos pueden utilizar una gran variedad de monosacáridos y disacáridos como nutrientes, incluyendo aquellos derivados de la fermentación de polisacáridos estructurales. Sin embargo, las bacterias celulolíticas únicamente utilizan celulosa y sus productos como nutrientes, por lo que se ven obligadas a especializarse en la hidrólisis de dicho polímero y de sus productos (celodextrinas), en un ambiente líquido que favorece la competencia entre gran variedad de microorganismos, y dada la comple-

jididad química y estructural de los forrajes. Para conseguirlo, las bacterias deben sintetizar grandes cantidades de enzimas, muy variadas para garantizar su acción frente a una amplia gama de sustratos, que hidrolicen la celulosa y las hemicelulosas relativamente rápido (ver apartado 3). Además, estas celulasas se localizan primordialmente en la superficie de las bacterias (54, 67) para favorecer el contacto físico con el sustrato. En el mismo sentido, las bacterias celulolíticas desarrollan diversos mecanismos muy especializados de adherencia íntima a estos sustratos, que evitan la degradación de las celulasas por las proteasas ruminales, protegen de la acción predatoria de los protozoos y evitan la salida del rumen, además de favorecer la captación preferente de los productos de la hidrólisis respecto a otras especies.

Los múltiples trabajos que han comparado las especies bacterianas en cuanto a su capacidad de degradar sustratos fibrosos han obtenido resultados dispares, debido básicamente a la propia variedad de éstos sustratos y de las cepas bacterianas empleadas (cuadro 6; 20). Las tres especies celulolíticas principales tienen

depolimerasas con capacidad de romper las cadenas de hemicelulosas y, en menor medida, de pectina, de los forrajes, dada la especificidad de las glucanasas por el tipo de enlace, aunque no son capaces de utilizar — *F. succinogenes* —, o lo hacen en escasa medida — *R. flavefaciens* — los productos resultantes de la hidrólisis

(22, 27). Algunas de las especies no celulolíticas más abundantes en el rumen, como *B. fibrisolvens* o *P. ruminicola*, son capaces de hidrolizar estos polisacáridos, en menor medida que las anteriores, y pueden utilizar las pentosas y ácidos urónicos resultantes (20).

Factores que inciden en los procesos de digestión microbiana de los forrajes

Composición y estructura de la pared celular vegetal. Los forrajes, tanto los tropicales como los de clima templado, difieren entre sí en la estructura y composición de su pared celular, dependiendo de su especie vegetal, parte anatómica y fase de desarrollo (38). En el mismo sentido, la estructura de la pared celular vegetal es muy compleja y variable, tanto química como histológicamente. Todas estas diferencias condicionan el modo de ataque microbiano a los polisacáridos estructurales, y en último término, el ritmo y extensión de la degradación por los microorganismos ruminales. De hecho, el ritmo de digestión de la celulosa de los forrajes por la población ruminal es muy inferior a la observada *in vitro* sobre celulosa purificada (69).

Mientras el floema y el mesófilo de las hojas, el parénquima de los tallos de gramíneas y leguminosas inmaduras, y el floema de las gramíneas inmaduras, se degradan rápidamente (1), en algunos casos en menos de 12 horas de incubación (18), otros tejidos vegetales presentan resistencia a la degradación. Los residuos de degradación microbiana de hojas incluyen una

elevada proporción de esclerénquima y xilema, y los de tallos de xilema, en caso de las leguminosas, y de epidermis, esclerénquima y xilema en gramíneas (1). Como indican Akin y Rigsby (4), el mesófilo es rápidamente degradado por las bacterias ruminales sin precisar adhesión, mediante una acción enzimática extracelular, mientras que la epidermis y las vainas de los paquetes parenquimatosos precisan una íntima adhesión de las principales especies fibrolíticas. La resistencia de estos tejidos a su degradación se debe tanto a su estructura anatómica como a su composición química.

