



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

**DEGRADACIÓN *IN VITRO* DE LA PARED CELULAR, VARIABLES
RUMINALES Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE MICROORGANISMOS
ADHERIDOS A SÓLIDOS DEL COMPLEJO *LOLIUM-FESTUCA***

ISAAC ALMARAZ BUENDÍA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2011

La presente tesis, titulada: **Degradación *in vitro* de la pared celular, variables ruminales y actividad enzimática de microorganismos adheridos a sólidos del complejo *Lolium-Festuca***, realizada por el alumno: **Isaac Almaraz Buendía**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS

RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

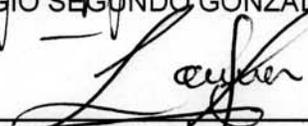
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



DR. SERGIO SEGUNDO GONZÁLEZ MUÑOZ

ASESOR:



DR. JOSÉ RICARDO BARSEÑA GAMA

ASESOR:



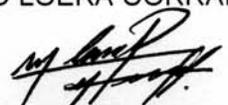
DR. BALDOMERO ALARCON ZÚÑIGA

ASESOR:



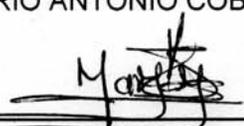
DR. OCTAVIO LOERA CORRAL

ASESOR:



DR. MARIO ANTONIO COBOS PERALTA

ASESOR:



DR. MARCOS MENESES MAYO

Montecillo, Texcoco, México, 18 de Febrero de 2011

**DEGRADACIÓN *IN VITRO* DE LA PARED CELULAR, VARIABLES RUMINALES
Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE MICROORGANISMOS ADHERIDOS A SÓLIDOS
DEL COMPLEJO *LOLIUM-FESTUCA***

Isaac Almaraz Buendía, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2010

En este estudio se evaluó el efecto del complejo *Lolium-Festuca* (CL-F), cosechado a 28 (T1) y 35 d (T2) de rebrote, en la desaparición *in vitro* de la materia seca (DIVMS), cinética de producción de gas (CPG), y en la actividad de carboximetilcelulasas (CMCasas) y de xilanasas de microorganismos adheridos a sólidos a las 12, 16, 24, y 48 h de incubación. La degradación del tejido foliar a las 12, 24, y 48 h de incubación se documentó mediante Microscopía de Electrónica de Barrido (MEB); la lignina se detectó con la reacción floroglucinol-HCl. El modelo logístico y el procedimiento NLIN se usaron para obtener los datos de CPG. El diseño experimental fue de parcelas divididas en bloques aleatorizados, los datos se analizaron con el procedimiento MIXED (SAS). La DIVMS y PG fueron mayores ($p \leq 0.05$) en T2, la actividad enzimática no cambió ($p > 0.05$) entre tratamientos, pero la actividad de CMCasas fue máxima ($p \leq 0.05$) a las 12 y 16 h de incubación y la de xilanasas ($p \leq 0.05$) a las 16 y 24 h. La MEB mostró la adherencia inicial de los microorganismos ruminales en las paredes primarias (no lignificadas) y su degradación; además MEB mostró la adherencia a las paredes lignificadas con degradación completa de las paredes primarias y de la estructura celular. Se concluye que el CL-F cosechado a 28 o 35 d afecta la DIVMS y la PG sin modificar la actividad de CMCasas y de xilanasas.

Palabras clave: *Lolium-Festuca*, carboximetilcelulasas, xilanasas, microscopía electrónica de barrido, floroglucinol-HCl.

**IN VITRO DEGRADATION OF CELL WALL, RUMINAL VARIABLES, AND
ENZYMATIC ACTIVITY OF MICROORGANISMS ATTACHED TO SOLIDS OF THE
LOLIUM-FESTUCA COMPLEX**

Isaac Almaraz Buendía, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2010

The effect of the *Lolium-Festuca* (CL-F) complex, harvested at 28 (T1) and 35 d (T2), on the *in vitro* DM disappearance (IVDMD), kinetics of gas production, as well as on the activity of carboxymethylcellulases (CMCases) and xylanases of microorganisms attached to solids at 12, 16, 24, y 48 of incubation, was evaluated in this study. The degradation of foliar tissue at 12, 24, and 48 h of incubation was shown using Scanning Electrons Microscopy (SEM); the lignin was detected with the reaction phloroglucinol-HCl. The logistic model and the NLIN procedure were used to analyze the data of gas production kinetics. The experimental design was randomized blocks with a split-plot arrangement, and the data were analyzed with MIXED procedure (SAS). The IVDMD and gas production were higher ($p \leq 0.05$) in T2. The enzymatic activities remained unchanged among treatments; however, the higher activity ($p \leq 0.05$) was found at 12 and 16 h of incubation for CMCases and at 16 and 24 h for xylanases. SEM showed the initial adherence of ruminal microorganisms on primary cell walls (non-lignified) and their degradation; besides, SEM showed the adherence to lignified walls with a complete degradation of primary walls and that of the cell structure. It is concluded that the CL-F, harvested at 28 and 35 d, changed IVDMD and gas production; however, there was no effect on the activities of CMCases and of xylanases.

Key words: *Lolium-Festuca*, carboxymethylcellulases, xylanases, scanning electrons microscopy, phloroglucinol-HCl.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca que me otorgó para realizar estudios de Postgrado.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECYT) por su apoyo referente al concurso Becas Tesis de Postgrado.

Al Dr. Sergio S. González Muñoz, quien con sus consejos, sugerencias, propuestas, responsabilidad, y experiencia dirigió el presente trabajo. Su amistad y sencillez enaltecen aún más el haber trabajado bajo su dirección. Le agradezco bastante.

A los Doctores que formaron parte de mi Consejo Particular: Dr. Ricardo Bárcena Gama, Dr. Baldomero Alarcón Zúñiga, Dr. Octavio Loera Corral, Dr. Mario A. Cobos Peralta y Dr. Marcos Meneses Mayo, por su apoyo, sugerencias y disposición para realizar el presente estudio.

A la Dra. Hilda Aracely Zavaleta Mancera le agradezco su valiosa contribución, disposición, sugerencias, y facilidades que me otorgó en el Laboratorio de Histoquímica y Anatomía Vegetal, así como en la Unidad de Microscopía Electrónica.

Al Dr. Luis Alberto Miranda Romero por sus sugerencias, amistad, y sencillez; y porque de muy buena manera me permitió trabajar en el Laboratorio de Microbiología Pecuaria del Departamento de Zootecnia de la Universidad Autónoma Chapingo.

A la Biol. Greta Hanako Rosas Saito, por su amistad, confianza, y apoyo en la toma de imágenes en la Unidad de Microscopía Electrónica; gracias Greta.

A Braulio, Laura, Dra. Rosario, Indalecio y Jesús por su amistad y apoyo que me brindaron en la Universidad Autónoma Chapingo.

A la Dra. María Magdalena Crosby, y los Sres. Anastacio, Andrés, y Agustín por su apoyo en el Laboratorio de Nutrición Animal; de igual manera al Sr. Miguel por su apoyo en el procedimiento histológico y anatómico.

A compañeros, amigos, profesores, personal que labora en la Biblioteca, Servicios Académicos, Agrociencia, Programa de Ganadería y demás personas, quienes con un gesto o un saludo transmiten algo invaluable.

Dedico esta Tesis a:

Alicia, Daniela, Andrea y Marcos, quienes de manera muy especial contribuyeron al presente estudio.

Todos los miembros de mi familia y amigos con quienes he tenido la oportunidad de compartir diversos momentos, algunos de ellos ya no se encuentran con nosotros, pero permanece su recuerdo.

1. Índice

	Págs.
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1. Planteamiento del problema	2
2. Objetivos	3
3. Hipótesis	4
4. Revisión de literatura	5
4.1. Complejo <i>Lolium-Festuca</i>	5
4.2. Estructura del tejido vegetal en forrajes	6
4.3. Estructura del tallo	6
4.4. Estructura de la hoja	7
4.5. Pared primaria	8
4.6. Pared secundaria	8
4.7. Epidermis	8
4.8. Mesófilo	9
4.9. Fibra	10
4.10. Celulosa	12
4.11. Hemicelulosa	13
4.12. Lignina	14
4.13. Degradación de lignina	15
4.14. Enzimas	16
4.15. Degradación de la fibra dentro del rumen	16
5. Literatura citada	18

**CAPÍTULO I. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE MICROORGANISMOS
ADHERIDOS A SÓLIDOS, VARIABLES RUMINALES Y CINÉTICA DE
PRODUCCIÓN DE GAS *IN VITRO* DEL COMPLEJO *LOLIUM-
FESTUCA* A DOS ESTADOS DE MADUREZ**

1.1. Resumen	23
1.2. Abstract	24
1.3. Introducción	25
1.4. Materiales y métodos	26
1.4.1. Producción de gas <i>in vitro</i>	27
1.4.2. Desaparición <i>in vitro</i> de la materia seca (DIVMS)	27
1.4.3. Obtención del extracto enzimático de microorganismos adheridos a sólidos	28
1.4.4. Actividad de carboximetilcelulasas (CMCasas)	28
1.4.5. Determinación de proteína	29
1.4.6. Concentración de sustrato, extracto enzimático y velocidad de reacción para calcular actividad de xilanasas	30
1.4.7. Actividad de xilanasas	31
1.4.8. Concentración de AGV y N-NH ₃	31
1.4.9. Diseño experimental	32
1.5. Resultados	34
1.5.1. DIVMS y cinética de producción de gas	34
1.5.2. Concentración de sustrato, de extracto enzimático y velocidad de reacción en actividad de xilanasas	35

1.5.3. Actividad de CMCasas y de xilanasas	38
1.6. Discusión	41
1.6.1. DIVMS y cinética de producción de gas	41
1.6.2. Actividad de CMCasas y de xilanasas	43
1.6.3. Concentración de AGV y N-NH ₃	47
1.7. Conclusiones	48
1.8. Literatura citada	48

CAPITULO II. DEGRADACIÓN *IN VITRO* DE TEJIDO FOLIAR DEL COMPLEJO *LOLIUM-FESTUCA* POR MICROORGANISMOS RUMINALES

2.1. Resumen	54
2.2. Abstract	55
2.3. Introducción	56
2.4. Justificación	57
2.5. Materiales y métodos	58
2.5.1. Complejo <i>Lolium-Festuca</i>	58
2.5.2. Producción de gas <i>in vitro</i>	59
2.5.3. Determinación de lignina con la reacción Floroglucinol-HCl	59
2.5.4. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)	60
2.6. Resultados y discusión	61
2.6.1. Producción de gas <i>in vitro</i>	61
2.6.2. Anatomía de la hoja del complejo <i>Lolium-Festuca</i>	62
2.6.3. Degradación <i>in vitro</i> del tejido vegetal evaluado mediante	

	64
2.7. Conclusiones	70
2.8. Literatura citada	70
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES	74
Anexo A	75
Anexo B	77

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

	Página
Cuadro 1. Proporción de tejido en órganos vegetales de especies templadas...	9
Cuadro 2. Bacterias ruminales que producen complejos enzimáticos extracelulares.....	17
Cuadro 3. DIVMS y variables de cinética de producción de gas.....	34
Cuadro 4. Actividad de CMCasas y de xilanasas de microorganismos ruminales adheridos a sólidos del complejo <i>Lolium-Festuca</i> en producción de gas <i>in vitro</i>	39
Cuadro 5. Concentración de AGV y N-NH ₃ en producción de gas <i>in vitro</i>	40
Figura 1. Tasa fraccional de producción de gas originada por la fermentación <i>in vitro</i> del complejo <i>Lolium-Festuca</i>	35
Figura 2. Formación de azúcares reductores a diferente concentración de xilano y a través del tiempo.....	36
Figura 3. Formación de azúcares reductores a diferente concentración de extracto enzimático de microorganismos ruminales adheridos a sólidos con 12 h de fermentación <i>in vitro</i>	37
Figura 4. Actividad de CMCasas y de xilanasas de microorganismos adheridos a residuos sólidos del complejo <i>Lolium-Festuca in vitro</i>	38
Figura 5. Gas acumulado originado por la fermentación <i>in vitro</i> del complejo <i>Lolium-Festuca</i>	61
Figura 6. Secciones transversales de hoja del complejo <i>Lolium-Festuca</i> teñidas para lignina con floroglucinol-HCl. (A) Cosechado a 28 d,	

(C) a 35 d; (B) acercamiento de la nervadura central de A; (D) acercamiento de la nervadura central de C. cb, células buliformes bisagra; ead, epidermis adaxial; eab, epidermis abaxial; es, fibras subepidérmicas abaxiales de la nervadura media; f, floema; hv, haz vascular; m, mesófilo; t, tricoma; vhv, vaina del haz vascular; x, xilema. El color rojo indica la presencia de lignina..... 63

Figura 7. Microestructura foliar (MEB) del complejo *Lolium-Festuca* antes de su fermentación *in vitro*. (A, C y E) epidermis adaxial (ead); (B, D y F) epidermis abaxial (eab); (e) estoma; (t), tricoma..... 65

Figura 8. Microestructura (MEB) durante la degradación de la pared celular del complejo *Lolium-Festuca*. (A y B) superficie foliar a 12 h de incubación; (C y D) mesófilo a 24 h de incubación; (E y F) haz vascular a 48 h de incubación. cc, cutícula cerosa; ead, epidermis adaxial; f, floema; hv, haz vascular; lm, lámina media; m, mesófilo; pc, pared celular; pcs, pared celular secundaria; x, xilema. La flecha negra indica microorganismos ruminales; la flecha blanca, degradación celular..... 66

Figura 9. Microestructura (MEB) del complejo *Lolium-Festuca* incubadas *in vitro*. (A y B), degradación de mesófilo a 24 de fermentación; (C y D) restos de epidermis después de 48 h. m, mesófilo; ead, epidermis adaxial; flechas blancas indican degradación de la pared; flechas negras señalan microorganismos ruminales..... 69

INTRODUCCIÓN GENERAL

Los sistemas de producción de baja intensidad de rumiantes predominan en países en desarrollo y se caracterizan por usar alimentos de mediana a baja calidad, ricos en fibra, y por tanto en pared celular vegetal (González *et al.*, 2004). En la mayoría de los vegetales la pared celular contiene 40 a 45 % de celulosa y 30 a 35 % de hemicelulosa; ambos polisacáridos se encuentran unidos mediante puentes de hidrógeno (Bhat y Hazlewood, 2003).

El rumen es un sistema anaerobio con bacterias, protozoarios y hongos (Dehority, 2003). Las bacterias celulolíticas (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* y *R. albus*) son los principales microorganismos implicados en el desdoblamiento de la pared celular vegetal (Koike *et al.*, 2003; Chesson y Forsberg, 1997, citados por Amaya *et al.*, 2005). Sin embargo, este proceso requiere la adhesión del microorganismo al sustrato para facilitar la máxima interacción enzima-sustrato y la hidrólisis del polisacárido (Rakotoarivonina *et al.*, 2005). Los microorganismos adheridos al sustrato representan 70 % de la población total (Fosberg y Lam, 1977) y se consideran los más activos en el desdoblamiento de la pared celular del material fibroso.

La proporción de pared celular y la concentración de lignina incrementan con la madurez de los forrajes, lo que ocasiona baja digestibilidad (Van Soest *et al.*, 1982). En bacterias anaerobias, la adhesión al sustrato y la organización enzimática se facilitan por la formación de complejas estructuras extracelulares (Lynd *et al.*, 2002; Devillard *et al.*, 2004) responsables de la degradación de la celulosa cristalina y de los polisacáridos asociados a la pared celular (Adams *et al.*, 2006). La competencia entre

bacterias celulolíticas en el rumen es complicada debido a las interacciones con especies no celulolíticas (Bhat *et al.*, 1990; Chen y Weimer, 2001). Sin embargo, *R. albus* ha predominado respecto a *F. succinogenes* y *R. flavefaciens* en cultivos tanto *in vitro* como *in vivo*, lo cual se atribuye a los siguientes factores: 1) la producción de sustancias que inhiben el crecimiento de *R. flavefaciens*; 2) la competencia exitosa por adhesión a la celulosa; 3) una mejor adherencia al sustrato a través de su interacción con bacterias no celulolíticas; 4) una mayor habilidad para degradar hemicelulosa y fermentar pentosas (Chen y Weimer, 2001).

1. Planteamiento del problema

Los forrajes para rumiantes se caracterizan por su alta concentración en pared celular y baja digestibilidad; por tanto, su consumo causa un exceso de nitrógeno y una deficiencia de carbohidratos en el rumen, lo cual finalmente resulta en un efecto negativo en la tasa de crecimiento microbiano (Russell, 1998) debido a la relación entre la asimilación de nitrógeno y el metabolismo de carbohidratos (Amaya *et al.*, 2005). La tasa de degradación de las leguminosas es más alta comparada con las gramíneas debido al menor depósito total de lignina, pero la fracción fibrosa de las gramíneas es potencialmente más digestible. Los pastos de climas templados son más digestibles comparados con los de climas tropicales debido a la proporción y a la disposición de tejidos en respuesta a las diferencias en las vías fotosintéticas (Galyean y Goetsch, 1993). *Ruminococcus albus*, *Fibrobacter succinogenes* y *R. flavefaciens* son las principales bacterias celulolíticas ruminales, difieren en sus productos finales de fermentación, y su proporción en la población puede alterar la producción de ácidos

grasos volátiles (AGV) (Chen y Weimer, 2001), los cuales son la principal fuente de energía en rumiantes y esto causa un efecto en su eficiencia productiva.

La población de microorganismos adheridos a sólidos en el rumen es la más activa durante la degradación de polisacáridos asociados a la pared celular vegetal; por tanto, la actividad enzimática es un proceso importante en la liberación de fuentes de carbono disponibles para los microorganismos (Adams *et al.*, 2006). Lo anterior aumenta la captura de nutrientes nitrogenados degradables y mejora el crecimiento microbiano (Atasoglu *et al.*, 2001), cuyo resultado sería un mayor aporte de aminoácidos al intestino y una disminución en la pérdida de nitrógeno (Bach *et al.*, 2005).

El ácido fenilacético y el ácido fenilpropiónico son productos intermedios de la degradación de lignina (Stack y Hungate, 1984) y parecen favorecer la adhesión de *R. albus* hacia la celulosa (Miron *et al.*, 2001). Sin embargo, los ácidos p-cumárico y ferúlico, que también forman parte de esta estructura en muchas gramíneas, pueden afectar la pared celular de varios microorganismos e inhibir la fijación hacia el sustrato.