La lignificación de la planta es uno de los factores que más afecta a la degradación microbiana de los forrajes, tanto por su indigestibilidad *per se* como en cuanto a su relación con las cadenas de hemicelulosas. El carácter hidrofóbico de la lignina acentúa el proceso de deshidratación de la pared celular a medida que aumenta la edad de la planta, lo que disminuye la accesibilidad de los polisacáridos estructurales. Además, una considerable proporción de las unidades de arabinosa de las cadenas laterales de

Cuadro 5. Utilización de carbohidratos por bacterias ruminales celulolíticas y no celulolíticas (69).

Especies bacterianas	Polisacáridos	Mono- y disacáridos
Celulolíticas:		
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	celulosa, celodextrinas	G, C
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	celulosa, xilano, pectina, celodextrinas	C
<i>Ruminococcus albus</i>	celulosa, xilano, celodextrinas	G, C, X, A
Celulolíticas secundarias:		
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	celulosa, xilano, dextrina, pectina, celodextrinas	G, Ga, Mn, F, M, X, L, C
<i>Clostridium longisporum</i>	celulosa	G, Ga, F, C, M, L, S
<i>Clostridium locheadii</i>	celulosa, dextrina	G, M, S
No celulolíticas:		
<i>Prevotella ruminicola</i>	pectina, almidón, dextrina, celodextrinas	G, Ga, F, L, C, X, A, R, M
<i>Selenomonas ruminantium</i>	almidón, dextrina, celodextrinas	G, Ga, F, X, A, C, M, L, S
<i>Streptococcus bovis</i>	almidón, celodextrinas	G, Ga, F, Mn, C, M, L, S
<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>	dextrina, pectina	G, Ga, Mn, X, M, A, F, S

Abreviaturas: A: arabinosa, C: celobiosa, F: fructosa, G: glucosa, Ga: galactosa, L: lactosa, M: maltosa, Mn: manosa, R: ramnosa, S: sacarosa y X: xilosa.

Cuadro 6. Nivel (g/kg) de digestión de la pared celular de dos forrajes y utilización de los productos por diversas cepas de especies bacterianas en cultivo puro. Gr: gramínea, *Bromus inermis*; Lg: leguminosa, *Medicago sativa*. (20).

	dig. celulosa		dig. hemicel.		util. hemicel.		dig. pectina		util. pectina	
	Gr.	Lg.	Gr.	Lg.	Gr.	Lg.	Gr.	Lg.	Gr.	Lg.
<i>F. succinogenes</i>										
A3c	794	616	540	603	21	51	—	—	—	—
S85	810	642	773	621	30	0	—	—	—	—
<i>R. flavefaciens</i>										
B1a	581	252	566	446	230	101	—	—	—	—
B34b	563	541	778	563	0	21	713	705	298	304
C1a	488	478	—	—	0	85	—	—	—	—
<i>R. albus</i>										
7	573	534	609	501	460	269	—	—	—	—
<i>P. ruminicola</i>										
H8a	7	19	47	336	61	339	—	—	—	—
23	—	—	—	—	—	—	550	367	526	366
<i>B. fibrisolvens</i>										
H10b	149	59	519	354	413	341	—	—	—	—
D16f	—	—	—	—	—	—	553	675	497	573
<i>L. multiparus</i>										
D15d	—	—	22	495	46	232	456	620	432	504

xilanos están esterificadas con ácidos p-cumárico y ferúlico [en paja de cebada, 2,9 y 6,7 %, respectivamente (58)], que establecen enlaces con las cadenas de lignina. Aunque estos compuestos fenólicos, especialmente el ácido p-cumárico, son tóxicos para la población microbiana ruminal (46), su concentración en el contenido rumen es probablemente insuficiente para generar este efecto (17). No obstante, su solubilización a partir de las paredes celulares pudiera provocar en las zonas de activa degradación una concentración de fenoles próxima a los niveles tóxicos, por lo que pueden inhibir, o al menos ralentizar, la actividad fibrolítica bacteriana (28).

La capa de cutina que cubre la epidermis es prácticamente impermeable a la adhesión microbiana (2), excepto para algunos hongos (41), lo que obliga a los microorganismos a colonizar los tejidos digeribles a través de estomas o a partir de cortes y secciones libres de esa cutícula, en gran medida provocados durante la masticación (51), en un proceso *de dentro a afuera* (16). Puede contener hasta 18 ó 24 % de sílice integrado en ella, que le confiere una mayor resistencia a la ruptura y a su digestión (36). Su proporción puede aumentar bajo condiciones de alta temperatura, luz y aridez (73). La epidermis está débilmente adherida al mesófilo en las hojas de leguminosas y de muchas gramíneas C3, pero firmemente fijada a los haces vasculares en las C4, por lo que puede entorpecer el proceso de digestión (85). Por lo demás, la epidermis libre de esta cutícula, es degradada en menos de 8 horas en el rumen (18).

El xilema y el esclerénquima de las hojas de las gramíneas, por su densidad, supone una barrera a la colonización y a la acción de las enzimas microbianas, tanto sobre estos tejidos como sobre otros que pueden quedar físicamente protegidos (74). No obstante, el esclerénquima de las hojas, aunque lignificado, no es totalmente inaccesible a la colonización microbiana, sino que puede observarse cierta degradación en sus zonas periféricas (1). Las hifas de los hongos tienen capacidad para perforar los tejidos vegetales más lignificados, con lo que favorecen el acceso bacteria-no a los tejidos internos (6). La proporción de xilema y esclerénquima es similar en gramíneas C3 y C4. Sin embargo, una mayor proporción de epidermis y vainas de paquetes parenquimatosos en las C4, en mayor proporción en condiciones adversas de crecimiento (37), suponen una barrera adicional al ataque microbiano. Además, la estructura radial y compacta del mesófilo en las hojas de gramíneas tropicales (35) ralentiza la degradación. No existen diferencias específicas entre las hojas de leguminosas de origen tropical o templado; aunque son en general muy digeribles, los taninos presentes en algunas especies puede retrasar la digestión del mesófilo (1).

Los tallos, tanto de leguminosas como de gramíneas C3 y C4, presentan una estructura rígida, en la que la epidermis, esclerénquima y tejido vascular están muy lignificados y son prácticamente indigeribles (1). El parénquima se lignifica con la madurez de la planta, disminuyendo su digesti-

bilidad (73). Las diferencias en las proporciones de tejidos entre las distintas gramíneas no son aparentes en el caso de los tallos, por lo que son las condiciones de cultivo las que determinan diferencias en su digestibilidad (5). No parece que el parénquima de los tallos de leguminosas se lignifique conforme avanza la madurez de la planta (1), lo que garantiza una mayor degradación de los tallos de especies leguminosas respecto a los de gramíneas.

Condiciones del ambiente ruminal. Las condiciones ambientales en las que se desarrolla el proceso de degradación de la pared celular, tanto las características físicas y químicas del medio como las interacciones entre distintos microorganismos, determinan el grado y ritmo de digestión de los forrajes. Algunos de estos aspectos y su repercusión son tratados en esta Reunión por otros autores.

Las bacterias fibrolíticas requieren amoníaco, ácidos grasos ramificados, vitaminas y minerales para su crecimiento y óptima actividad fibrolítica (21, 64). El fluido ruminal contiene estos nutrientes en cantidad suficiente para garantizar la satisfacción de las necesidades, aunque dietas a base de forrajes de baja calidad pueden ser deficitarias en algunos minerales (P, S, Mg), o provocar una baja concentración de amoníaco en el rumen, por lo que dicha actividad podría verse restringida (24).

Aunque niveles bajos de suplementación en dietas forrajeras pueden tener un efecto positivo sobre la digestión de fibra, al inducir un aumento de la concentración de

organismos (23), la incorporación en la dieta de altas proporciones de carbohidratos como suplemento energético repercute en un descenso de la digestión microbiana de la fibra. La acidificación del medio debida al acceso inmediato a una fuente de energía rápidamente utilizable, aumentando las concentraciones de lactato y ácidos grasos volátiles hasta sobrepasar la capacidad absorbente del rumen, es el principal factor implicado (40). El descenso de pH hasta niveles críticos para la población fibrolítica [$< 5,9$; (63)] afecta a la actividad polisacaridasa microbiana (43), aunque parece que no a su capacidad de adhesión (62).