Por tanto, es importante determinar si la edad de rebrote de un forraje híbrido de zona templada afecta la presencia de tejido lignificado, la actividad de carboximetilcelulasas y de xilanasas de microorganismos ruminales adheridos a residuos sólidos y las variables fermentativas en procedimientos *in vitro*.

2. Objetivos

General:

- Evaluar el efecto de la madurez del forraje en la actividad enzimática (carboximetilcelulasas y xilanasas) de microorganismos ruminales adheridos a

Particulares:

- I. Determinar la actividad enzimática (carboximetilcelulasas y xilanasas) de microorganismos ruminales adheridos a residuos sólidos del complejo *Lolium-Festuca*.
 - II. Evaluar probables relaciones entre variables fermentativas, cinética de producción de gas y actividad enzimática de microorganismos adheridos a sólidos.
 - III. Localizar y diferenciar células y tejidos lignificados en láminas del complejo *Lolium-Festuca* mediante la reacción floroglucinol-HCl y con microscopía de luz en campo claro.
 - IV. Describir mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) la presencia de compuestos extracelulares bacterianos, así como la adherencia y degradación progresiva de la pared celular en función del tiempo de incubación.
 - V. Detectar consorcios microbianos asociados al tejido vegetal durante la degradación *in vitro* del complejo *Lolium-Festuca*, su posible relación con el tipo de tejido, y su evolución a través del tiempo de incubación usando MEB.
3. Hipótesis
- I. La actividad de carboximetilcelulasas y de xilanasas de microorganismos ruminales adheridos a residuos sólidos en fermentación *in vitro* cambia con la

madurez del forraje, y está relacionada con la producción de gas y con la concentración de material lignificado en la estructura vegetal.

- II. La extensión de los sitios de lignificación en la pared celular del complejo *Lolium-Festuca* no aumenta cuando el forraje se cosecha de 28 a 35 días.
- III. La degradación *in vitro* del tejido foliar del complejo *Lolium-Festuca* por microorganismos ruminales es similar entre los tejidos vegetales.
- IV. El desarrollo de complejos extracelulares de microorganismos ruminales adheridos al tejido foliar del complejo *Lolium-Festuca* no depende del tipo de tejido y ni del tiempo de incubación.

4. Revisión de Literatura

4.1. Complejo *Lolium-Festuca*

Este forraje es un híbrido originado por el cruzamiento entre especies del género *Festuca* y *Lolium*. Los rasgos de interés presentes en las dos especies son: *Lolium multiflorum* para un establecimiento rápido, *Lolium perenne* por su mayor sobrevivencia al sobrepastoreo; *Festuca pratensis* o *F. arundinaceae* para aportar persistencia, resistencia a sequía, tolerancia al invierno y características adaptativas (Zwierzykowski *et al.*, 1998; Thomas *et al.*, 2003). *Lolium multiflorum* y *L. perenne* tienen buena palatabilidad y valor nutricional pero los *Festuca* tienen rasgos que podrían mejorar el desempeño de variedades de *Lolium* en diferentes condiciones de crecimiento (Thomas *et al.*, 2003).

Los cultivares comerciales del complejo *Lolium-Festuca* se producen a partir de diversos híbridos entre géneros, pueden agruparse de acuerdo al tipo del cual descenden y se usan para conservación del suelo, establecimiento de praderas

temporales y como forraje (ensilado o pastoreo) (Kopecký *et al.*, 2006). En general, el complejo *Lolium-Festuca* es superior en algunos aspectos a sus progenitores, similar al *Lolium* en cuanto a calidad, y tiende a una mejor sobrevivencia durante el invierno pero no igual al *Festuca*, ya que no sobrevive con temperaturas inferiores a $-14\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Casler *et al.*, 2002).

4.2. Estructura del tejido vegetal en forrajes

El tejido de plantas vasculares se agrupa con base a su continuidad topográfica en tejido dermal, vascular y fundamental. El tejido dermal comprende la epidermis y peridermis; el vascular contiene el floema (conducción de alimento) y xilema (conducción de agua); y el fundamental está compuesto de parénquima en sus dos principales variedades: colénquima y esclerénquima (tejido de soporte con paredes gruesas, duras, y normalmente lignificadas). La distribución del tejido depende del grupo taxonómico, parte vegetal o ambos. En general, el tejido vascular se encuentra dentro del fundamental, y el tejido dermal forma la cubierta más externa. La principal variación depende de la distribución y proporción de tejido vascular y fundamental tanto en tallo como en hoja (Esau, 1977).

4.3. Estructura del tallo

El tallo de las gramíneas contiene una estructura rígida en la cual grandes proporciones de tejido están lignificados (Akin, 1989). Mediante un corte transversal se observa que los tallos contienen haces vasculares dispersos que forman un cilindro continuo de esclerénquima, hebras fibrosas entre haces pequeños y epidermis, y

hebras de clorénquima alternadas con las de fibra (Esau, 1977). Las células de parénquima ocupan 50 a 60 % del área transversal y varían en digestibilidad e histología de la lignina, lo cual depende de la especie y edad de la planta. La epidermis, anillo de esclerénquima y xilema vascular ocupan 28 a 34 % del área transversal, reaccionan con floroglucinol-HCl (F-HCl) para tinción de lignina y son resistentes a la biodegradación (Akin, 1989; Akin, 2007). La pared celular de haces vasculares de pastos de zonas tropicales es gruesa y se tiñe de rojo intenso con F-HCl, lo cual indica mayor concentración de grupos coniferil dentro de la lignina (Akin, 2007).

4.4. Estructura de la hoja

Las hojas de los pastos consisten de un limbo estrecho y una vaina rodeando el tallo; los haces vasculares son de diferentes tamaños siendo mayor el de la parte media; y el mesófilo no muestra diferenciación entre parénquima empalizado y esponjoso (Esau, 1977). En comparación con los pastos de zonas templadas, los de zonas cálidas tienen menor proporción de tejido lignificado (esclerénquima y xilema), el parénquima del haz de la vaina y epidermis es mayor, el área del mesófilo es menor y tienen una mayor densidad de tejido vascular. Las hojas de pastos de zonas templadas, las cuales presentan la vía fotosintética C3, se caracterizan por tener haces vasculares espaciados y mesófilo con un arreglo determinado (Wilson *et al.*, 1983; Akin, 1989). Esta estructura tiende a ser rápidamente degradada dado que sólo el esclerénquima, tejido vascular y cutícula pueden afectar la degradación (Akin, 1989).

4.5. Pared primaria

La pared celular primaria, la capa más externa de la célula mientras se divide y expande (por ejemplo, clorénquima y parénquima), está compuesta de microfibrillas de celulosa, glucoarabinosilanos, β -D glucanos, xiloglucanos, glucomananos, pectinas, proteínas (Bidlack *et al.*, 1992), compuestos aromáticos y sílice (Carpita, 1996). Las microfibrillas de celulosa están compuestas de cadenas lineales de D-glucosa unidas por enlaces β -(1 \rightarrow 4) formando un largo arreglo cristalino alrededor de cada célula. La pared primaria de células adyacentes está separada por la lámina media y ambas estructuras no se lignifican (Wilson, 1993).

4.6. Pared secundaria

La pared celular secundaria, formada por tres capas (S1, S2, y S3) diferenciadas por la orientación de microfibrillas de celulosa, está ubicada en el lado interno de la pared primaria y se sintetiza cuando la expansión celular termina. Las paredes celulares con engrosamiento secundario se lignifican a diferentes niveles y se observa una mayor concentración de elementos del metaxilema (Wilson, 1993).

4.7. Epidermis

El desarrollo de la epidermis, caracterizado por engrosamiento, lignina y una cubierta cerosa en la capa tangencial más externa de sus células, inhibe la penetración y digestión microbiana. La epidermis está unida al cuerpo de la hoja a través de células del mesófilo, pero en pastos de zonas tropicales y en algunos de zonas templadas está unida al haz vascular a través de células de esclerénquima, lo cual dificulta su desdoblamiento.

4.8. Mesófilo

Las células del mesófilo se localizan entre la epidermis adaxial y abaxial, son fácilmente digestibles y constituyen el principal volumen de tejido en la hoja. El espacio intercelular en hoja de pastos C3 es mayor que en pastos C4, lo cual se relaciona con una mayor penetración de bacterias y, por tanto, una mejor digestibilidad. Las células del floema son fácilmente digestibles y constituyen 1 a 2 % del volumen de tejido (Cuadro 1). Las células de parénquima que rodean el haz vascular contienen cloroplastos y alta proporción de proteína y almidón (Wilson, 1993).

Cuadro 1. Proporción de tejido en órganos vegetales de especies templadas

Tipo de forraje	Proporción de tejido en corte tangencial						
	Pared delgada				Pared engrosada		
	EPI	MES	PAR	FLO	PCV	TV	ESC
Pasto C4 (<i>P. maximum</i> var. <i>Trichoglume</i>)							
Lámina	22	31	14	< 1	24	6	2
Costilla media	6	12	57	1	14	7	3
Vaina	4	7	66	1	7	9	6
Tallo	2	2	75	1	0	12	8
Pasto C3 (<i>L. perenne</i>)							
Lámina	23	66	2	< 1	5	3	1
Costilla media	13	66	13	< 1	4	3	1
Vaina		86		< 1	0	4	10
Tallo	2	2	75	< 1	0	9	12

EPI: epidermis, MES: mesófilo, PAR: parénquima, FLO: floema, PCV: parénquima del haz de la vaina, TV: tejido vascular, ESC: esclerénquima. Fuente: modificado de Wilson (1993).

La anatomía de órganos vegetales y tejidos que lo constituyen afecta el consumo, desdoblamiento, tasa de pasaje y digestibilidad de la materia seca de forrajes en rumiantes debido a las características de la pared celular y a la disponibilidad de sus polisacáridos para los microorganismos del rumen (Wilson, 1993).

La calidad del forraje puede evaluarse en términos de fermentación de constituyentes vegetales y cantidad de alimento que consume el rumiante. Los residuos de forrajes maduros e inmaduros provenientes de la degradación microbiana de hojas contienen grandes proporciones de células de xilema y esclerénquima; y de tallos, epidermis, anillos de esclerénquima y xilema. Por tanto, estos tejidos forman barreras estructurales para la degradación microbiana (Akin, 1989).

4.9. Fibra

La fibra no presenta uniformidad nutricional, química ni física; imparte propiedades físicas a los alimentos como una menor densidad energética; su digestibilidad es lenta; contribuye al mantenimiento de un adecuado ambiente ruminal al estimular la rumia y salivación; y forma una estera dentro del rumen que funciona como sistema de filtrado el cual disminuye el paso rápido de partículas y la pérdida de nutrientes (Van Soest *et al.*, 1991).

La pared celular de la mayoría de los vegetales contiene polisacáridos (complejo fibra dietaria) que resisten la actividad de las enzimas digestivas de los mamíferos. Este complejo está compuesto de lignina, celulosa, hemicelulosa y pectina) y no está disponible para no rumiantes, porque cuando se fermenta no produce azúcares sino

ácidos grasos volátiles; además, su digestibilidad varía de acuerdo al tipo de vegetal (Van Soest, 1982).

Al fraccionar la materia seca de los alimentos con solución detergente neutro se obtiene una fracción soluble (lípidos, azúcares, almidón, ácidos orgánicos, nitrógeno no proteínico, pectina y proteína soluble), y una insoluble (hemicelulosa, celulosa, lignina, proteína enlazada a la fibra y nitrógeno unido a lignina) que es parcialmente digestible de acuerdo con el grado de lignificación (Van Soest *et al.*, 1991). Este proceso es más preciso para separar los carbohidratos estructurales de los no estructurales y es la mejor expresión de la fibra disponible (NRC, 2001).

La fibra insoluble de los alimentos es la fibra detergente neutro (FDN) y está mejor relacionada con el consumo y el llenado gastrointestinal, comparada con otras fracciones de la fibra (Van Soest, 1982; Van Soest *et al.*, 1991; Allen, 1997); sin embargo, su concentración está negativamente correlacionada con el contenido de energía (NRC, 2001). En rumiantes, el tiempo diario de rumia es directamente proporcional al consumo de FDN (Van Soest *et al.*, 1991; Allen, 1997), cuya digestibilidad está influenciada por su composición química (proporciones de celulosa, hemicelulosa y lignina). Así, es posible que un alimento con mayor concentración de FDN presente más energía neta (para producción de carne, leche o lana) que otro alimento con una menor concentración de FDN (NRC, 2001). Además, el concepto de fibra efectiva se utiliza para describir el requerimiento mínimo de fibra suficiente para estimular la rumia y mantener el porcentaje de grasa en leche (NRC, 2001), mientras que la fibra físicamente efectiva es considerada como la fracción que estimula la rumia.

4.10. Celulosa

La pared celular de las plantas contiene 40 a 45 % de celulosa, la cual es una cadena lineal de glucosas unidas por enlaces glucosídicos β -1, 4 con estructuras simples (primaria) y complejas (terciaria) (Bhat y Hazlewood, 2003). Cada residuo de glucosa se encuentra rotado en 180° formando segmentos de dos unidades repetidas llamado celobiosa (Van Soest, 1982). La mayoría de las enzimas involucradas en la hidrólisis de la celulosa son endoglucanasas o endocelulasas, exoglucanasas o celobiohidrolasas, y β -glucosidasas o celobiosas. La endoglucanasa hidroliza cadenas de celulosa en forma aleatoria y sus productos finales son pequeños fragmentos de celulosa con varios grados de polimerización, mientras que la exoglucanasa hidroliza polímeros de celulosa (no reducidos y reducidos) y el producto final es la celobiosa; además, la β -glucosidasa libera glucosa de la celobiosa e hidroliza cadenas cortas de celo-oligosacáridos (Bhat y Hazlewood, 2003).

Las regiones cristalinas de la celulosa son rígidas y difícilmente accesibles a las endoglucanasas, mientras que las regiones amorfas pueden ser hidrolizadas por endocelulasas y exocelulasas. Las endoglucanasas y exoglucanasas actúan sinérgicamente para hidrolizar la celulosa y obtener celobiosa, donde actúa la β -glucosidasa para liberar glucosa. Las celulasas son inhibidas en presencia de altas concentraciones de sus productos hidrolizados: las endo y exoglucanasas por celobiosa, y las β -glucosidasas por glucosa (Bhat y Hazlewood, 2003; Beauchemin *et al.*, 2004).

4.11. Hemicelulosa

La celulosa y hemicelulosa son los mayores polisacáridos estructurales de las plantas y pueden ser transformados en azúcares solubles por celulasas y hemicelulasas microbianas (Bhat y Hazlewood, 2003). La hemicelulosa constituye 30 a 35 % de la pared celular de las plantas, es el segundo polisacárido estructural vegetal en abundancia (Bhat y Hazlewood, 2003), sus polisacáridos son solubles en ácido diluido (Beauchemin *et al.*, 2004) y es el más complejo de los polisacáridos vegetales (Van Soest, 1982). La hemicelulosa está unida a la celulosa mediante puentes de hidrógeno; la estructura principal del polímero y sus grupos laterales están unidos mediante enlaces covalentes con compuestos fenólicos y lignina. Las paredes secundarias de células vegetales se caracterizan por un polímero lineal con núcleo de xilanos que consiste de unidades repetidas de residuos de xilosa unidos por enlaces β -1-4; dichos residuos pueden estar enlazados o remplazados por ácido acético, arabinosa y ácido glucorónico (Beauchemin *et al.*, 2004), pero en gramíneas pueden contener ácidos fenólicos, como ácido ferúlico y ácido p-cumárico (Bhat y Hazlewood, 2003).

Con base en los principales residuos de azúcares del polímero, la hemicelulosa está formada por xilanos, glucomananos, galactanos, arabinanos y arabinoxilanos. Las plantas anuales se caracterizan por poseer arabinoxilanos en su estructura, y los principales tipos son: 1) altamente ramificados (endospermas de cereales); 2) menos ramificado y con ácido urónico o 4-O-metil éter y galactosa en su estructura (en tejido lignificado) (Bhat y Hazlewood, 2003).

Las principales enzimas involucradas en la degradación del polímero con núcleos de xilanos son xilanasas y β -1,4 xilosidasa. Las xilanasas o endoxilanasas se clasifican

en específicas (sólo hidrolizan xilanos con enlaces β -1,4) y no específicas (hidrolizan enlaces β -1,4 de xilanos mixtos y otros polímeros unidos mediante enlaces β -1,4) y liberan xilobiosa, xilotriosa, y oligómeros de dos a cuatro unidades (Bhat y Hazlewood, 2003); la β -1,4- xilosidasa libera xilosa. Otras enzimas involucradas en la digestión de las cadenas laterales son β -mannosidasa, α -L-arabinofuranosidasa, acetil y fenil esterasas, α -D-glucoronidasa y ácido ferúlico esterasa (Bhat y Hazlewood, 2003; Beauchemin *et al.*, 2004).

4.12. Lignina

La lignina se forma por la polimerización deshidrogenativa de tres alcoholes (p-cumaril, coniferil, y sinapil) que difieren en el grado de metoxilación en las posiciones C3 y C5 en sus anillos aromáticos. Luego de que estos alcoholes se incorporan en el polímero de lignina reciben el nombre de unidades p-hidroxifenil (H), guayacil (G), y siringil (S). Este polímero también contiene unidades trazas e incompletas provenientes de la formación de los alcoholes e incorpora unidades fenilpropanoide como aldehídos hidroxicinamil, acetatos, p-cumaratos, p-hidroxibenzoatos y ferulato de tiramina (Baucher *et al.*, 2003; Amthor 2003).

Las diferentes y complejas estructuras del polímero de lignina se originan debido a la gran variedad de enlaces químicos entre sus unidades y por la unión del polímero con polisacáridos y proteínas (Amthor, 2003). Sin embargo, su complejidad y heterogeneidad dependen de la proporción de los tres principales alcoholes (Baucher *et al.*, 2003). Por ejemplo, alcohol coniferil y pequeñas cantidades de p-cumaril se polimerizan y forman una mezcla de G y H durante las primeras etapas de lignificación de los forrajes; pero en

la etapa final del desarrollo de la pared secundaria, alcohol coniferil y alcohol sinapil se polimerizan y forman una mezcla de G y S (Grabber *et al.*, 2005).

Debido a su estructura, la lignina provee resistencia mecánica a paredes celulares secundarias (particularmente en madera), mejora la conducción del agua a través del tallo y se usa como mecanismo de defensa y resistencia contra patógenos y perturbación mecánica. Además, puede contribuir a la regulación del ciclo biogeoquímico debido a que una alta concentración del polímero por unidad de fitomasa puede disminuir la tasa de descomposición en tejido vegetal (Amthor *et al.*, 2003).