Hiltner y Dehority (40) y Huhtanen y Khalili (43) no observan un efecto negativo de la suplementación cuando el medio se mantiene a pH tamponado, pero algunos autores (57, 61) han sugerido que, independientemente del descenso de pH, una mayor afinidad por substratos más accesibles puede retrasar tanto la adhesión a partículas menos digestibles, por preferencia de substrato, como la síntesis de enzimas celulolíticas, por un mecanismo de retroinhibición debido a la concentración de monosacáridos en el medio. Este efecto independiente del pH se ha descrito en hongos (56) y en *F. succinogenes* (42, 62), pero no en bacterias del género *Ruminococcus* (62).

La magnitud de las respuesta depende de las características del substrato, así como de las del carbohidrato suplementado. En experimentos llevados a cabo en nuestro laboratorio (7, 8), la adhesión micro-

biana *in vitro* a pared celular extraída de paja de cebada aumenta por la suplementación (35 % del sustrato total) respecto a un medio no suplementado, debido a la compensación del escaso nivel de nutrientes de este medio basal (figura 2). La magnitud de esta respuesta positiva al suplemento es menor con paja tratada con amoníaco como sustrato (sin publicar). Por otra parte, con descensos similares del pH del medio (hasta 6,3), la inclusión de pectina promueve un más rápido acceso a la pared celular de paja que la adición de almidón o una mezcla

de azúcares solubles, lo que repercute en una mayor desaparición de los componentes de los polisacáridos estructurales del sustrato (7). Dado que no hay diferencias entre suplementos en la actividad enzimática que indiquen una retroinhibición enzimática debida a la concentración de monosacáridos en el medio, y ya que las bacterias celulolíticas no emplean los productos de su hidrólisis como nutrientes, la pectina puede ejercer una acción física de barrera que favorece la digestión, a diferencia de los otros carbohidratos a estudio.

Implicaciones

Las diferentes características, tanto químicas como anatómicas, de los forrajes empleados en la alimentación de los rumiantes, determina el grado de adhesión microbiana y de acción enzimática sobre la pared celular vegetal, y con ello el nivel de digestión de dichos forrajes. Diversas especies de hongos, bacterias y protozoos están implicadas en esos procesos,

tanto directa como indirectamente, lo que muestra la necesidad de abordar el ecosistema ruminal globalmente para comprender su actividad, con vistas a optimizar la utilización de los forrajes para el ganado rumiante, así como para establecer las estrategias de alimentación y de manipulación del ambiente que contribuyan a conseguir este objetivo.

Literatura citada

1. Akin, D. E., 1989. Histological and physical factors affecting digestibility of forages. *Agron. J.*, 81:17-25.
2. Akin, D. E. y R. Benner. 1988. Degradation of polysaccharides and lignin by ruminal bacteria and fungi. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54: 1117-1125.
3. Akin, D. E. y L. L. Rigsby. 1985. Influence of phenolic acids on rumen fungi. *Agron. J.* 77: 180-182.
4. Akin, D. E. y L. L. Rigsby. 1985. Degradation of Bermuda and orchardgrass by species of ruminal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50:825-830.
5. Akin D. E., R. H. Brown y L. L. Rigsby. 1984. Digestion of stem tissues in *Panicum* species. *Crop Sci.*, 24: 769-773.
6. Akin, D. E., C. E. Lyon, W. R. Windham y L. L. Rigsby. 1989. Physical degradation of lignified stem tissues by ruminal fungi. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55: 611-616.
7. Barrios Urdaneta, A., M. Fondevila, J. M. Peiró and C. Castrillo. 1996. Effect of the source of carbohydrate supplemented on bacterial adhesion and digestion of straw cell wall. *Ann. Zootech.*, 45:295.