4.13. Degradación de lignina

La degradación de la pared celular en células de hojas y tallos declina durante la maduración debido primero a la progresiva lignificación de la pared secundaria, pero también contribuyen variaciones en su estructura tridimensional, hidrofobicidad, incrustación y entrecruzamiento a otros componentes de la matriz (Jung and Vogel, 1986; Grabber *et al.*, 2005). Modificaciones en la relación S y G mediante la manipulación directa de genes o selección vegetal, provoca una incorporación inusual de monolignoles (H, G, y S) en su estructura que altera la concentración de p-cumarato, enlaces cruzados de ferulato y quizás otros componentes de la pared celular, e incluso llega a cambiar la distribución de compuestos fenólicos y la anatomía vegetal (Grabber *et al.*, 2005). Al incubar enzimas fúngicas con paredes celulares formadas por unidades G, H y G, o unidades G y S, no se modifica la degradación, lo cual sugiere que los aumentos en la degradación atribuidos a modificaciones en la composición de lignina de germoplasma transgénico y plantas modificadas genéticamente, se deben a cambios

asociados en la composición química de la pared celular. Por tanto, aún no está claro si variaciones en la composición de lignina afectan en forma directa la degradación enzimática de la pared celular (Grabber *et al.*, 2005).

4.14. Enzimas

Las enzimas están formadas por cadenas de aminoácidos cuyo orden específico y forma tridimensional determina su reacción y propiedades catalíticas (Sheppy, 2003). La región de la enzima directamente involucrada en la catálisis es el sitio activo que contiene cadenas de aminoácidos arreglados para enlazarse a sustratos específicos. La reacción enzimática inicia cuando la enzima se une al sustrato formando el complejo enzima-sustrato cuyo resultado después de la reacción es el producto más la enzima, la cual recobra su estado original y su actividad específica (Madigan *et al.*, 2004).

4.15. Degradación de la fibra dentro del rumen

Los rumiantes pueden degradar sustratos fibrosos de origen vegetal compuestos por celulosa y xilanos para usarlos como fuente de energía debido a la relación simbiótica entre huésped y hospedero. Bacterias y hongos ruminales producen una amplia cantidad de enzimas responsables de la degradación de la pared celular vegetal (Allen, 1997), y los microorganismos asociados a partículas de alimento (quimo) inician la degradación de la fibra mediante complejos enzimáticos extracelulares (Cuadro 2) y predominan con respecto a la población total.

Cuadro 2. Bacterias ruminales que producen complejos enzimáticos extracelulares.

Especie	Referencia
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	Berger <i>et al.</i> , 1990
<i>Clostridium cellobioparum</i>	Lamed <i>et al.</i> , 1997
<i>Ruminococcus albus</i>	Ohara <i>et al.</i> , 2000
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	Ding <i>et al.</i> , 2001
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	Miron <i>et al.</i> , 2001

Fuente: modificado de Doi *et al.*, 2003.

Complejos policelulosomales, fimbria o pili, cápsula glicocalix, fibrillas celulósicas, proteínas de fijación hacia la celulosa, y dominios de fijación enzimáticos son estructuras extracelulares relacionadas con la fijación de las bacterias al sustrato dependiendo de la especie bacteriana (Miron *et. al*, 2001). En la mayoría de las bacterias celulolíticas del rumen este complejo está formado por docenas de enzimas enlazadas a una proteína de anclaje formando un módulo de fijación hacia la celulosa, el cual une el complejo a la superficie del sustrato (Hammel *et al.*, 2005).

5. Literatura citada

- Adams, J. J., G. Pal, Z. Jia, and S. P. Smith. 2006. Mechanism of bacterial cell-surface attachment revealed by the structure of cellulosomal type cohesin-dockerin complex. *PNAS* 103(2): 305-310.
- Akin, D. E. 1989. Histological and physical factors affecting digestibility of forages. *Agronomy Journal* 81: 17-25.
- Akin, D. E. 2007. Grass lignocelluloses. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 136-140: 3-16.
- Allen, M. S. 1997. Relationship between fermentation acid production in the rumen and requirement for physically effective fiber. *Journal of Dairy Science* 80: 1447-1462.
- Amann, R. I., W. Ludwig, and K. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Review* 59(1): 143-169.
- Amaya, K. R., S. A. Kocherginskaya, R. I. Mackie, and I. K. O. Cann. 2005. Biochemical and mutational analysis of glutamine synthetase type III from the rumen anaerobe *Ruminococcus albus* 8. *Journal of Bacteriology* 187(21): 7481-7491.
- Amthor, J. S. 2003. Efficiency of lignin biosynthesis: Quantitative analysis. *Annals of Botany* 91: 673-695.
- Atasoglu, C., C. J. Newbold, and R. J. Wallace. 2001. Incorporation of [¹⁵N] ammonia by the cellulolytic ruminal bacteria *Fibrobacter succinogenes* BL2, *Ruminococcus albus* SY3, and *Ruminococcus flavefaciens* 17. *Applied and Environmental Microbiology* 67(6): 2819-2822.
- Bach, A., S. Calsamiglia, and M. D. Stem. 2005. Nitrogen metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science* 88(E. Suppl.): E9-E21.
- Baucher, M., C. Halpin, M. Petit-Conil, and W. Boerjan. 2003. Lignin: Genetic engineering and impact on pulping. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 28: 305-350.
- Beauchemin, K. A., D. Colombatto, and D. P. Morgavi. 2004. A rationale for the development of feed enzyme products for ruminants. *Canadian Journal of Animal Science* 84: 23-36.

- Bhat, S., R. J. Wallace, and E. R. Orskov. 1990. Adhesion of cellulolytic ruminal bacteria to barley straw. *Applied and Environmental Microbiology* 56(9): 2698-2703.
- Bhat, M. K., and G. P. Hazlewood. 2003. Enzymology and other characteristics of cellulases and xylanases. *In*: Bedford, M. R., and G. G. Partridge (eds). *Enzymes in Farm Animal Nutrition*. 2^a ed. CABI International, U. K. pp: 11-59.
- Bidlack, J., M. Malone, and R. Benson. 1992. Molecular structure and component integration of secondary cell walls in plants. *Proceedings Oklahoma Academy of Science* 72: 51-56.
- Carpita, N. C. 1996. Structure and biogenesis of the cell walls of grasses. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 445-476.
- Casler, M. D., P. R. Peterson, L. D. Hoffman, N. J. Ehlke, E. C. Brummer, J. L. Hansen, M. J. Mlynarek, M. R. Sulc, J. C. Henning, D. J. Undersander, P. G. Pitts, P. C. Bilkey, and C. A. Rose-Fricke. 2002. Natural selection for survival improves freezing tolerance, forage yield, and persistence of *Festulolium*. *Crop Science* 42, September-October: 1421-1426.
- Chen, J., and P. J. Weimer. 2001. Competition among three predominant ruminal cellulolytic bacteria in the absence or presence of non-cellulolytic bacteria. *Microbiology* 147: 21-30.
- Dehority, B. A. 2003. *Rumen Microbiology*. Nottingham University Press, U. K. 372 p.
- Deng, W., D. Xi, H. Mao, and M. Wanapat. 2008. The use of molecular techniques based on ribosomal RNA and DNA for rumen microbial ecosystem studies: a review. *Molecular Biology Reports* 35(2): 265-274.
- Devillard, E., D. B. Goodheart, S. K. R. Karnati, E. A. Bayer, R. Lamed, J. Miron, K. E. Nelson, and M. Morrison. 2004. *Ruminococcus albus* 8 mutants defective in cellulose degradation are deficient in two processive endocellulases, cel48A and cel9B, both of which possess a novel modular architecture. *Journal of Bacteriology* 186(1): 136-145.
- Doi, R. H., A. Kosugi, K. Murashima, Y. Tamaru, and S. Ok Han. 2003. Minireview: Cellulosomes from mesophilic bacteria. *Journal of Bacteriology* 185(20): 5907-5914.
- Esau, K. 1977. *Anatomy of Seed Plants*. 2^a ed. John Wiley & Sons, New York. 550 p.

- Forsberg, C. W., and K. Lam. 1977. Use of adenosine 5'-triphosphate as an indicator of the microbiota biomass in rumen contents. *Applied and Environmental Microbiology* 33(3): 528-537.
- Gaylean, M. L., and A. L. Goetsch. 1993. Utilization of forage fiber by ruminants. *In*: Jung, H. G., D. R. Buxton, R. D. Hatfield, and J. Ralph (eds). Forage Cell Wall Structure and Digestibility. International Symposium on Forage Cell Wall Structure and Digestibility sponsored by the USDA-Agricultural Research Service and The U. S. Dairy Forage Research Center, Madison, Wisconsin, 7-10 Oct.1991. pp: 33-71.
- González, M. S. S., G. D. Mendoza M., and M. García W. 2004. Animal agriculture and natural resources. *In*: Rosati A., A. Tewolde, and C. Mosconi (eds). WAAP, Book of the Year-2003. Wageningen Academic Publishers, Netherlands. pp: 217-232.
- Grabber, J. H. 2005. How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability? A review of cell wall model studies. *Crop Science* 48: 820-831.
- Hammel, M., H-P. Fierobe, M. Czjzek, V. Kurkal, J. C. Smith, E. A. Bayer, S.- Finet, and V. Recheveur-Brechot. 2005. Structural basis of cellulosome efficiency explored by small angle X ray scattering. *Journal of Biological Chemistry* 280(46): 38562-38568.
- Jung, H. C., and K. P. Vogel. 1986. Influence of lignin on digestibility of forage cell wall material. *Journal of Animal Science* 62: 1703-1712.
- Koike, S., J. Pan, Y. Kobayashi, and K. Tanaka. 2003. Kinetics of *in sacco* fiber-attachment of representative ruminal cellulolytic bacteria monitored by competitive PCR. *Journal of Dairy Science* 86: 1429-1435.
- Kopecký, D., J. Loureiro, Z. Zweierzykowski, M. Ghesquiére, and J. Dolezel. 2006. Genome constitution and evolution in *Lolium x Festuca* hybrid cultivars. *Theoretical and Applied Genetics* 113: 731-742.
- Lynd, L. R., P. J. Wimer, W. H. Van Zyl, and I. S. Pretorius. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66(3): 506-577.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, y J. Parker. 2004. Brock, Biología de los Microorganismos. 10ª ed. Pearson Prentice Hall, España. 1011 p.

- Miron, J., D. Ben-Ghedalia, and M. Morrison. 2001. Invited review: adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. *Journal of Dairy Science* 84: 1294-1309.
- NRC. 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7^a ed. National Academy Press, U. S. A. 339 p.
- Rakotoarivonina, H., M. A. Larson, M. Morrison, J.-P. Girardeau, B Gaillard-Martinie, E. Furano, and P. Mosoni. 2005. The *Ruminococcus albus pilA1-pilA2* locus: expression and putative role of two adjacent *pil* genes in pilus formation and bacterial adhesion to cellulose. *Microbiology* 151: 1291-1299.
- Russell, J. B. 1998. Strategies that ruminal bacteria use to handle excess carbohydrate. *Journal of Animal Science* 76: 1955-1963.
- Sheppy, C. 2003. The current feed enzyme market and likely trends. *In*: Bedford, M. R., and G. G. Partridge (eds). *Enzymes in Farm Animal Nutrition*. 2^a ed. CABI International, U. K. pp: 1-10.
- Stack, R. J., and R. E. Hungate. 1984. Effect of 3-phenylpropanoic acid on capsule and cellulases of *Ruminococcus albus* 8. *Applied and Environmental Microbiology* 48(1): 218-223.
- Thomas, H. M., W. G. Morgan, and M. W. Humphreys. 2003. Designing grasses with a future-combining the attributes of *Lolium* and *Festuca*. *Euphytica* 133: 19-26.
- Van Soest, P. J. 1982. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. O & B Books, Inc., U. S. A. 374 p.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Symposium: carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 74: 3583-3597.
- Wilson, J. R., R. H. Brown, and W. R. Windham. 1983. Influence of leaf anatomy on the dry matter digestibility of C₃, C₄, and C₃/C₄ intermediate types of *Panicum* species. *Crop Science* 23: 141-155.
- Wilson, J. R. 1993. Organization of forage plant tissue. *In*: Jung, H. G., D. R. Buxton, R. D. Hatfield, and J. Ralph (eds). *Forage Cell Wall Structure and Digestibility*. International Symposium on Forage Cell Wall Structure and Digestibility sponsored by the USDA-Agricultural Research Service and The U. S. Dairy Forage Research Center, Madison, Wisconsin, 7-10 Oct.1991. pp: 1-32.

Zwierzykowski, R. Tayyar, M. Brunell, and A. J. Lukaszewski. 1998. Genome recombination in the intergeneric hybrids between tetraploid *Festuca pratensis* and *Lolium multiflorum*. *The Journal of Heredity* 89(4): 324-328.

CAPÍTULO I. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE MICROORGANISMOS ADHERIDOS A SÓLIDOS, VARIABLES RUMINALES Y CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE GAS *IN VITRO* DEL COMPLEJO *LOLIUM-FESTUCA* EN DOS ETAPAS DE MADUREZ

1.1. Resumen

El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto del complejo *Lolium-Festuca* cosechado a 28 (T1) y 35 (T2) d en la actividad enzimática de microorganismos adheridos a sólidos, síntesis de AGV, N-NH₃, y desaparición *in vitro* de MS (DIVMS). La actividad enzimática (UI g⁻¹ MS) se midió a 39 °C y pH 6.8 por 60 min para carboximetilcelulasas (CMCasas) y 30 min para xilanasas. Se usó la técnica de producción de gas y las muestras de extracto enzimático se obtuvieron a las 12, 16, 24, y 48 h de fermentación. El volumen máximo de gas (Vmax), tiempo lag (L) y tasa fraccional (S) se calcularon con el modelo logístico y el procedimiento NLIN (SAS). El diseño experimental fue de parcelas divididas en bloques aleatorizados, el análisis de los datos se hizo con el procedimiento MIXED (SAS) y la comparación de medias con LSMEANS. La actividad enzimática no fue diferente entre tratamientos ($p > 0.05$). La mayor actividad de CMCasas ($p \leq 0.05$) se observó a las 12 y 16 h de incubación; y la de xilanasas ($p \leq 0.05$) ocurrió después de 16 y 24 h. La DIVMS, Vmax y la concentración de AGV y N-NH₃ a 48 h de incubación fueron mayores en T2 ($p \leq 0.05$). Los valores L y S fueron mayores ($p \leq 0.05$) en T1. Se concluye que no hubo cambios en la actividad de CMCasas y de xilanasas de los microorganismos adheridos a sólidos del complejo *Lolium-Festuca* cosechado a 28 y 35 d. Sin embargo, la madurez del forraje influyó en la DIVMS y en la cinética de producción de gas.

Palabras clave: CMCasas, xilanasas, producción de gas *in vitro*, *Lolium-Festuca*

1.2. Abstract

The effect of *Lolium-Festuca* complex, harvested at 28 (T1) and 35 d (T2), on enzymatic activity from microorganism attached to solids, synthesis of VFA, N-NH₃, and *in vitro* DM disappearance (IVDMD) was evaluated in this study. The enzymatic activity (IUg⁻¹ MS) was measured at 39 °C and pH 6.8, after 1 h for carboxymethylcellulases (CMCases) and after 30 min for xylanases. Samples of enzymatic extract (EE) were obtained at 12, 16, 24, y 48 h of fermentation. Maximum gas volume (V_{max}), lag phase (L), and fractional rate (S) were calculated with the logistic model and NLIN procedure (SAS). The experimental design was randomized blocks with a split-plot arrangement, the data were analyzed with MIXED procedure (SAS), and LSMEANS was used for means test. Enzymatic activity was similar among treatments (p>0.05). The highest CMCase activity (p≤0.05) was obtained at 12 and 16 h of incubation; and that of xylanases was observed after 16 and 24 h. IVDMD, V_{max}, VFA and NH₃-N concentration at 48 h of incubation were higher (p≤0.05) in T2. L and S were higher (p≤0.05) in T1. It is concluded that there was no change on CMCases and xylanases activity of microorganisms attached to solids of *Lolium- Festuca* complex, harvested at 28 and 35 d. However, IVDMD and gas production kinetics were affected by the harvesting date.

Key words: CMCases, xylanases, *in vitro* gas production, *Lolium-Festuca*

1.3. Introducción

Los rumiantes en pastoreo consumen pastos naturales y mejorados (Wadsworth, 1997) con un alto contenido de pared celular que depende de la especie vegetal y etapa fenológica de la planta. En la mayoría de los vegetales la pared celular contiene 40 a 45 % de celulosa y 30 a 35 % de hemicelulosa (Bhat y Hazlewood, 2003) que pueden ser aprovechados por los rumiantes debido a la relación simbiótica con los microorganismos del rumen (Dehority, 2003).

El complejo *Lolium-Festuca* es un híbrido originado por el cruzamiento entre especies del género *Lolium* y *Festuca*, puede agruparse de acuerdo con las especies progenitoras y se usa para conservación del suelo, establecimiento de praderas temporales y producción de forraje (Kopecký *et al.*, 2006). Este complejo combina la alta producción, palatabilidad, calidad y rápido establecimiento de especies de *Lolium* con la adecuada persistencia y resistencia a climas fríos y secos de los *Festuca* (Thomas *et al.*, 2003).

Las bacterias y los hongos del rumen producen enzimas que degradan la pared celular vegetal (Allen, 1997), pero es necesario que estén asociados con las partículas de alimento (quimo) para iniciar la degradación de la fibra. En microorganismos anaerobios, los complejos multienzimáticos que digieren la celulosa están enlazados a la superficie más externa de la célula y se adhieren al sustrato a través de proteínas (Wilson, 2008). Similarmente, los xilanosomas se encuentran en algunos de los microorganismos con actividad de xilanasas (Loera y Villaseñor, 2006). Silva *et al.* (1987) desarrollaron un procedimiento para extraer enzimas con actividad fibrolítica de microorganismos adheridos al sustrato y así predecir la tasa y extensión de la

degradación de forrajes. Sin embargo, esta actividad está determinada por la madurez y el tipo de forraje. Por tanto, el objetivo del presente estudio fue describir el efecto de dos estados de madurez en la extensión y degradación *in vitro* de compuestos estructurales de la pared celular del complejo *Lolium-Festuca*.