8. Barrios Urdaneta, A., M. Fondevila, S. M. Martín-Orúe and J. C. Machado Nogueira. 1997. Microbial growth and polysaccharidase activity against straw cell wall in response to the nature of added carbohydrates. *Reprod., Nutr. Dev.*, (en prensa).
9. Bauchop, T. 1989. Colonization of plant fragments by protozoa and fungi. En: J.V. Nolan, R.A. Leng, D.I. Demeyer (Eds.). *The roles of protozoa and fungi in ruminant digestion*. Penambul Books, Armidale. pp.83-96.
10. Bayer, E. A., R. Kenig and R. Lamed. 1983. Adherence of *Clostridium thermocellum* to cellulose. *J. Bacteriol.*, 156: 818-827.
11. Bernalier, A., G. Fonty, F. Bonnemoy and P. Gouet. 1992. Degradation and fermentation of cellulose by the rumen anaerobic fungi in axenic cultures or in association with cellulolytic bacteria. *Curr. Microbiol.*, 25: 143-148.
12. Bohatier, J., J. Sénaud and M. Benyahya. 1990. *In situ* degradation of cellulose fibres by the entodiniomorph rumen ciliate *Polyplastron multivesiculatum*. *Protoplasta*, 154: 122-131.
13. Bonhomme, A., G. Fonty, M. J. Foglietti, D. Robic and M. Weber. 1986. Endo-1,4- β glucanasa y β glucosidasa del ciliado *Polyplastron multivesiculatum* free of cellulolytic bacteria. *Can. J. Microbiol.*, 32: 219-225.
14. Borneman, W. S. and D. E. Akin. 1990. Lignocellulose degradation by rumen fungi and bacteria: ultrastructure and cell wall degrading enzymes. En: D. E. Akin, L. G. Ljungdahl, J. R. Wilson y P. J. Harris (Eds.). *Microbial and plant opportunities to improve lignocellulose utilization by ruminants*. Elsevier, Nueva York. pp. 325-339.
15. Borneman, W. S., L. G. Ljungdahl, R. D. Hartley and D. E. Akin. 1991. Isolation and characterization of p-coumaryl esterase from the anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis* strain MC2. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2337-2344.
16. Cheng, K. J., C. W. Forsberg, H. Minato and J. W. Costerton. 1991. Microbial ecology and physiology of feed degradation within the rumen. En: T. Tsuda, Y. Sasaki, R. Kawashima (Eds.). *Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants*. Academic Press, San Diego. pp. 595-624.
17. Chesson, A. and C. W. Forsberg. 1988. Polysaccharide degradation by rumen microorganisms. En: P. N. Hobson (Ed.). *The rumen microbial ecosystem*. Elsevier Applied Science, Nueva York. pp.251-284.
18. Chesson, A., C. S. Stewart, K. Dalgarno and T. P. King. 1986. Degradation of isolated grass mesophyl, epidermis and fibre cell walls in the rumen and by cellulolytic rumen bacteria in axenic culture. *J. Appl. Bacteriol.*, 60: 327-336.
19. Czerkawski, J. W. and K. J. Cheng. 1988. Compartmentation in the rumen. p. 361-385. En: P. N. Hobson (Ed.). *The rumen microbial ecosystem*. Elsevier Applied Science, Nueva York.
20. Dehority, B. A. 1993. Microbial ecology of cell wall fermentation. En: H. G. Jung, D. R. Buxton, R. D. Hatfield y J. Ralph (Eds.). *Forage cell wall structure and digestibility*. ASA-CSSA-SSSA, Madison. pp. 425-453.
21. Dehority, B. A. and Scott, H. W., 1967. Extent of cellulose and hemicellulose digestion in various forages by pure cultures of rumen bacteria. *J. Dairy Sci.*, 50: 1136-1141.
22. Dehority, B. A., Scott, H. W. and P. Kowaluk. 1967. Volatile fatty acid requirements of cellulolytic rumen bacteria. *J. Bacteriol.*, 94: 537-543
23. Demeyer, D. I. 1981. Rumen microbes and digestion of plant cell walls. *Agric. Environ.*, 6: 295-337.
24. Durand, M., 1989. Conditions for optimizing cellulolytic activity in the rumen. p. 3-18. En: M. Chenost y P. Reiniger (Eds.). *Evaluation of straws in ruminant feeding*. Elsevier Applied Science, Barking.