1.4. Materiales y métodos

Este estudio se realizó en el Laboratorio de Microbiología Pecuaria del Departamento de Zootecnia en la Universidad Autónoma Chapingo (UACH). El complejo *Lolium-Festuca* se obtuvo del campo experimental de la UACH, se sembró por trasplante de tallo en sustrato Dark Seedling Mix (KEKKILÄ, Finlandia) en rejillas de poliuretano y se mantuvo en el invernadero de forrajes de la UACH. El trasplante a macetas (20 cm Ø superior, 6 tallos maceta⁻¹) se realizó 20 d después y las plantas se trataron con fungicida y plaguicida. El corte para uniformar los pastos se realizó a 5 cm de la base 105 d después del trasplante. El pasto se regó una a dos veces por semana agregando 120 a 140 mL de solución nutritiva (0.150, 0.026, 0.100 y 0.015 g L⁻¹ de N, P, K y Ca) en cada maceta. Los tratamientos (T) fueron complejo *Lolium-Festuca*: cortado a 28 d (T1); cortado a 35 d (T2).

Los resultados del análisis químico (AOAC, 1990) de los pastos fueron: 86.62, 13.38, 83.85, 29.74, 50.40, 29.88 y 16.15 % en T1; 86.28, 13.72, 85.47, 27.58, 52.28, 30.29 y 14.53 % en T2; para humedad, materia seca (MS), materia orgánica (MO), proteína cruda (PC, %N x 6.25), fibra detergente neutro (FDN) y ácido (FDA), y cenizas.

1.4.1. Producción de gas *in vitro*

Se usó la técnica de producción de gas *in vitro* (Theodorou *et al.*, 1994) y se evaluó cinética de producción de gas (volumen máximo de gas (V_{max}), fase de retardo (L), y tasa de producción de gas (S), desaparición *in vitro* de MS (DIVMS), concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) y de nitrógeno amoniacal (N-NH₃), así como actividad enzimática (CMCasas, y xilanasas) de microorganismos adheridos a residuos sólidos.

En frascos de vidrio color ámbar (125 mL, con tapón de hule y aro de aluminio) se colocó 1 g MS de sustrato molido (malla 2 mm Ø) correspondiente a cada tratamiento, excepto en tres que se usaron para ajustar las lecturas de producción de gas debido a la fermentación del contenido del líquido ruminal usado como inóculo. En cada frasco se agregó 90 mL de inóculo ruminal estandarizado (Anexo A) con flujo continuo de CO₂ que se retiró al momento de colocar el tapón de hule y aro de aluminio, y después se sellaron con una rizador manual (SUPELCO, U. S. A). La presión de gas originada por la fermentación del sustrato se midió a 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 24, 30, 36 y 48 h de incubación mediante un manómetro con escala de 0 a 1 kg cm⁻² conectado a una llave trifásica y aguja hipodérmica. La presión interior se igualó a cero después de cada lectura.

1.4.2. Desaparición *in vitro* de la materia seca (DIVMS)

Esta variable se calculó por duplicado a 8, 12, 16, 24, 48, y 96 h de incubación. Para filtrar el contenido se usó papel filtro Whatman (# 541) y una bomba de vacío

(Felisa, vacío 500 mm Hg y 36.8 L min⁻¹). Las muestras se secaron por 24 h en una estufa a 55 °C, se colocaron en desecador hasta peso constante y se registró su peso.

1.4.3. Obtención del extracto enzimático de microorganismos adheridos a sólidos

El tiempo de incubación fue 12, 16, 24 y 48 h y se usaron tres frascos por tratamiento. El contenido de cada frasco se filtró en bolsas (7 x 15 cm) de nylon, las cuales se enjuagaron con flujo moderado de agua corriente hasta que el efluente era claro (Cheng *et al.*, 2008). Se incubó 1 g de residuo húmedo de sustrato fermentado en baño maría a 39 °C por 3 h en 20 mL de amortiguador de fosfato de sodio (10 mM, pH 6.8, y 20 µg de lizosima mL⁻¹) y 2.5 mL de tetracloruro de carbono (Groleau y Fosberg, 1981; Silva *et al.*, 1987). Luego se filtraron para eliminar las partículas de fibra, y el filtrado se centrifugó 20 min a 13 300 X g para precipitar las células residuales (Fosberg *et al.* 1981). El sobrenadante o extracto enzimático, se almacenó 24 h a 4 °C y se midió la actividad CMCasas, xilanasas y mg de proteína. Para calcular el % MS en el residuo húmedo de sustrato fermentado se utilizaron 0.5 g. El residuo se secó 24 h en estufa a 60 °C, se dejó en un desecador hasta peso constante y se registró su peso. El procedimiento se realizó por duplicado.

1.4.4. Actividad de carboximetilcelulasas (CMCasas)

La hidrólisis de carboximetilcelulosa sódica (CMC, viscosidad media; Sigma-Aldrich C4888, U. S. A.) se determinó midiendo la formación de azúcares reductores usando 3,5-ácido dinitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959 y 1960) así como la metodología descrita por Groleau y Fosberg (1981) y la IUPAC (1987a). La mezcla de reacción fue

1.8 mL de sustrato (carboximetilcelulosa sódica 0.5 % p/v en amortiguador de fosfatos 10 mM, pH 6.8) y 0.2 mL de extracto enzimático. La reacción se realizó a 39 °C durante 60 min, luego se adicionaron 3 mL de reactivo DNS para detenerla, se colocaron en agua en ebullición a baño maría por 5 min para desarrollar el color y 5 min en hielo escarchado. Se incluyeron dos blancos: el reactivo que consistió en incubar sustrato y amortiguador de fosfatos, y el muestra, al cual se agregó el extracto enzimático después del DNS para corregir las lecturas debido a la presencia de azúcares reductores en la muestra (IUPAC, 1987a). La absorbancia se leyó a λ 540 nm (celdas de cuarzo 10 x 45 mm) en espectrofotómetro (Perkin Elmer, UV/VIS Lambda 2). La concentración de azúcares reductores equivalentes a glucosa se calculó usando un estándar de D-glucosa (Merck, Alemania). La actividad de CMCasas se reportó como UI g^{-1} MS de residuo sólido, donde una unidad de actividad CMCasa es igual a $1\mu\text{mol min}^{-1}$ de producto liberado por la hidrólisis de CMC equivalente a D-glucosa en las condiciones descritas.

1.4.5. Determinación de proteína

El contenido de proteína se calculó por el método de Lowry (1951) (IUPAC, 1987a). La absorbancia se leyó a λ 750 nm en celdas de cuarzo (10 x 45 mm) en espectrofotómetro Perkin Elmer UV/VIS Lambda 2 (U. S. A.). La curva estándar de albúmina sérica bovina usada para calcular la concentración de proteína se elaboró en diluciones de 20, 40, 80, 120, 160 y 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

1.4.6. Concentración de sustrato, extracto enzimático y velocidad de reacción para calcular actividad de xilanasas

Se realizaron ensayos para asegurar una adecuada concentración de sustrato, velocidad de reacción y concentración de enzima (IUPAC, 1987a y 1987b; Wrolstad *et al.*, 2005). Para que la concentración de sustrato en el volumen de reacción fuera suficiente e independiente de la velocidad de reacción se realizaron ensayos con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, y 8 mg de xilano de avena (Sigma X-0627, U. S. A.) en amortiguador citrato-fosfato pH 6.8. La mezcla fue 1.8 mL de sustrato y 0.2 mL de extracto enzimático y se incubó a 39 °C por 30 min. Se adicionaron 3 mL de DNS, se colocaron en agua (90 °C) a baño maría durante 5 min y luego en hielo escarchado. Para cada concentración de sustrato se incluyó un blanco reactivo y un blanco muestra. La absorbancia se leyó a λ 540 nm.

Un ensayo similar se hizo para mostrar la linealidad de la formación de azúcares reductores equivalentes a xilosa originada por el extracto enzimático a través del tiempo. Los ensayos se realizaron a 1, 2, 3, 5, 7.5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100 y 120 min de incubación y 39 °C. El volumen de reacción fue de 1.8 mL de sustrato (xilano al 0.5 % p/v en amortiguador citrato-fosfato 10 mM, pH 6.8) y 0.2 mL de extracto enzimático (el de mayor actividad de xilanasas). Para desarrollar el color se usó el procedimiento descrito en actividad de CMCasas y se incluyó un blanco muestra y un blanco reactivo en cada tiempo de incubación. La absorbancia se leyó a λ 540 nm.

Para evaluar la relación entre actividad medida y concentración de extracto enzimático se realizaron ensayos con 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, y 1 mL de extracto enzimático y 0.9 mL de sustrato (xilano al 1 % p/v, amortiguador citrato-fosfato 10 mM,

pH 6.8). Se colocó el volumen de sustrato, luego se adicionó el volumen necesario de amortiguador (la diferencia entre volumen total de reacción, 2 mL, y extracto enzimático) y el extracto enzimático. Para desarrollar el color se usó el procedimiento ya descrito y se incluyó un blanco reactivo y un blanco muestra para cada concentración de extracto enzimático. La absorbancia se leyó a λ 540 nm.

1.4.7. Actividad de xilanasas

La hidrólisis de xilano se calculó de manera similar a la de CMCasas. La mezcla de reacción fue de 1.8 mL de sustrato (xilano al 0.5 % p/v en amortiguador citrato-fosfato 10 mM, pH 6.8) y 0.2 mL de extracto enzimático. La reacción se realizó a 39 °C (IUPAC, 1987b) durante 30 min (Borneman, 1989) y se agregaron 3 mL de DNS para detenerla, se colocaron en agua (90 °C) a baño maría y luego en hielo escarchado. La concentración de azúcares reductores equivalentes a xilosa se calculó usando un estándar de D-xilosa (Merck, Alemania). La actividad de xilanasas se reportó en UI g⁻¹ MS de residuo sólido donde una unidad de actividad xilanasa es igual a 1 $\mu\text{mol min}^{-1}$ de producto liberado por la hidrólisis de xilano equivalente a D-xilosa en las condiciones descritas.

1.4.8. Concentración de AGV y N-NH₃

Se tomaron 4 mL del medio a 12, 24 y 48 h de incubación, se mezclaron con 1 mL de ácido metafosfórico al 25 % (Erwin *et al.* 1961), y se almacenaron a 4 °C hasta su análisis. De cada muestra se tomaron 2 mL, se depositaron en viales de 2.5 mL y se centrifugaron a 9 000 X g durante 15 min. Del sobrenadante se tomó 1 μL y se inyectó

en un cromatógrafo de gases (Perkin Elmer, Autosystem, columna capilar Alltech FFAP, U. S. A.). Se usó hidrógeno como gas acarreador con flujo de 20 mL min⁻¹, temperatura de inyector y detector de 250 °C y de horno 80 °C durante 1 min con incrementos de 20°C min⁻¹ hasta alcanzar 140 °C dando un tiempo de corrida de 8 min.

Para calcular la concentración de N-NH₃ se tomaron 20 µL de cada vial y se depositaron en tubos de 10 mL. Se adicionó 1 mL de solución de fenol y 1 mL de solución de hipoclorito de sodio (McCollough, 1967), luego se incubaron en baño maría a 38 °C por 30 min. Después se agregaron 5 mL de agua destilada y se agitaron en un vórtex. La absorbancia se leyó en un espectrofotómetro de luz ultravioleta visible (Perkin Elmer UV/VIS Lambda 2, U. S. A.) a 630 nm. La curva estándar de sulfato de amonio usada para calcular la concentración de N-NH₃ se elaboró en diluciones de 2.5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40 mg dL⁻¹.

1.4.9. Diseño experimental

El diseño fue de parcelas divididas con parcelas completas en bloques aleatorizados (Littell *et al.*, 1999) y los datos se analizaron con el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ijk} = \mu + r_k + \alpha_i + \omega_{ik} + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

$$i = 1, 2$$

$$j = 1, 2, 3, 4$$

$$k = 1, 2, 3$$

Donde:

$$\mu = \text{media general}$$

r_k = efecto del k -ésimo bloque

α_i = efecto del i -ésimo tratamiento

ω_{ik} = efecto del error de la parcela completa

β_j = efecto del j -ésimo tiempo de incubación

$(\alpha\beta)_{ij}$ = efecto de la interacción tratamiento y tiempo de incubación

ε_{ijk} = error experimental

El criterio de bloqueo fue las tres corridas y cada bloque se consideró como parcela completa dividida en tratamientos y tiempo de incubación. Se usó el procedimiento MIXED (SAS, 2003) considerando como efectos aleatorios el bloque y la interacción con tratamientos. Para la comparación de medias se usó LSMEANS ($p \leq 0.05$) y para los contrastes ESTIMATES.

Las variables de cinética de producción de gas (V_{max} , L y S) se obtuvieron usando el modelo logístico $F(t) = v / (1 + e^{2-4r(t-L)})$ (Schofield *et al.*, 1994) y el procedimiento NLIN (SAS, 2003). El diseño fue bloques aleatorizados y los datos de V_{max} , L y S se analizaron con el procedimiento MIXED.

La linealidad de formación de azúcares reductores equivalentes a xilosa a través del tiempo se verificó con la función estimación lineal ($a = mx + b$) de Microsoft Excel (2010), donde un coeficiente de determinación (R^2) de 1 indicaría una relación perfecta y lineal entre la variable dependiente (a , formación de azúcares reductores) y la variable independiente (x , tiempo de incubación).

1.5. Resultados

1.5.1. DIVMS y cinética de producción de gas

La DIVMS en T2 fue mayor ($p \leq 0.05$) en los tiempos de muestreo y coincide con el V_{max} en cinética de producción de gas (Cuadro 3). Los valores de S y L fueron menores ($p \leq 0.05$, Cuadro 3) en T2. La tasa fraccional de producción de gas (Figura 1) fue mayor a las 12 h de incubación en ambos tratamientos.

Cuadro 3. DIVMS y variables de cinética de producción de gas.

DIVMS (%)	Tratamientos			
	T1	T2	EE	($p \leq 0.05$)
Tiempo (h)				
8	38.73	44.56	1.33	0.0001
12	47.63	52.63	1.33	0.0005
16	53.64	57.33	1.33	0.0082
24	59.35	62.73	1.33	0.0148
48	67.29	70.28	1.33	0.0297
96	72.98	76.57	1.33	0.0004
Cinética de producción de gas				
V_{max} (mL g ⁻¹ MS)	263.82	274.31	3.60	0.0087
S (h ⁻¹)	0.0611	0.0589	6.92-E4	0.0047
L (h)	3.5473	3.1995	0.1033	0.0031

T1 y T2: complejo *Lolium-Festuca* cosechado a 28 y 35 d; V_{max} : volumen máximo de gas producido; S: tasa de producción de gas; L: tiempo lag.

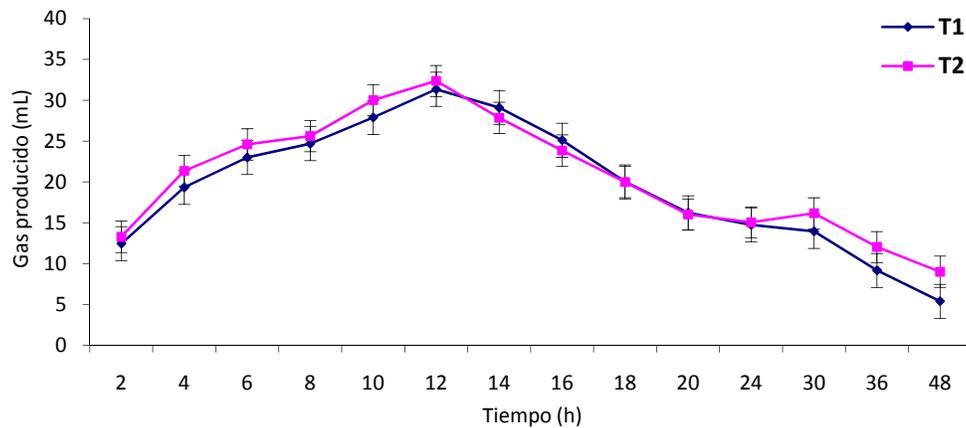


Figura 1. Tasa fraccional de producción de gas (mL) originada por la fermentación *in vitro* del complejo *Lolium-Festuca*.

1.5.2. Concentración de sustrato, de extracto enzimático y velocidad de reacción en actividad de xilanasas

La actividad xilanólítica de uno de los extractos con mayor actividad que se usó para asegurar una adecuada concentración de sustrato en la mezcla de reacción, se muestra en la Figura 2 A. Para concentraciones menores de 1 mg de xilano en el volumen de reacción y 0.2 mL de extracto enzimático, la relación entre formación de azúcares reductores y concentración de xilano fue lineal de primer orden; lo anterior significa que la velocidad de reacción depende de la concentración de sustrato. Con 1 a 3 mg de xilano la velocidad de reacción disminuyó, pero mantenía dependencia con la concentración del sustrato. Sin embargo, cuando se usaron 3, 3.5 y 4.5 mg de xilano, la formación de producto tendió a ser constante e independiente a la concentración de xilano. La relación hiperbólica entre ambas variables (Figura 2 A) indica que con 4.5 mg de xilano la velocidad de reacción no depende de la concentración de sustrato. Así se

corroborar que la concentración de sustrato es mayor a K_m ($[s]$ a $\frac{1}{2}$ de V_{max}), por lo cual variaciones pequeñas en la concentración del sustrato tienen un efecto mínimo en la tasa de reacción (Wrolstad *et al.*, 2005).

La actividad xilanolítica a través del tiempo se muestra en la Figura 2 B. El análisis de regresión entre formación de azúcares reductores y tiempo de incubación fue lineal ($R^2= 0.997$) a 80 min o menos cuando se realiza en las mismas condiciones, lo cual indica que la actividad medida corresponde a la velocidad inicial de la reacción. Luego de este tiempo la tasa de formación del producto disminuye conforme la reacción se aproxima al equilibrio.

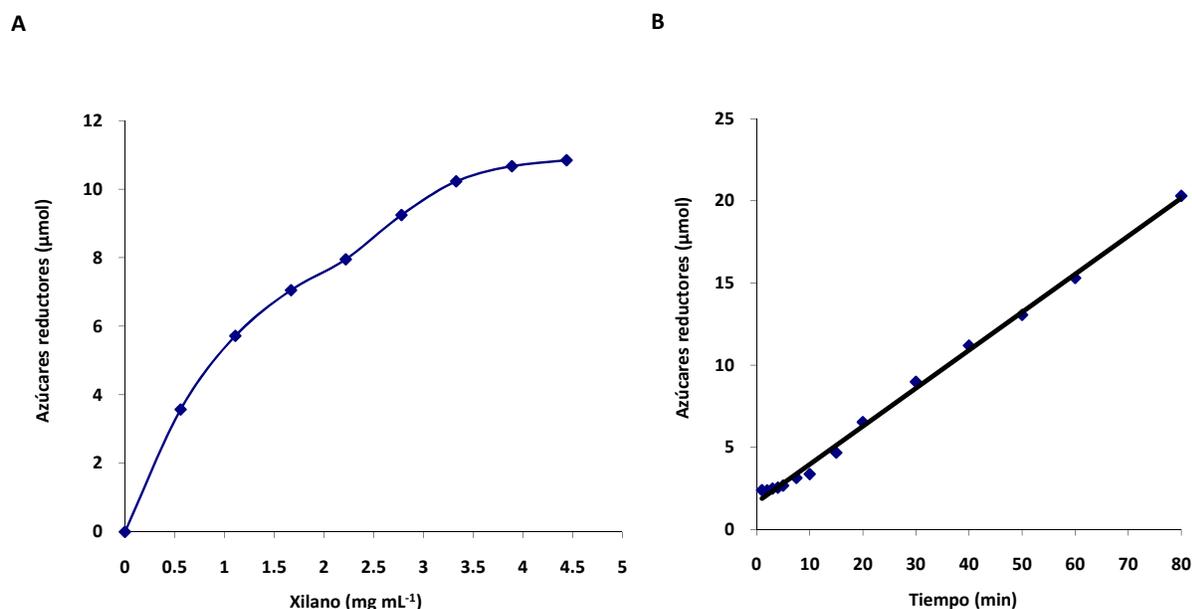


Figura 2. A) Formación de azúcares reductores a diferente concentración de xilano (amortiguador citrato-fosfato, pH 6.8). La reacción se realizó a 39 °C por 30 min. B) Formación de azúcares reductores a través del tiempo. La reacción se realizó a 39 °C; se usó 1.8 mL de xilano al 5% en amortiguador citrato-fosfato pH 6.8. El extracto

enzimático se obtuvo de microorganismos ruminales adheridos a residuos sólidos con 12 h de fermentación *in vitro*.

El efecto de la concentración de extracto enzimático en la formación de azúcares reductores se muestra en la Figura 3. Al incubar de 0 a 0.2 mL de extracto enzimático en el volumen de reacción, la relación con la formación de azúcares reductores fue lineal ($R^2= 0.993$). Esto sugiere que la cantidad de enzima activa explicaría la actividad medida en 30 min a 39 °C usando 0.2 mL de extracto enzimático y 9 mg de xilano.

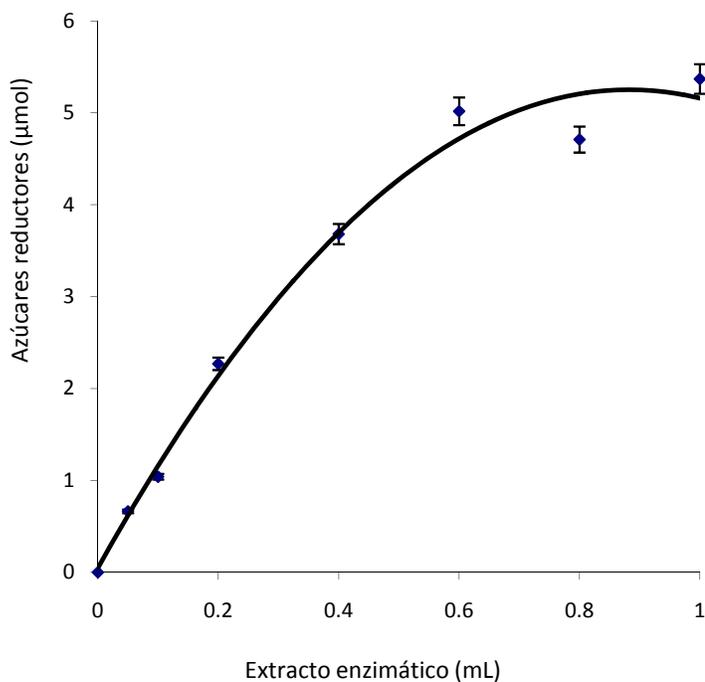


Figura 3. Formación de azúcares reductores a diferente concentración de extracto enzimático de microorganismos ruminales adheridos a sólidos con 12 h de fermentación *in vitro*. El sustrato fue 0.9 mL de xilano al 1 % en amortiguador citrato-fosfato pH 6.8. La reacción se realizó a 39 °C por 30 min.

1.5.3. Actividad de CMCasas y de xilanasas

La actividad de CMCasas no cambió ($p>0.05$) entre tratamientos en los tiempos de muestreo (Cuadro 4) y fue máxima ($p\leq 0.05$) en residuos con 12 y 16 h de incubación (Figura 4). En residuos con 24 y 48 h de incubación la actividad fue menor ($p\leq 0.05$) a la calculada en residuos con 12 y 16 h en ambos tratamientos. La actividad xilanolítica no cambió ($p>0.05$) entre tratamientos (Cuadro 4) y fue máxima ($p\leq 0.05$) a las 16 y 24 h de incubación (Fig. 4). A las 48 y 12 h la actividad de xilanasas fue similar ($p>0.05$) en T1. Sin embargo, en T2 la actividad a las 12 y 48 h fue diferente ($p\leq 0.05$).

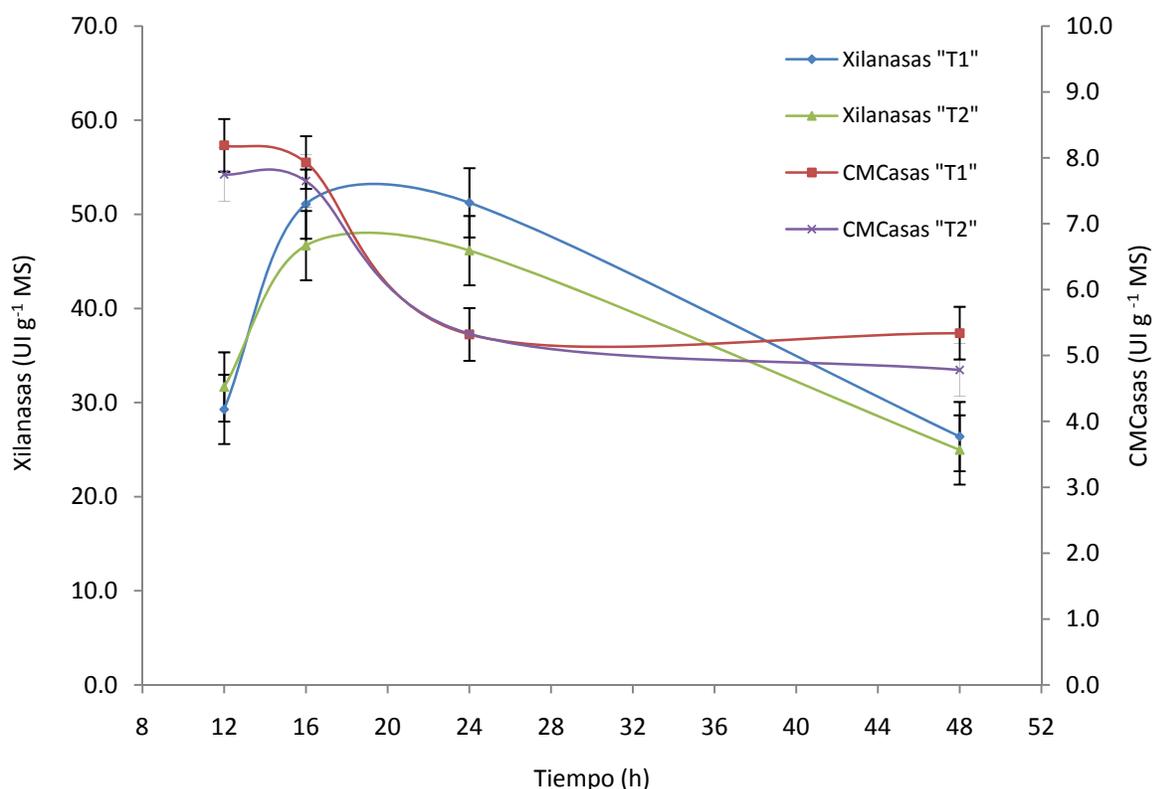


Figura 4. Actividad de CMCasas y de xilanasas de microorganismos adheridos a residuos sólidos del complejo *Lolium-Festuca in vitro*.

Cuadro 4. Actividad de CMCasas y de xilanasas de microorganismos ruminales adheridos a sólidos del complejo *Lolium-Festuca* en producción de gas *in vitro*.

Actividad enzimática (UI g ⁻¹ MS)	Tratamientos		EE	(p≤0.05).
	T1	T2		
CMCasas	6.70	6.38	0.22	NS
Tiempo (h)				
12	8.19 ^a	7.75 ^a	0.40	NS
16	7.93 ^a	7.65 ^a	0.40	NS
24	5.32 ^b	5.33 ^b	0.40	NS
48	5.34 ^b	4.78 ^b	0.40	NS
EE	0.39	0.39		
Xilanasas	39.50	37.37	2.80	NS
Tiempo (h)				
12	29.28 ^a	31.66 ^a	3.68	NS
16	51.09 ^b	46.68 ^b	3.68	NS
24	51.23 ^b	46.15 ^b	3.68	NS
48	26.39 ^a	24.97 ^c	3.68	NS
EE	2.76	2.76		
Proteína (mg mL ⁻¹)	15.03	14.21	0.83	NS
Tiempo (h)				
12	17.71 ^a	17.44 ^a	1.05	NS
16	17.65 ^a	16.66 ^a	1.05	NS
24	14.43 ^b	13.03 ^b	1.05	NS
48	10.31 ^c	9.68 ^c	1.05	NS
EE	0.74	0.74		

^{abc} Medias con distintas literales en cada hilera y columna son estadísticamente diferentes (p≤0.05). UI g⁻¹ MS: unidades internacionales en g de MS; T1 y T2: complejo *Lolium-Festuca* cosechado a 28 y 35 d; NS: no son estadísticamente diferentes (p>0.05), EE: error estándar.

Cuadro 5. Concentración de AGV y N-NH₃ en producción de gas *in vitro*.

Tiempo en incubación (h)	Tratamientos			EE	(p≤0.05).	
	T1	T2				
Acético (mM L ⁻¹)						
12	20.63	24.76		3.71	NS	
24	29.88	32.19		3.71	NS	
48	30.05	42.92		3.71	**	
Propiónico (mM L ⁻¹)						
12	6.01	7.22		1.05	NS	
24	8.70	9.16		1.05	NS	
48	9.69	12.3		1.05	**	
Butírico (mM L ⁻¹)						
12	6.96	8.07		1.49	NS	
24	8.96	9.70		1.49	NS	
48	8.03	12.04		1.49	**	
N-NH ₃ (mg dL ⁻¹)						
12	25.00	25.26		1.22	NS	
24	33.40	32.57		1.22	NS	
48	37.85	41.31		1.22	**	
Proporción molar de AGV						
Tiempo en incubación (h)	T1			T2		
	Acético	Propiónico	Butírico	Acético	Propiónico	Butírico
12	0.61	0.18	0.21	0.62	0.18	0.20
24	0.63	0.18	0.19	0.63	0.18	0.19
48	0.63	0.20	0.17	0.64	0.18	0.18

** Diferencias estadísticamente significativas (p≤0.05). T1 y T2: complejo *Lolium-Festuca* cosechado a 28 y 35 d; NS: no son estadísticamente diferentes (p>0.05); EE: error estándar.

1.6. Discusión

1.6.1. DIVMS y cinética de producción de gas

Los cambios en la DIVMS y las variables de cinética de producción de gas *in vitro* en T2 se pueden deber a la edad de rebrote. En *Lolium-Festuca* a tres estados de madurez (una semana de diferencia) cosechado en primavera hubo aumentos en la concentración de lignina y FDN en el segundo rebrote, lo cual disminuyó la concentración de material fermentable insoluble y su degradación *in vitro* (Moharrery *et al.*, 2009). Así, el aumento en producción de gas total en T2 se puede deber a una mayor concentración de FDN (52.28 vs 50.40 %) y MO (85.47 vs 83.85 %). La adición de glucosa (25 mM) a 0 y 24 h de incubación *in vitro* de diferentes fuentes de fibra redujo la degradación de FDN (Piwonka y Firkins, 1993) debido a una menor colonización de la fibra atribuida a una mayor concentración de carbohidratos no estructurales. En el presente estudio no se midió la concentración de carbohidratos solubles en el forraje pero, con base en lo anterior, la mayor DIVMS en T2 se puede deber a una mayor colonización del sustrato en respuesta a una menor disponibilidad de carbohidratos solubles. Sin embargo, Velasco-Zebadúa *et al.* (2005) mencionan que en *Lolium perenne* con frecuencias de corte de 4 a 6 semanas la PC (%) no cambió, pero la desaparición *in vitro* de MO a 48 h de incubación disminuyó en relación a la frecuencia de corte.

La tasa fraccional (S) de producción de gas fue similar en ambos tratamientos (Figura 1) durante las primeras 24 h de fermentación, pero después el forraje correspondiente a T2 produjo más gas. La concentración de N-NH₃ y AGV a 48 h de

incubación también fue mayor en T2 (Cuadro 5) lo que indica una mayor concentración de material fermentable después de 24 h de incubación. Eun y Beauchemin (2008) señalan que cambios en la producción de gas y en la degradación de materia seca se pueden deber a variaciones en la estructura de la pared celular vegetal y en fracciones no celulares de la pared.

Para describir la curva originada por la producción de gas y reducir las lecturas a variables de interés se usan modelos de crecimiento como el Gompertz y el logístico (Zwietering *et al.*, 1990; Schofield *et al.*, 1994). El modelo logístico tiene un buen ajuste para interpretar los datos de acumulación de gas en procedimientos *in vitro* (Shofield *et al.*, 1994): para describir el crecimiento microbiano parte de cero, acelera a un valor máximo en un periodo de tiempo y disminuye hasta alcanzar un valor constante (Zwietering *et al.*, 1990 y 1992). El tiempo lag (L) es una característica de la producción de gas *in vitro* donde no hay degradación u ocurre a una tasa muy reducida debido a una lenta hidratación del sustrato, adhesión bacteriana y colonización de sustrato insoluble (Dhanao *et al.*, 2000). La duración de L es un cálculo matemático que se obtiene al extrapolar la línea tangente al punto de inflexión de la curva de crecimiento hasta cruzar el eje de las abscisas (Zwietering *et al.*, 1992). Según Schofield *et al.* (1994), valores altos de L resultan de valores bajos de S y viceversa. Sin embargo, los resultados pueden no siempre ser así. Chen *et al.* (2008) reportan aumentos en producción de gas total, S, y L de paja de arroz tratada con hidróxido de sodio, lo cual implica que L aumenta en relación a S. En el presente estudio, el mayor valor de S (0.061 vs 0.058 h⁻¹) y de L (3.54 vs 3.19 h) corresponden a T1 y siguen la relación de a mayor S mayor L. Resultados similares obtuvieron Moharrey *et al.* (2009) en la

degradación de FDN del complejo *Lolium-Festuca* con periodo corto de crecimiento en primavera, donde con un mayor valor de L (3.24 h) hay un mayor valor de S (0.08 h^{-1}). Sin embargo, en el segundo rebrote no sucedió así. France *et al.* (2000) sugieren eliminar L del modelo si el ajuste de la curva no mejora.

El valor de S es proporcional a la cantidad de sustrato degradado (Dhanao *et al.*, 2000; France *et al.*, 2000), donde sustratos con mayor tasa de degradación tienden a ser consumidos en mayor cantidad (Mould *et al.*, 2005) al mejorar la accesibilidad al sustrato debido a una mayor hidratación de partículas, adhesión microbiana y concentración de microorganismos; y una disminución se asocia con restricciones químicas y estructurales (France *et al.*, 2000). Estas restricciones se pueden deber a que la relación pared:contenido celular aumenta con la madurez de la planta (Hodgson, 1990), lo cual reduce su digestibilidad y coincide con el valor de S obtenido en el presente estudio en T1 y T2.

1.6.2. Actividad de CMCasas y de xilanasas

La actividad de CMCasas de bacterias asociadas a partículas indica la colonización del sustrato (Bowman y Firkins, 1993) y puede usarse para evaluar variaciones en el medio ruminal que afectan la tasa de digestión y el desdoblamiento de la fibra (Silva *et al.*, 1987; Piwonka y Firkins, 1993). La actividad de CMCasas no cambió entre tratamientos y el máximo valor se detectó a las 12 y 16 h de incubación. Silva *et al.* (1987) indican una mayor actividad de CMCasas a las 16 y 24 h de incubación independientemente de la fuente de fibra y muestran un coeficiente de correlación de 0.94 con la desaparición *in situ* de MS a 24 h de incubación.

Sin embargo, Piwonka y Firkins (1993) muestran una mayor actividad de CMCasas entre 18 y 24 h de incubación *in vitro* con celulosa y salvado de maíz, pero con cascarilla de soya fue hasta las 48 h. Además, dichos autores señalan que la adición de 50 mM de glucosa a 0 y 24 h de incubación retrasa la actividad de CMCasas y la degradación de la fibra debido a una disminución en la adhesión bacteriana en las primeras horas de incubación. Bowman y Firkins (1993) detectaron una mayor actividad de CMCasas a las 18 h de incubación *in situ* con trébol rojo (*Trifolium pratense*), pero con pasto ovillo (*Dactylis glomerata*) y pasto gama (*Tripsacum dactyloides*) ocurrió a las 36 h. Según Huhtanen *et al.* (1998), hay una mayor actividad de CMCasas a las 24 h de incubación *in situ* en ensilado de pasto, mientras que Muetzel *et al.* (2003) reportan que hubo mayor actividad de CMCasas a las 9 y 12 h de incubación en producción de gas *in vitro* con una leguminosa (*Silbania. Pachycarpa*) y hasta las 18 y 24 h con rastrojo de cebada. El análisis de los resultados de estos estudios indica que el tipo de fibra y la composición de la pared celular afectan la actividad de CMCasas de microorganismos adheridos a residuos sólidos.