25. Flint, H. J., 1994. Degradation of plant cell wall polysaccharides by rumen bacteria. pp. 49-67. En: R. A. Prins y C. S. Stewart (Eds.). *Microorganisms in ruminant nutrition*. Nottingham University Press, Nottingham.
26. Flint, H. J. y C.W. Forsberg. 1995. Polysaccharide degradation in the rumen: biochemistry and genetics. pp. 43-70. En: *Ruminant physiology: digestion, metabolism, growth and reproduction*. W.v. Engelhardt, S. Leonhardt-Marek, G. Breves y D. Gieseke (eds.). Enke Verlag, Stuttgart.
27. Fondevila, M. and Dehority, B.A., 1994. Degradation and utilization of forage hemicellulose by rumen bacteria, singly, in co-culture or added sequentially. *J. Appl. Bacteriol.*, 77: 541-548.
28. Fondevila, M., G. Muñoz, C. Castrillo, F. Vicente and S. M. Martín-Orúe. 1997. Differences in microbial fermentation of barley straw induced by its treatment with anhydrous ammonia. *Anim. Sci.*, 65 (en prensa).
29. Fonty, G and K. N. Joblin. 1991. Rumen anaerobic fungi: their role and interactions with other rumen microorganisms in relation to fiber digestion. pp. 655-679. In: *Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants*. T. Tsuda, Y. Sasaki, R. Kawashima (eds.). Academic Press, San Diego.
30. Fonty, G., A. Williams, F. Bonnemoy, B. Morvan, J. Doré and P. Gouet, P. 1992. Interactions between cellulolytic bacteria, anaerobic fungi and methanogens in the rumen of gnotobiotic lambs. p. 338-342. *Proc. Int. Conf. on «Manipulation of rumen microorganisms to improve efficiency of fermentation and ruminant nutrition»*. Alejandria, Egipto. 20-23 Septiembre.
31. Forsberg, C.W. y K. Lam. 1977. Use of adenosine-5'-triphosphate as an indicator of the microbiota biomass in rumen contents. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33: 528-537.
32. Gilbert, H.J., J. Hall, G. P. Hazelwood y L. M. A. Ferreira. 1990. The N-terminal region of an endoglucanase from *Pseudomonas fluorescens* subspecies *cellulosa* constitutes a cellulose-binding domain that is distinct from the catalytic centre. *Mol. Microbiol.*, 4: 759-767.
33. Gong, J. and C. W. Forsberg. 1989. Factors affecting adhesion of *Fibrobacter succinogenes* subsp. *succinogenes* S85 and adherence-defective mutants to cellulose. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55: 3039-3044.
34. Grenet, E., A. Breton, P. Barry and P. Fonty. 1989. Rumen anaerobic fungi and plant substrates colonization as affected by diet composition. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 26: 55-70.
35. Hanna, W.W., W. G. Monson and G. W. Burton. 1973. Histological examination of fresh forage leaves after in vitro digestion. *Crop Sci.* 13: 98-102.
36. Harbers, L.H., D. Raiten and G. M. Paulsen. 1981. The role of plant epidermal silica as a structural inhibitor of rumen microbial digestion in steers. *Nutr. Rep. Int.*, 24: 1057-1066.
37. Hastert, A.A., C. E. Owensby and L. H. Harbers. 1983. Rumen microbial degradation of indiangrass and big bluestem leaf blades. *J. Anim. Sci.*, 57: 1626-1636.
38. Hatfield, R. 1990. Physiological changes and metabolic events that reduce lignocellulosic utilization. En: *Microbial and plant opportunities to improve lignocellulose utilization by ruminants*. D.E. Akin, L.G. Ljungdahl, J.R. Wilson y P.J. Harris (eds.). Elsevier, Nueva York. pp. 91-98.
39. Hébraud, M. y M. Fèvre. 1988. Characterization of glycosides and polysaccharide hydrolases secreted by the rumen anaerobic fungi *Neocallimastix frontalis*, *Sphaeromonas communis* and *Piromyces communis*. *J. Gen. Microbiol.*, 134: 1123-1129.
40. Hiltner, P. y B. A. Dehority. 1983. Effect of soluble carbohydrates on digestion of cellulose by pure cultures of rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46: 642-648.
41. Ho, Y. W., N. Abdullah y S. Jalaludin. 1988. Penetrating structures of