Algunos extractos vegetales (saponinas y fenoles) también pueden afectar negativamente la actividad de CMCasas y de xilanasas en experimentos *in vitro* (Muetzel *et al.*, 2003; Patra *et al.*, 2006) e *in vivo* (Wina *et al.*, 2006). Al medir la actividad enzimática en la fracción líquida del quimo ruminal, Ramos *et al.* (2009) observaron aumentos en actividad de CMCasas y de xilanasas cuando cambiaron de 70:30 a 30:70 forraje:concentrado con bajo porcentaje de grano y cerca de 37 % de FDN. Según Chen *et al.* (2008), hay una mayor actividad de CMCasas a las 12 h de incubación en producción de gas *in vitro* con paja de arroz, lo cual es similar a los

resultados del presente estudio; dicha actividad se mantuvo hasta 24 h cuando la paja se trató con NaOH. En el presente estudio sólo se usó un sustrato a estados de madurez que maximizan la producción de MS año^{-1} ; no se utilizó fuente de fibra adicional o algún tratamiento químico, lo cual justificaría la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos en la actividad de CMCasas; y, por tanto, en la colonización del sustrato por microorganismos con actividad celulolítica. La diferencia en la madurez del forraje no afectó la actividad de CMCasas como sucedió en la cinética de producción de gas, lo cual indica que dicha técnica es más sensible para evaluar la fermentación de sustratos mientras que los ensayos enzimáticos lo son para describir la degradación de polisacáridos estructurales.

La tasa fraccional de producción de gas (Figura 1) fue máxima a las 12 h de incubación y coincidió con el inicio de la mayor actividad de CMCasas (Figura 4). Extractos enzimáticos de origen fúngico con actividad fibrolítica aplicables en la alimentación de rumiantes han sido evaluados por Márquez *et al.* (2009), Pinos-Rodríguez *et al.* (2002) y otros autores. En este contexto, mediciones en actividad de CMCasas y de xilanasas de microorganismos ruminales adheridos a sólidos para ayudar a describir los eventos de la degradación de polisacáridos estructurales, podrían contribuir a entender los efectos de estos extractos de acuerdo al tipo de sustrato. Esto debido a que en el presente estudio la actividad de CMCasas se detectó 4 h antes que la de xilanasas y ambas coincidieron a las 16 h de incubación (Figura 4). Williams *et al.* (1989) mencionan que la tasa de remoción de celulosa y hemicelulosa es diferente y mayor al final del ciclo diurno, cuando la población microbiana adherida es máxima, lo cual coincide con los resultados del presente estudio.

La degradación de xilano requiere la interacción de un sistema complejo de enzimas debido a su heterogeneidad. Las xilanasas, que forman parte de este complejo, proveen una fuente de energía metabolizable al participar en la degradación de componentes de la pared celular (Loera y Villaseñor-Ortega, 2006), y por tanto su actividad dentro del rumen es un proceso importante. La mayor actividad xilanolítica ocurrió a las 16 y 24 h de incubación, y no cambió entre tratamientos en el presente estudio. Williams *et al.* (1989) reportan resultados similares en residuos sólidos del quimo de *Lolium perenne* henificado y la actividad aumentó 5 a 6 veces a partir de las 12 h de incubación *in situ*. Según Cheng *et al.* (2008), en residuos de paja de arroz a 6, 12 y 24 h de incubación en producción de gas *in vitro* la actividad aumentó en paja tratada con bicarbonato de amonio y NaOH. Estos autores obtuvieron una mayor actividad a las 24 h de incubación, lo cual es similar a los resultados del presente estudio y a lo reportado por Huhtanen *et al.* (1998) con ensilado de pastos.

Los hongos ruminales parecen favorecer el acceso de las bacterias a la pared celular vegetal y por tanto su degradación (Flint y Bayer, 2008). La actividad de xilanasas de enzimas extracelulares de *Neocallimastix sp.* cultivado en paja de trigo inició 20 h después de la inoculación y la de CMCasas después de 40 h (Lowe *et al.*, 1987). Estudios *in situ* sobre el metabolismo de carbohidratos descritos por Leedle *et al.* (1986) indican que la digestión medible de carbohidratos insolubles (hemicelulosa y celulosa) inicia cuando los carbohidratos solubles y el almidón han sido utilizados por los microorganismos ruminales, lo cual sucede alrededor de las 12 h del periodo postprandial, cuando los microorganismos con actividad fibrolítica están bien establecidos en el material vegetal. Ramos *et al.* (2009) reportan resultados

controversiales y mencionan que la actividad de xilanasas fue mayor en dietas altas en concentrado. Raghuvansi *et al.* (2007) también muestran una mayor actividad de xilanasas en el extracto celular de ovinos alimentados con 60:40 de forraje:concentrado, comparados con ovinos en pastoreo que recibieron 250 g d⁻¹ de concentrado; sin embargo el ensayo sólo se realizó a 6 h después de alimentarlos, cuando la actividad de xilanasas es mínima como lo describen Williams *et al.* (1989) y Wina *et al.* (2006).

1.6.3. Concentración de AGV y N-NH₃

La mayor concentración de AGV y N-NH₃ en T2 a 48 h indica una más alta cantidad de sustrato fermentado, lo cual está sustentado por el Vmax y la DIVMS. Los AGV, producidos por la fermentación microbiana de carbohidratos y proteínas, están determinados por la composición de la población microbiana, nivel de ingesta, tipo de carbohidratos en la dieta, tasa de despolimerización del sustrato disponible, pH ruminal, modificadores metabólicos, frecuencia de alimentación y composición química del sustrato (France y Dijkstra, 2005). Así, alimentos comprendiendo una sola entidad (por ejemplo fibra) son menos propensos a diferencias en la proporción molar de AGV (Dhanao *et al.*, 2000), como sucedió en el presente estudio. En este contexto, dietas altas en forraje favorecen la producción de acetato y mantienen una proporción molar acético:propionico:butírico cercana a 70:20:10 (France y Dijkstra, 2005). La proporción molar de AGV en el presente estudio fue 63:18:18 (Cuadro 5) en los tiempos de muestreo. Por tanto, la madurez del forraje sólo afectó la concentración de AGV y N-

NH₃ después de las 48 h de incubación, y esto se debe a la mayor DIVMS y Vmax en el forraje más maduro.

1.7. Conclusiones

El complejo *Lolium-Festuca* cosechado a 35 d de rebrote produjo más gas y desaparición *in vitro* de materia seca después de 48 h de incubación; sin embargo, la tasa de producción de gas disminuyó. Además, un prolongado tiempo lag no siempre implica una tasa lenta de producción de gas cuando se usa el modelo logístico para describir la cinética de producción de gas.

La concentración de ácidos grasos volátiles y nitrógeno amoniacal a las 48 h de incubación *in vitro* del complejo *Lolium-Festuca* aumentó cuando el forraje se cosechó a 35 d pero no afectó la actividad de CMCasas y de xilanasas de microorganismos ruminales adheridos a residuos sólidos en las condiciones descritas del presente experimento. Además, la actividad máxima de CMCasas sucedió a las 12 y 16 horas de incubación, y la de xilanasas a las 16 y 24 horas de incubación.

1.8 Literatura citada

- Allen, M. S. 1997. Relationship between fermentation acid production in the rumen and requirement for physically effective fiber. *Journal of Dairy Science* 80: 1447-1462.
- AOAC (Association of Official Analytic Chemist). 1990. *Official Methods of Analysis*, 15th ed. Association of Official Analytic Chemist, Washington, DC, USA, 1094 p.
- Bhat, M. K., and G. P. Hazlewood. 2003. Enzymology and other characteristics of cellulases and xilanasas. *In*: Bedford, M. R., and G. G. Partridge (eds). *Enzymes in Farm Animal Nutrition*. 2^a ed. CABI International, U. K. pp: 11-59.

- Borneman, W. S., D. E. Akin, and L. G. Ljungdahl. 1989. Fermentation products and plant cell wall-degrading enzymes produced by monocentric and polycentric anaerobic ruminal fungi. *Applied and Environmental Microbiology* 55(5): 1066-1073.
- Bowman, J. G., and J. L. Firkins. 1993. Effects of forage species and particle size on bacterial cellulolytic activity and colonization *in situ*. *Journal of Animal Science* 71: 1623-1633.
- Chen, X. L., J. K. Wang, Y. M. Wu, and J. X. Liu. 2008. Effects of chemical treatments of rice straw on rumen fermentation characteristics, fibrolytic enzyme activities and populations of liquid –and solid-associated ruminal microbes *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology* 141: 1-14.
- Dehority, B. A. 2003. *Rumen Microbiology*. Nottingham University Press, U. K. 372 p.
- Dhanao, M. S., S. Lopez, J. Dijkstra, D. R. Davies, R. Sanderson, B. A. Williams, Z. Sileshi, and J. France. 2000. Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed *in vitro*: comparison of models. *British Journal of Nutrition* 83: 131-142.
- Dijkstra, J. 1994. Production and absorption of volatile fatty acids in the rumen. *Livestock Production Science* 39 (1): 61-69.
- Erwin, E. S., G. J. Marco, and E. M. Emery. 1961. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. *Journal of Dairy Science* 44 (9): 1768-1770.
- Eun, J. S., and K. A. Beauchemin. 2008. Relationship between enzymatic activities and *in vitro* degradation of alfalfa hay and corn silage. *Animal Feed Science and Technology* 145: 53-67.
- Flint, H. J., and E. A. Bayer. 2008. Plant cell wall breakdown by anaerobic microorganisms from the mammalian digestive tract. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1125: 280-288.
- Forsberg, C. W., T. J. Beveridge, and A. Hellstrom. 1981. Cellulase and xylanase release from *bacteroides succinogenes* and its importance in the rumen. *Applied and Environmental Microbiology* 42(5): 886-896.

- Forsberg, C. W., and K. Lam. 1977. Use of adenosine 5'-triphosphate as an indicator of the microbiota biomass in the rumen contents. *Applied and Environmental Microbiology* 33 (3): 528-537.
- France, J., J. Dijkstra, M. S. Dhanoa, S. Lopez, and A. Bannink. 2000. Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed *in vitro*: derivation of models and other mathematical considerations. *British Journal of Nutrition* 83: 143-150.
- France, J., and J. Dijkstra. 2005. Volatile Fatty Acid Production. *In*: Dijkstra, J., J. M. Forbes, and J. France (eds). *Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism*. 2nd ed. CAB International, U. K. 727 p.
- Groleau, D., and C. W. Forsberg. 1981. Cellulolytic activity of the rumen bacterium *Bacteroides succinogenes*. *Canadian Journal of Microbiology* 27: 517-530.
- Hodgson, J. 1990. *Grazing Management: Science and Practice*. Longman Scientific & Technical. 203 p.
- Huhtanen, P., A. Vanhatalo, and T. Varvikko. 1998. Enzyme activities of rumen particles and feed samples incubated *in situ* with differing types of cloth. *British Journal of Nutrition* 79: 161-168.
- IUPAC. 1987a. Measurement of cellulose activities. *Pure & Applied Chemistry* 59(2): 257-268.
- IUPAC. 1987b. Measurement of hemicellulase activities. Part 1: Xylanases. *Pure & Applied Chemistry* 59(12): 1739-1752.
- Leedle, J. A. Z., K. Barsuhn, and R. B. Hespell. 1986. Postprandial trends in estimated ruminal digesta polysaccharides and their relation to changes in bacterial groups and ruminal fluid characteristics. *Journal of Animal Science* 62: 789-803.
- Littell, R. C., G. A. Milliken, W. W. Sroup, and R. D. Wolfinger. 1999. *SAS* System for Mixed Models*. 3^a ed. SAS Institute Inc., U. S. A. 633 p.
- Loera, O., and F. Villaseñor-Ortega. 2006. Xylanases *In*: Guevara González R. G., and I. Torres Pacheco (eds). *Advances in Agricultural and Food Biotechnology*. Research Signpost, India. pp: 305-322.

- Lowe, S. E., M. K. Theodorou, and A. P. J. Trinci. 1987. Cellulases and xylanase of an anaerobic rumen fungus grown on wheat straw, wheat straw holocellulose, cellulose, and xylan. *Applied and Environmental Microbiology* 53 (6): 1216-1223.
- Lowry, O., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275.
- Márquez, A., G. Mendoza, J. M. Pinos-Rodríguez, H. Zavaleta, S. González, S. Buntinx, O. Loera, and M. Meneses. 2009. Effect of fibrolytic enzymes and incubation pH on *in vitro* degradation of NDF extracts of alfalfa and orchardgrass. *Italian Journal of Animal Science* 8: 221-230.
- McCullough, H. 1967. The determination of ammonia in whole blood by direct colorimetric method. *Clinical Chemistry* 17: 297-304.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31 (3): 426-428.
- Miller, G. L., R. Blum, W. E. Glennon, and A. L. Broton. 1960. Measurement of carboxymethylcellulase activity. *Annals of Biochemistry* 2: 127-132.
- Moharrery, A. T. Hvelplund, and M. R. Weisbjerg. 2009. Effect of forage type, harvesting time and exogenous enzyme application on degradation characteristics measured using *in vitro* technique. *Animal Feed Science and Technology* 153: 178-192.
- Mould, F. L., K. E. Kliem, and R. Morgan. 2005. Alternative methodologies-stretching the *in vitro* box. *Animal Feed Science and Technology* 123-124: 501-515.
- Muetzel, S., E. M. Hoffmann, and K. Becker. 2003. Supplementation of barley straw with *Sesbania pachycarpa* leaves *in vitro*: effects on fermentation variables and rumen microbial population structure quantified by ribosomal RNA-targeted probes. *British Journal of Nutrition* 89: 445-453.
- Patra, A. K., D. N. Kamra, and N. Agarwal. 2006. Effect of plant extracts on *in vitro* methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feed in rumen liquor of buffalo. *Animal Feed Science and Technology* 128: 276-291.
- Pinos-Rodríguez, J. M., S. S. González, G. D. Mendoza, J. R. Bárcena, M. A. Cobos, A. Hernández, and M. E. Ortega. 2002. Effect of exogenous fibrolytic enzyme on ruminal fermentation and digestibility of alfalfa and rye-grass hay fed to lambs. *Journal of Animal Science* 80: 3016-3020.

- Piwonka, E. J., and J. L. Firkins. 1993. Effect of glucose on fiber digestion and particle-associated carboxymethylcellulase activity *in vitro*. *Journal of Dairy Science* 76: 129-139.
- Raghuvansi, S. K. S., R. Prasad, M. K. Tripathi, A. S. Mishra, O. H. Chaturvedi, A. K. Misra, B. L. Saraswat, and R. C. Jakhmola. 2007. Effect of complete feed blocks or grazing and supplementation of lambs on performance, nutrient utilization, rumen fermentation and rumen microbial enzymes. *Animal* 1: 221-226.
- Ramos, S., M. L. Tejido, M. E. Martínez, M. J. Ranilla, and M. D. Carro. 2009. Microbial protein synthesis, ruminal digestion, microbial populations, and nitrogen balance in sheep fed diets varying in forage-to-concentrate ratio and type of forage. *Journal of Animal Science* 87: 2924-2934.
- SAS, Institute Inc. 2003. *Statistical Analysis Software Versión 9.1.3*. Cary North Carolina, U. S. A.
- Schofield, P., R. E. Pitt, and A. N. Pell. 1994. Kinetics of digestion from *in vitro* gas production. *Journal of Animal Science* 72: 2980-2991.
- Silva, A. T., R. J. Wallace, and E. R. Orskov. 1987. Use of particle-bound microbial enzyme activity to predict the rate and extent of fibre degradation in the rumen. *British Journal of Nutrition* 57: 407-415.
- Theodorou, M. K., B. A. Williams, M. S. Dhanoa, A. B. McAllan, and J. France. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology* 48: 185-197.
- Velasco-Zebadúa, Ma. E., A. Hernández-Garay, y V. A. González-Hernández. 2005. Rendimiento y valor nutritivo del ballico perenne (*Lolium perenne* L.) en respuesta a la frecuencia de corte. *Técnica Pecuaria México* 43(2): 247-258.
- Wadsworth, J. 1997. *Análisis de los Sistemas de Producción Animal-Tomo I: Las Bases Conceptuales*. Estudio FAO: Producción y Sanidad Animal 140/1, Roma. 80 p.
- Williams, A. G., S. E. Withers, & N. H. Strachan. 1989. Postprandial variations in the activity of polysaccharide-degrading enzymes in microbial populations from the digesta solids and liquor fractions of rumen contents. *Journal of Applied Bacteriology* 66: 15-26.

- Wilson, D. A. 2008. Three microbial strategies for plant cell wall degradation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1125: 289-297.
- Wina, E., S. Muetzel, and K. Becker. The dynamics of major fibrolytic microbes and enzyme activity in the rumen in response to short- and long-term feeding of *Sapindus rarak* saponins. *Journal of Applied Microbiology* 100: 114-122.
- Wrolstad, R. E., E. A. Decker, S. J. Schwartz, and P. Sporns. 2005. *Handbook of Food Analytical Chemistry: Water, Proteins, Enzymes, Lipids and Carbohydrates*. Wiley-Interscience, U. S. A. 768 p.
- Zwietering, M. H., I. Jongenburger, F. M. Rombouts, and K. van 't Riet. 1990. Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Applied and Environmental Microbiology* 56 (6): 1875-1881.
- Zwietering, M. H., F. M. Rombouts, and K. van 't Riet. 1992. Comparison of definitions of the lag phase and the exponential phase in bacterial growth. *Journal of Applied Bacteriology* 72: 139-145.

CAPÍTULO II. DEGRADACIÓN *IN VITRO* DE TEJIDO FOLIAR DEL COMPLEJO *LOLIUM-FESTUCA* POR ACCIÓN DE MICROORGANISMOS RUMINALES

2.1. Resumen

La degradación *in vitro* del tejido foliar del complejo *Lolium-Festuca* cosechado a 28 (T1) y 35 (T2) d de rebrote se evaluó durante 48 h de incubación. La presión de gas originada en la fermentación del sustrato se monitoreó 48 h con un transductor de presión (0 a 1 kg cm⁻²). La presencia de lignina en el tejido se estudió con la prueba histoquímica de fluoroglucinol y HCl. La degradación de la pared celular y actividad microbiana se evaluó con Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). La anatomía foliar de *Lolium-Festuca* fue típica de una gramínea con metabolismo C3. Las hojas T1 presentaron menor lignificación que las T2; las fibras subepidérmicas abaxiales de la nervadura central fueron más abundantes y más lignificadas en T2 que en T1. A las 12 h de incubación, las observaciones con MEB evidenciaron adherencia microbiana en las paredes no lignificadas de las células epidérmicas y degradación parcial de la pared celular. A las 24 h, la adherencia de población microbiana aumento y las paredes no lignificadas se encontraron ampliamente degradadas, con abundantes y bien desarrollados complejos extracelulares. A las 48 h se detectaron microorganismos adheridos a las paredes lignificadas del xilema y fibras. Estos resultados demuestran la actividad microbiana en las paredes no lignificadas (adherencia y degradación) y lignificadas (adherencia) del tejido foliar del complejo *Lolium-Festuca*. Se sugieren estudios con periodos de incubación mayores a las 48 h.

Palabras clave: *Lolium-Festuca*, pared celular, MEB, histoquímica, lignina, actividad fibrolítica.

2.2. Abstract

The *in vitro* degradation of foliar tissue of *Lolium-Festuca* complex, harvested at 28 (T1) and 35 d (T2) of re-growth, was evaluated during 48h of incubation. The gas pressure produced during the fermentation of the substrate was monitored with a pressure transducer (0 a 1 kg cm⁻²) during 48 h. The lignin presence in the tissue was studied with the histochemical test using fluoroglucinol and HCl. The cell wall degradation and the microbial activity were evaluated with Scanning Electron Microscopy (SEM). The leaf anatomy of *Lolium-Festuca* was typical of a gramineae with C3 metabolism. The T1 leaves showed less lignification than T2; the subepidermal abaxial fibers of the central main vein were more abundant and lignified in T2 than T1. At 12 h of incubation, the MEB observation gave evidence of microbial adherence to the non lignified cell walls of the epidermal cell and partial degradation of the cell wall. At 24 h the adherence of the microbial population increased and the no lignified cell walls were widely depredated with abundant and well developed extracellular complexes. At 48 h microorganisms were detected adhered to lignified cell walls of xylem and fibers. These results demonstrate the microbial activity in the non lignified cell walls (adherence and degradation) and lignified (adherence) of the foliar tissue of *Lolium-Festuca* complex. Further studies are suggested for longer periods than 48 h of incubation.

Key words: *Lolium-Festuca*, cell wall, MEB, histochemistry, lignin, fibrolitic activity.

2.3. Introducción

La degradación de estructuras vegetales en el rumen se lleva a cabo principalmente por bacterias y hongos (Wilson, 2008). Inicia con la adhesión del microorganismo al sustrato lo que maximiza la interacción enzima-sustrato y la hidrólisis del polisacárido (Rakotoarivonina *et al.*, 2005). En bacterias anaerobias, la adhesión al sustrato y organización enzimática se facilita por la formación de complejos proteínicos multienzimáticos, los cuales degradan celulosa cristalina y polisacáridos asociados a la pared celular (Lynd *et al.*, 2002). Los microorganismos adheridos representan 70 % de la población total y son los más activos durante la degradación de estos polisacáridos (Fosberg y Lam, 1977).

El complejo *Lolium-Festuca* es un híbrido entre especies de *Lolium* y *Festuca*, más productivo y persistente que sus antecesores y de buen valor nutritivo (Thomas *et al.*, 2003). En general, las láminas de las gramíneas son más fibrosas y menos digestibles que las de las leguminosas; sin embargo, la porción de fibra detergente neutra (FDN) es potencialmente más digestible. La degradación de la fibra puede limitarse debido a barreras estructurales y químicas como la lignina (Buxton y Redfearn, 1997). Este compuesto se acumula con mayor consistencia en la pared celular de células del tejido vascular y esclerénquima durante la maduración del forraje (Grabber *et al.*, 2005).

Se reconocen dos tipos de pared celular, primaria y secundaria (Esau, 1977). La pared primaria, constituida principalmente de celulosa y hemicelulosa, se forma mientras la célula crece; la pared secundaria aparece después de que la célula detiene su crecimiento y se caracteriza por la incorporación de lignina (Harris y Stone, 2008).

Los componentes de la pared celular son polisacáridos celulósicos y no celulósicos. Los celulósicos están formados por un polímero lineal de D-glucosa en enlaces β (1- \rightarrow 4) y se organiza en fibras paralelas enlazadas por puentes de hidrógeno; los no celulósicos están formados principalmente por xiloglucanos, heteroxilanos, heteromananos, glucoroarabinoxilanos y pectinas (Harris y Stone, 2008). Esta estructura compleja requiere de numerosas enzimas capaces de hidrolizar estos compuestos en hexosas y pentosas. Por tanto, el objetivo del presente estudio fue describir la degradación *in vitro* del tejido foliar por acción de los microorganismos ruminales para tratar de explicar los mecanismos de esos procesos, sus probables mecanismos de acción y sugerir sistemas para un uso más eficiente de los forrajes en los rumiantes.

2.4. Justificación

En regiones de México y otros países, la producción de carne, leche y lana deriva del uso de praderas con forrajes nativos o cultivados. Los forrajes cultivados a menudo utilizan una combinación de gramíneas con leguminosas, o bien, pastos mejorados. El complejo *Lolium-Festuca* es un forraje de zona templada más productivo y persistente que sus antecesores, pero es necesario evaluar su valor nutritivo y digestibilidad.

En anatomía e histoquímica vegetal se usan tinciones histológicas que al reaccionar con algún componente estructural emiten una coloración específica, lo que permite identificar diferentes tejidos y su composición. La técnica de producción de gas *in vitro* se usa para evaluar la degradación de forrajes, permite comparar varios

tratamientos y evaluar distintas variables en un solo experimento. Esta técnica, junto con estudios de anatomía e histoquímica vegetal pueden contribuir a explicar los fenómenos relacionados con la degradación de estructuras vegetales y su probable función en el ambiente ruminal. Además, la Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) es una técnica de alta resolución que permite observar en detalle la interacción microorganismo-sustrato durante los periodos de incubación en líquido ruminal. Con base en lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar y describir, mediante técnicas de histoquímica vegetal y MEB la degradación *in vitro* de tejido foliar del complejo *Lolium-Festuca* cosechado a 28 y 35 d de rebrote y relacionar la respuesta con la producción de gas *in vitro*.

2.5. Materiales y métodos.

2.5.1. Complejo *Lolium-Festuca*.

Las plantas se obtuvieron del campo experimental de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH), Estado de México. Se sembraron por trasplante de tallo en sustrato Dark Seeding Mix (KEKKILÄ, Finlandia) en rejillas de poliuretano y se mantuvieron en el invernadero de forrajes de la UACH. A los 20 d se trasplantaron (6 tallos maceta⁻¹ de 15 L) y se regaron una a dos veces por semana agregando de 120 a 140 mL maceta⁻¹ de solución nutritiva (0.151, 0.026, 0.100 y 0.015 g L⁻¹ de N, P, K y Ca). Después de 105 d se realizó un corte de homogeneización a 5 cm de la base. El complejo *Lolium-Festuca* (CLF) se cosechó a 28 (CLF-28) o 35 (CLF-35) d de rebrote, se secó a 55 °C durante 48 h en estufa de aire forzado y se molió usando malla de 2 mm Ø. Los tratamientos (T) fueron: T1, CLF-28; T2, CLF-35.

2.5.2. Producción de gas *in vitro*

Este estudio se realizó en el Laboratorio de Microbiología Pecuaria del Departamento de Zootecnia de la UACH. En frascos de vidrio color ámbar (125 mL, con tapón de hule y arillo de aluminio) se agregó 1 g MS de sustrato correspondiente a T1 o T2 con 5 repeticiones. Se usaron tres frascos sin sustrato para ajustar las lecturas de producción de gas por fermentación de la digesta en el inóculo. A cada frasco se agregaron 90 mL del inóculo ruminal estandarizado (Theodorou *et al.*, 1994, Mauricio *et al.*, 1999) con flujo continuo de CO₂ que se retiró al colocar el tapón de hule y aro de aluminio. Los frascos se sellaron con una rizador manual ajustable (SUPELCO, U. S. A), la presión de gas *in vitro* originada por la fermentación del sustrato se midió con un transductor de presión (0 a 1 kg cm⁻²) a 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 24, 30, 36 y 48 h de incubación, igualando a cero la presión interior después de cada lectura (Theodorou *et al.*, 1994). Las lecturas de presión se transformaron a volumen de gas mediante la siguiente ecuación de regresión lineal: $V = (P + 0.0159) (0.0163)^{-1}$ (Anexo A). El gas acumulado se obtuvo sumando el valor de cada lectura.

2.5.3. Determinación histoquímica de lignina

Este estudio se realizó en el laboratorio de Anatomía e Histoquímica Vegetal del Postgrado en Botánica, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Estado de México. Se seleccionaron al azar dos tallos de 5 macetas en T1 y T2; se cortó un fragmento de 4 cm de la parte media de la 2^a y 3^a hoja y se fijó en FAA (10 % formaldehído, (37 a 40 % de pureza), 5 % acético, 50 % etanol (95 % de pureza) y 35 % agua; Berlyn y Miksche, 1976). Los tejidos se lavaron con agua y se colocaron en etanol absoluto al 50 %. De cada fragmento se obtuvieron cortes transversales (100

µm) con un micrótopo manual (R. Jung, AG-Heidelberg, Alemania), se cubrieron con una gota de solución de floroglucinol (2 % en etanol 96 %), después de 60 s se adicionó una gota de HCl al 50 % (Krishnamurthy, 1999). Las muestras se observaron en un fotomicroscopio Axiostar Plus (Carl Zeiss, Alemania) con objetivos de 10 y 40X. Las imágenes se capturaron con una cámara digital CyberShot Modelo DSC-S85 (Sony, Japón).

2.5.4. Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Este estudio se realizó en la Unidad de Microscopía Electrónica (UME) del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Para el testigo se usaron secciones transversales de 0.5 cm de longitud de la parte media de la hoja previamente fijada en FAA. Para evaluar su degradación el tejido se lavó con agua destilada y se incubó *in vitro* durante 12, 24, y 48 h según la técnica de producción de gas (Theodorou *et al.*, 1994). Al final de cada tiempo de incubación el contenido de cada frasco se filtró a través de una tela nylon. Los fragmentos residuales se lavaron con agua destilada, y se colocaron en una solución de 3 % de gluteraldehído en amortiguador de fosfatos Sorensen's 0.1 M pH 7.2 (Ruzin, 1999) durante 12 h, después el tejido se deshidrató gradualmente en etanol absoluto al 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 % por 30 min en cada concentración y finalmente tres cambios en etanol absoluto al 100 %. El secado se realizó a punto crítico (Secadora Samdri-780^a, Tousimis) con CO₂ líquido a 1250 PSI y 31 °C; la evacuación del alcohol duró 10 min y el secado 40 min. El tejido se colocó en porta muestras de latón con cinta doble adhesiva de carbón, se recubrió con una aleación oro-paladium (80 y 20 %) durante 6 min en una ionizadora Ion Sputter JFC-

1100 (Jeol, Fine Coat, Japón) y se observó en el MEB (JEOL JSM 6390) operando a 10 y 15 Kv.

2.6. Resultados y discusión

2.6.1. Producción de gas *in vitro*

Con base al volumen de gas acumulado (Figura 5), la mayor actividad de los microorganismos ruminales durante la degradación *in vitro* del tejido foliar del complejo *Lolium-Festuca* sucedió durante las primeras 24 h de incubación.

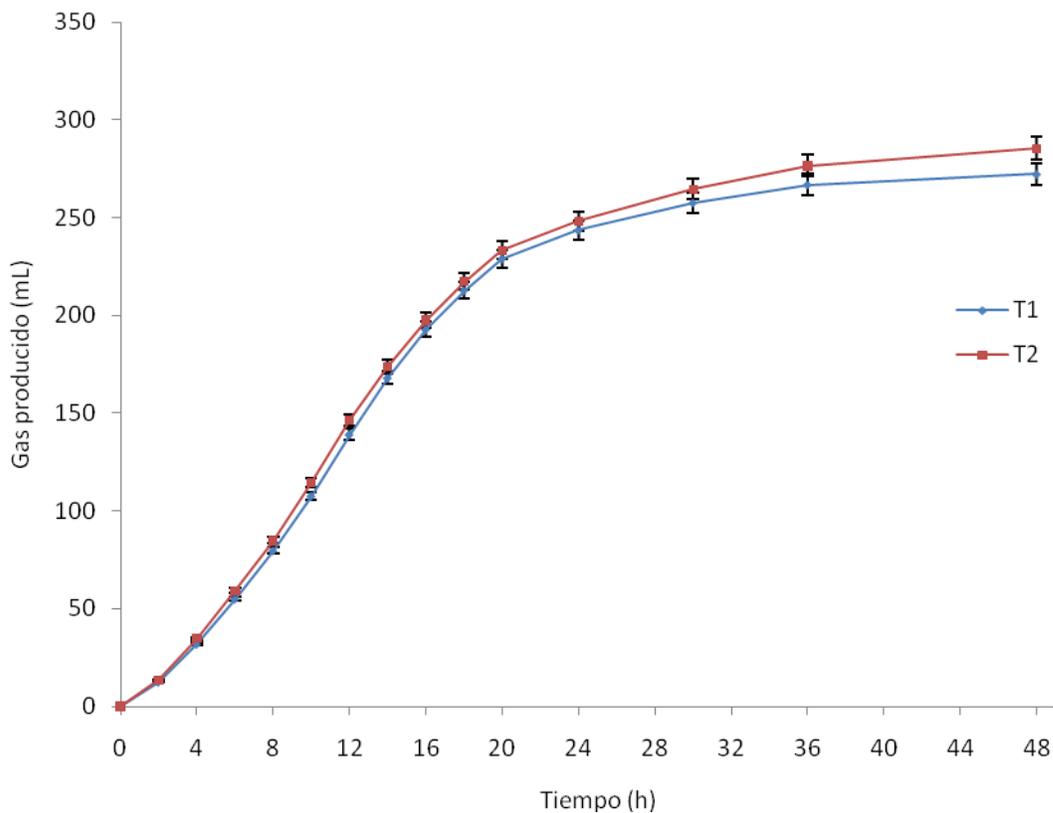


Figura 5. Gas acumulado originado por la fermentación *in vitro* del complejo *Lolium-Festuca*.

Después, la producción de gas fue mínima y provocó una reducción en la pendiente de la curva del volumen de gas acumulado en relación al tiempo de

incubación en ambos tratamientos. Los datos de volumen de gas acumulado se ajustaron a una curva de crecimiento simple sigmoide. Esta información se usó para seleccionar los tiempos de incubación en los cuales se realizaría el estudio con Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).

2.6.2. Anatomía de la hoja del complejo *Lolium-Festuca*

La anatomía foliar del complejo *Lolium-Festuca* es típica de una gramínea C3. La cara adaxial de la lámina se caracteriza por la presencia de surcos y costillas pronunciadas que albergan un haz vascular en cada costilla. La hoja presenta una nervadura central y de 7 a 8 haces vasculares menores a cada lado de la nervadura principal. Los haces vasculares presentan el metaxilema hacia la cara adaxial (haz) y el floema hacia la cara abaxial (envés). La vaina del haz no presentó los cloroplastos característicos de una anatomía Kranz del metabolismo C4 (Esau, 1977); por lo que su ausencia sugiere un metabolismo C3. La epidermis adaxial (haz) presenta tricomas unicelulares y células buliformes bisagra en el valle de las costillas que forman las nervaduras secundarias. Las células de la epidermis abaxial (envés) tienen cutícula gruesa y son mayores que las de la epidermis adaxial. Los estomas se presentan sólo en el envés de la hoja. La reacción positiva con floroglucinol-HCl produce un color rojo que indica la presencia de coniferil y O-4 sinapil aldehído en las moléculas de lignina (Pomar *et al.*, 2002; Krishnamurthy, 1999). Estos grupos predominaron en los elementos de vaso del xilema, fibras del floema, pared interna (forma de u) de las células de la vaina del haz, y esclerénquima (fibras) de células subepidérmicas abaxiales de la nervadura central (Figura 6 B y D); por lo que pueden ser el limitante más efectivo y resistente a la degradación microbiana en el rumen (Akin y Burdick,

1981; Akin, 2007). Las hojas cosechadas a los 35 d presentaron mayor abundancia y lignificación de las fibras subepidermicas abaxiales de la nervadura principal que las de 28 d (Fig. 6 B y D).

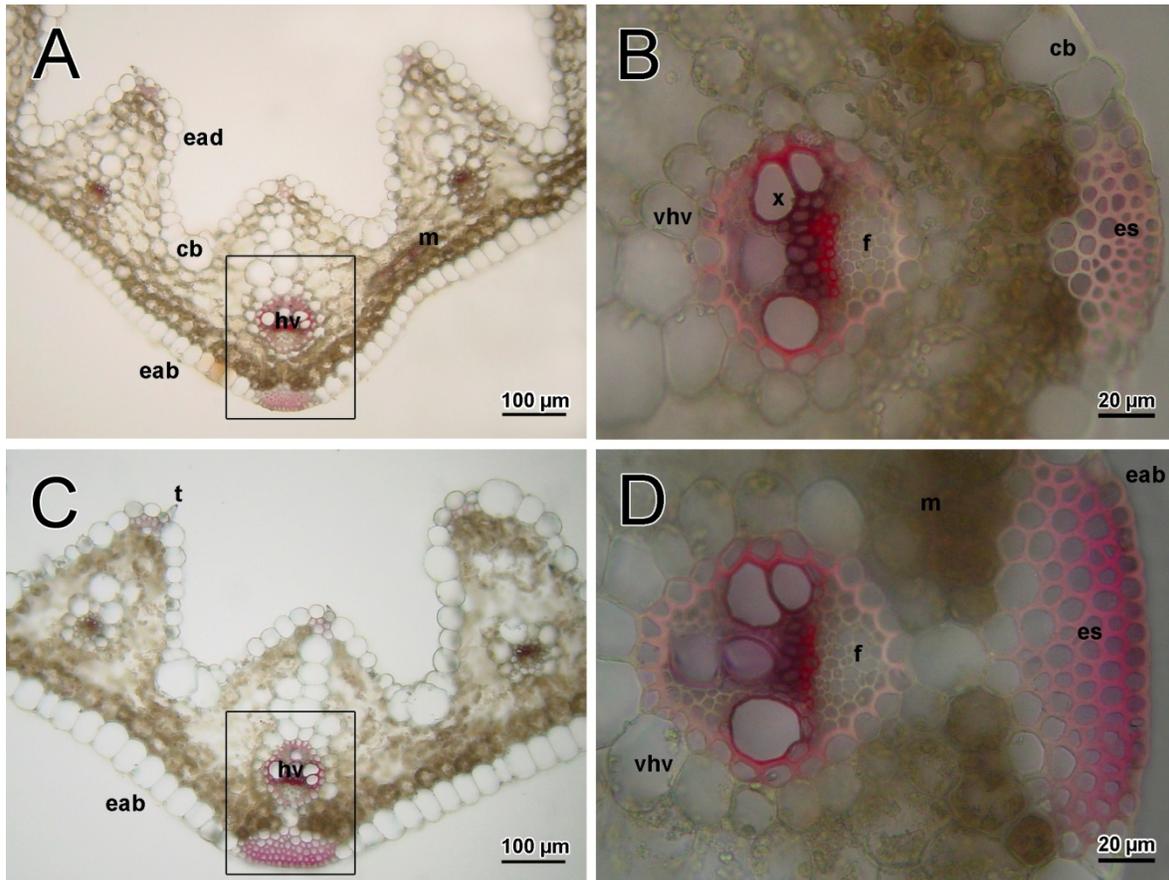


Figura 6. Secciones transversales de hoja del complejo *Lolium-Festuca* teñidas para lignina con floroglucinol-HCl. (A) Cosechado a 28 d, (C) a 35 d; (B) acercamiento de la nervadura central de A; (D) acercamiento de la nervadura central de C. **cb**, células buliformes bisagra; **ead**, epidermis adaxial; **eab**, epidermis abaxial; **es**, fibras subepiedemicas abaxiales de la nervadura media; **f**, floema; **hv**, haz vascular; **m**, mesófilo; **t**, tricoma; **vhv**, vaina del haz vascular; **x**, xilema. El color rojo indica la presencia de lignina.