- anaerobic rumen fungi in cattle and swamp buffalo. *J. Gen. Microbiol.*, 134: 177-181.
42. Huang, L. y C. W. Forsberg. 1990. Cellulose digestion and cellulase regulation and distribution in *Fibrobacter succinogenes* subsp. *succinogenes* S85. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 1221-1228.
43. Huhtanen, P. y H. Khalili. 1992. The effect of sucrose supplements on particle-associated carboxymethyl-cellulase (EC 3.2.1.4) and xylanase (EC 3.2.1.8) activities in cattle given grass-silage-based diet. *Br. J. Nutr.*, 67: 245-255.
44. Joblin, K. N. y G. E. Naylor. 1989. Fermentation of woods by rumen anaerobic fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 65:111-122.
45. Jouany, J. P. y K. Ushida. 1994. Plant cell-wall degradation by rumen protozoa. En: *Microorganisms in ruminant nutrition*. R.A. Prins y C.S. Stewart (eds.), Nottingham University Press, Nottingham. pp. 69-78.
46. Jung, H. G., G. C. Fahey Jr. and N. R. Merchen. 1983. Effects on ruminant digestion and metabolism of phenolic monomers of forages. *Br. J. Nutr.*, 50: 637-651.
47. Kudo, H., K. J. Cheng and J. W. Costerton. 1987. Electron microscopic study of the methylcellulose-mediated detachment of cellulolytic rumen bacteria from cellulose fibers. *Can. J. Microbiol.*, 33: 267-272.
48. Lamed, R., E. Setter, R. Kenig and E. A. Bayer. 1983. The cellulosome. A discrete cell surface organelle of *Clostridium thermocellum* which exhibits separate antigenic cellulose-binding and various cellulolytic activities. *Biotech. Bioeng. Symp.*, 13: 163-181.
49. Latham, M. J., B. E. Brooker, G. L. Pettipher and P. J. Harris. 1978. *Ruminococcus flavefaciens* cell coat and adhesion to cotton cellulose and to cell walls in leaves of perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *Appl. Environ. Microbiol.*, 35: 156-165.
50. Mayer, F., M. P. Coughlan, Y. Mori and L. G. Ljungdahl. 1987. Macromolecular organization of the cellulolytic enzyme complex of *Clostridium thermocellum* as revealed by electron microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53: 2785-2792.
51. McAllister, T. A., H. D. Bae, G. A. Jones, and K. J. Cheng. 1994. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *J. Anim. Sci.*, 72: 3004-3018.
52. McGavin, M. and C. S. Forsberg. 1989. Catalytic and substrate-binding domains of endoglucanase 2 from *Bacteroides succinogenes*. *J. Bacteriol.*, 171: 3310-3315.
53. Minato, H. and T. Suto. 1978. Technique for fractionation of bacteria in rumen microbial ecosystem. II. Attachment of bacteria isolated from bovine rumen to cellulose powder in vitro and elution of bacteria attached therefrom. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 24: 1-16.
54. Miron, J., M. T. Yokoyama and R. Lamed. 1989. Bacterial cell surfaces structures involved in lucerne cell wall degradation by pure cultures of cellulolytic rumen bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 32: 218-222.
55. Morris, E.J. and O. J. Cole. 1987. Relationship between cellulolytic activity and adhesion to cellulose in *Ruminococcus albus*. *J. Gen. Microbiol.*, 13: 1023-1032.
56. Morrison, M., R. J. Mackie and A. Kistner. 1990. Evidence that cellulolysis by an anaerobic ruminal fungus is catabolite regulated by glucose, cellobiose and soluble starch. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 3227-3229.
57. Mould, F.L., E. R. Orskov and S. O. Mann. 1983. Associative effects of mixed feeds. 1. Effect of type and level of supplementation and the influence of the rumen fluid pH on cellulolysis in vivo and dry matter digestion of various roughages. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 10: 15-30.
58. Mueller-Harvey, I. and R. D. Hartley. 1986. Linkage of p-coumaroyl and feruloyl groups to cell wall polysaccharides of barley straw. *Carbohydr. Res.*, 148: 71-85.

59. Orpin, C. G. 1983. The role of ciliate protozoa and fungi in the rumen digestion of plant cell walls. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 10:121-143.
60. Pell, A. and P. Schofield. 1993. Microbial adhesion and degradation of plant cell walls. En: Forage cell wall structure and digestibility. H.G. Jung, D.R. Buxton, R.D. Hatfield y J. Ralph (eds.). ASA-CSSA-SSSA, Madison. pp. 397-423.
61. Piwonka, E.J. and J. L. Firkins. 1993. Effect of glucose on fiber digestion and particle-associated carboxymethyl-cellulase activity in vitro. *J. Dairy Sci.*, 76: 129-139.
62. Roger, V., G. Fonty, S. Komisarczuk-Bony and P. Gouet. 1990. Effects of physicochemical factors on the adhesion to cellulose avicel of the ruminant bacteria *Ruminococcus flavefaciens* and *Fibrobacter succinogenes* subsp. *succinogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56: 3081-3087.
63. Russell, J. B. and D. B. Wilson. 1996. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? *J. Dairy Sci.*, 79: 1503-1509.
64. Scott, H.W. and B. A. Dehority. 1965. Vitamin requirements of several cellulolytic rumen bacteria. *J. Bacteriol.*, 89: 1169-1175.
65. Stack, R.J. and R. E. Hungate. 1984. Effect of 3-phenylpropanoic acid on capsule and cellulases of *Ruminococcus albus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48:218-223.
66. Stewart, C. S. 1994. Plant-animal and microbial interactions in ruminant fibre degradation. p. 13-28. En: Microorganisms in ruminant nutrition. R.A. Prins y C.S. Stewart (eds.), Nottingham University Press, Nottingham.
67. Stewart, C. S. y H. J. Flint. 1989. *Bacteroides (Fibrobacter) succinogenes*, a cellulolytic anaerobic bacterium from the gastrointestinal tract. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 30: 433.
68. Varel, V. H., J. T. Yen and K. K. Kreikmeier. 1995. Addition of cellulolytic clostridia to the bovine rumen and pig intestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 1116.
69. Weimer, P. J. 1996. Why don't ruminal bacteria digest cellulose faster?. *J. Dairy Sci.*, 79: 1496 - 1502.
70. White, B.A., R. I. Mackie, and K. C. Doerner. 1993. Enzymatic hydrolysis of forage cell wall. pp. 455-498. En: Forage cell wall structure and digestibility. H.G. Jung, D.R. Buxton, R.D. Hatfield y J. Ralph (eds.). ASA-CSSA-SSSA, Madison.
71. Williams, A. G. and G. S. Coleman. 1988. The rumen protozoa. p. 77-128. En: The rumen microbial ecosystem. P.N. Hobson (ed.), Elsevier Applied Sciences, Londres.
72. Williams, A. G., S. E. Withers and G. S. Coleman. 1984. Glycoside hydrolases of rumen bacteria and protozoa. *Curr. Microbiol.* 10: 287-294.
73. Wilson, J. R., 1990. Influence of plant anatomy on digestion and fibre breakdown. pp. 99-117. En: Microbial and plant opportunities to improve lignocellulose utilization by ruminants. D. E. Akin, L. G. Ljungdahl, J.R. Wilson y P.J. Harris (eds.). Elsevier, Nueva York.
74. Wilson, J. R. y D. R. Mertens. 1995. Cell wall accessibility and cell structure limitations to microbial digestion of forage. *Crop Sci.* 35: 251.
75. Wilson, J. R., M. N. McLeod and D. J. Minson. 1989. Particle size reduction of leaves of a tropical and a temperate grass by cattle. I. Effect of chewing during eating at varying times of digestion. *Grass For. Sci.*, 44: 55-63.