Los resultados del presente estudio, similares a lo reportado por Akin (1980) y Akin y Burdick (1981), muestran que la tinción es más intensa en la pared celular de los elementos de vaso del xilema, en el centro de la vaina del haz vascular (Figura 6 B). El xilema adquirió un rojo intenso y el esclerénquima de la nervadura central fue positivo a floroglucinol-HCl pero con menor intensidad como lo describe Akin (1989) en hojas de pasto de zona templada. La madurez del tejido aumenta los sitios de lignificación y los hace más extensos (Akin, 1989); fenómeno que se observó en el esclerénquima de la vaina del haz de *Lolium-Festuca*. El tejido de esclerénquima subepidérmico se observó más extendido y lignificado en T2 que en T1 (Fig. 6 C y D). Células de floema y mesófilo no reaccionaron a floroglucinol-HCl mostrando la ausencia de lignina. En general estas células son rápidamente degradadas dependiendo de la especie vegetal. (Akin y Burdick, 1981).

2.6.3. Degradación *in vitro* del tejido vegetal evaluado mediante MEB.

El tejido foliar del complejo *Lolium-Festuca*, antes de su fermentación *in vitro*, mostró su epidermis abaxial y adaxial intacta sin fisuras o daños mecánicos (Figura 7 A y B). La epidermis abaxial presentó una cutícula con escamas cerosas, estomas paracíticos con dos células anexas paralelas asociadas a las oclusivas, y tricomas simples unicelulares (Figura 7 B, D, y F).

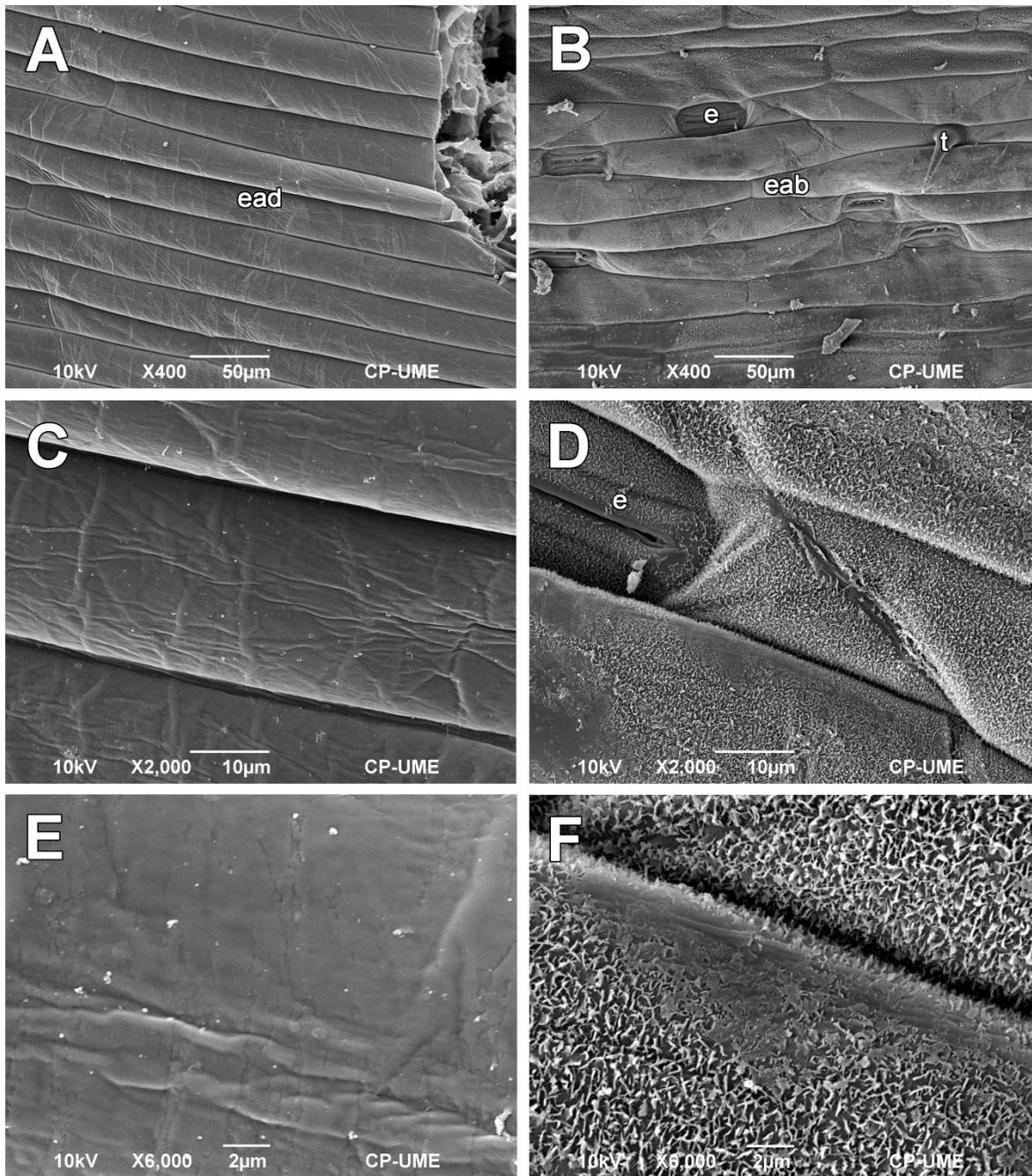


Figura 7. Microestructura foliar (MEB) del complejo *Lolium-Festuca* antes de su fermentación *in vitro*. (A, C y E) epidermis adaxial (ead); (B, D y F) epidermis abaxial (eab); (e) estoma; (t), tricoma.

Después de 12 h de fermentación, los microorganismos ruminales se adhieren a la epidermis e inician la degradación de pared creando fisuras en la epidermis (Figura 8 A y B, flecha blanca).

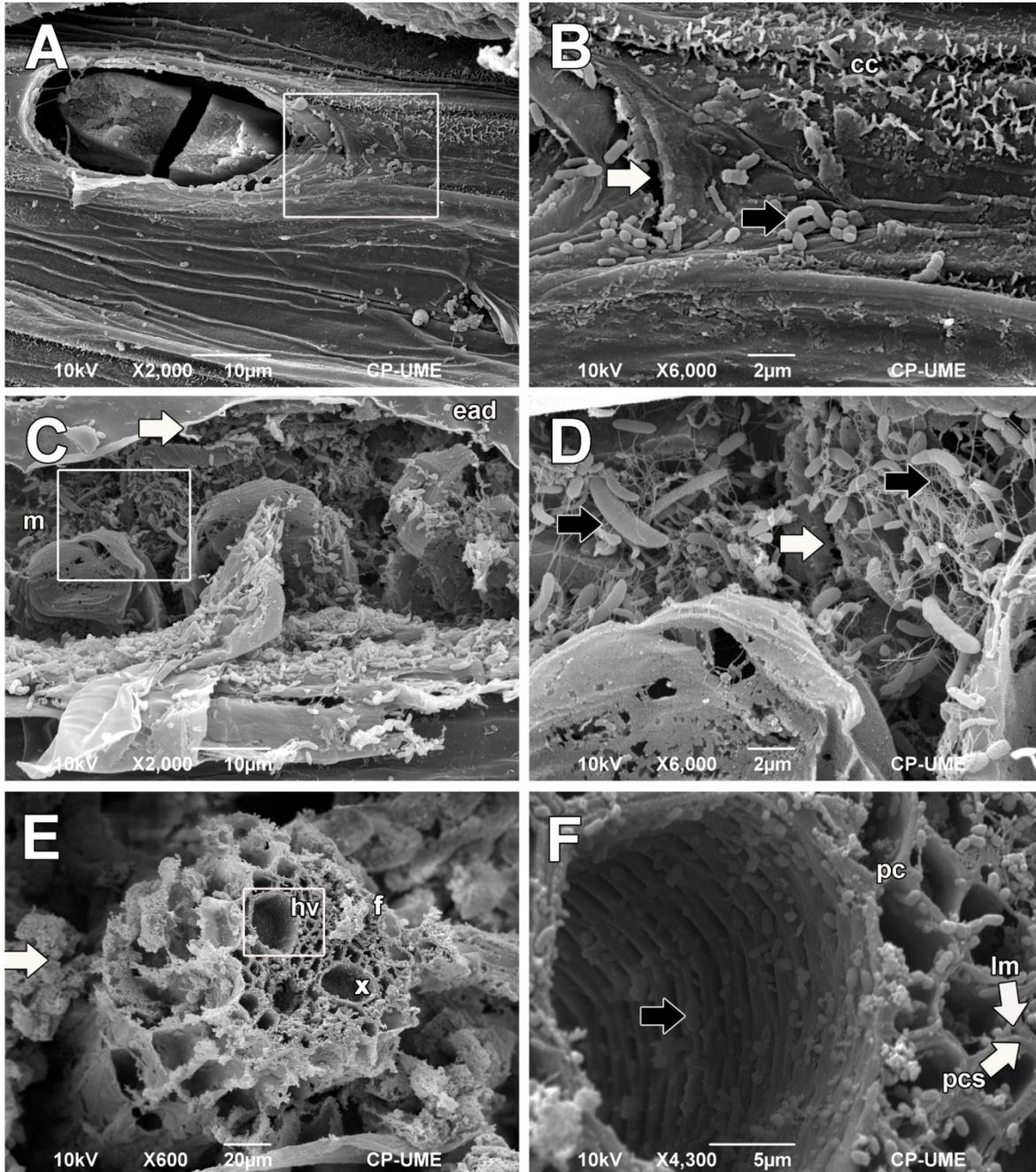


Figura 8. Microestructura (MEB) durante la degradación de la pared celular del complejo *Lolium-Festuca*. (A y B) superficie foliar a 12 h de incubación; (C y D) mesófilo

a 24 h de incubación; (E y F) haz vascular a 48 h de incubación. cc, cutícula cerosa; ead, epidermis adaxial; f, floema; hv, haz vascular; lm, lámina media; m, mesófilo; pc, pared celular; pcs, pared celular secundaria; x, xilema. La flecha negra indica microorganismos ruminales; la flecha blanca, degradación celular.

Se observó la adherencia de algunos microorganismos (flechas oscuras, figura 8 B) cerca de una fisura en donde el inicio de la degradación de la pared celular de la epidermis fue evidente. La epidermis también se considera una barrera estructural debido a la presencia de cutícula; su degradación requiere de la actividad fibrolítica (celulasas y pectinasas) de la población microbiana (Figura 8 A y B). A las 24 h de incubación la actividad fibrolítica de los microorganismos ruminales en paredes celulares del mesófilo también fue evidente (Figura 8 C). Un resultado similar reportó Nuciari (2008) en dos especies de gramíneas (*Elymus breviaristatus subsp. Scabrifolus* y *E. scabriglumis*) donde el floema fue degradado a menor velocidad, pero según (Akin, 1989), esas células no representan barrera física alguna para los microorganismos del rumen.

Después de 24 h de fermentación *in vitro*, diversas especies de microorganismos ruminales colonizaron el mesófilo formando un consorcio para digerir el tejido vegetal (Figura 8 C y D; Figura 9 A y B). Este consorcio consiste de bacterias celulolíticas y no celulolíticas (Koike *et al.*, 2003) que en conjunto aceleran la degradación del sustrato (Chen y Weimer, 2001) y la colonización de otras secciones (Shinkai *et al.*, 2010). Algunas especies de bacterias ruminales produjeron complejos extracelulares que se observaron claramente (Figura 8 D, flechas negras). Estos complejos se conocen con el nombre de apéndices o pequeñas extensiones celulares en *Ruminococcus albus*, y

parecen fijar células bacterianas al sustrato (Weimer *et al.*, 2006), lo que les permite concentrar sus enzimas hidrolíticas en un sitio específico (Doi, 2008). El desarrollo de complejos extracelulares fue mayor a las 24 h de incubación, lo cual pudiera relacionarse con una mayor actividad enzimática. A las 48 h, el mesófilo y la vaina del haz vascular (parénquima) fueron parcialmente degradados, pero los elementos traqueales (vasos) del xilema con paredes engrosadas y ricas en lignina, presentaron adhesión de bacterias y otros microorganismos (Figura 8 F). Nuciari (2008) reporta que el xilema de los haces vasculares, epidermis abaxial y adaxial permanecieron intactos después de 72 h de incubación *in situ*; sin embargo este autor no reporta la capacidad de adhesión de las bacterias a estos tejidos.

Después de 48 h en fermentación hubo una degradación parcial de células de xilema. La técnica de Microscopía Electrónica de Barrido tiene la resolución que permite ver microorganismos ruminales adheridos que exhiben al menos alguna degradación en estos tejidos, como lo muestran Márquez *et al.* (2009) en tallo de alfalfa (*Medicago sativa*) donde, al parecer, bacterias ruminales adheridas al tejido están degradando la pared primaria dejando como residuos células lignificadas. Akin y Rigsby (1985) describen resultados similares en fermentación *in vitro* de *Cynodon dactylon* y *Dactylis glomerata* con 4 a 6 semanas de rebrote. El consorcio bacteriano es diverso morfológicamente, como fue observado en las micrografías tomadas en *Lolium-Festuca* (Figura 9 C y D). Destacan bacterias en forma de espiral, como lo han descrito Shinkai *et al.* (2010) en un consorcio bacteriano incubado 24 h con fluido ruminal. Hendiduras profundas (flecha blanca) se observan en la epidermis adaxial, lo que

sugiere que el mesófilo fue degradado en cantidad considerable; pero no en algunas zonas de la epidermis.

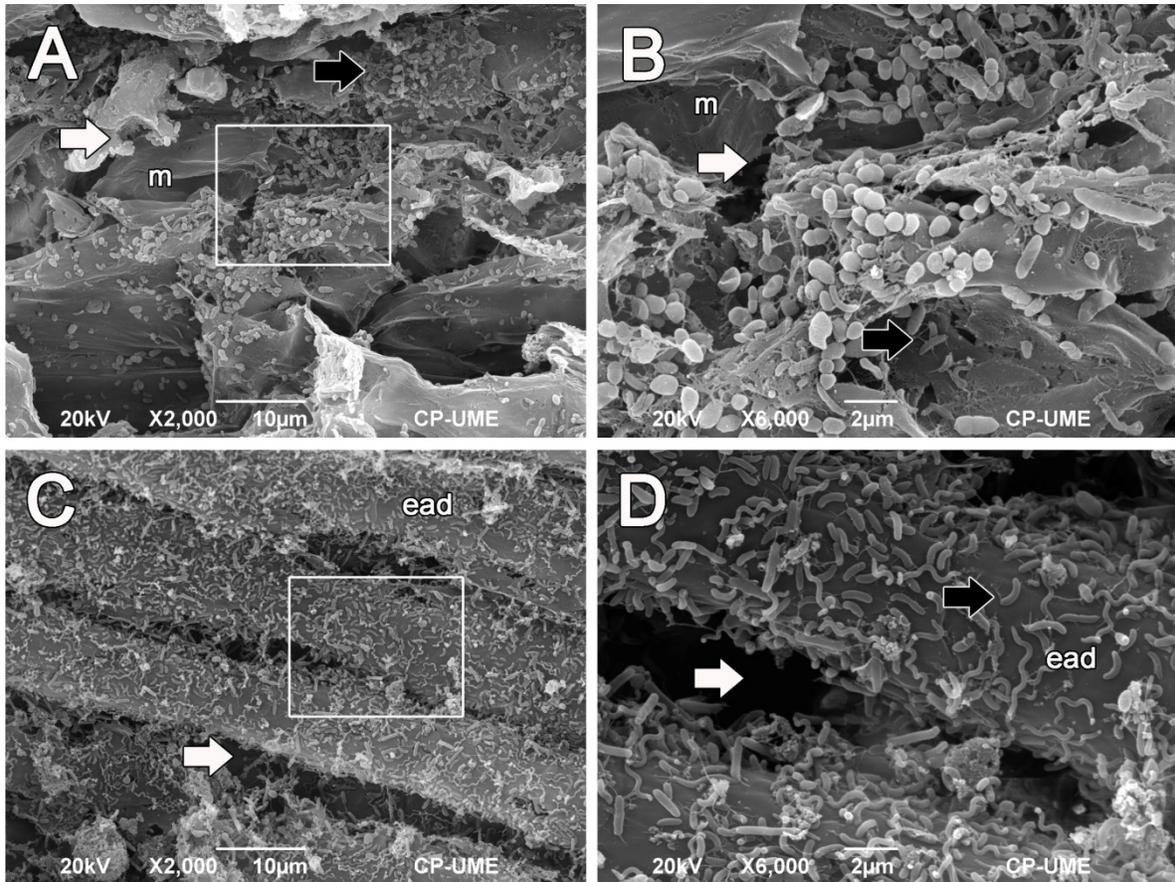


Figura 9. Microestructura (MEB) del complejo *Lolium-Festuca* incubadas *in vitro*. (A y B), degradación de mesófilo a 24 de fermentación; (C y D) restos de epidermis después de 48 h. m, mesófilo; ead, epidermis adaxial; flechas blancas indican degradación de la pared; flechas negras señalan microorganismos ruminales.

Por tanto, el análisis de los resultados de este estudio muestra que la tasa de degradación del tejido foliar varía en relación al tipo de tejido, siendo más lenta en las células con paredes lignificadas como los elementos de vaso del xilema, y las fibras subepidérmicas abaxiales de la nervadura central.

2.7. Conclusiones.

Las observaciones con el Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) evidenció la adhesión de microorganismos ruminales a las paredes lignificadas (elementos de vaso y fibras) del tejido foliar del complejo *Lolium-Festuca* a las 48 h de fermentación *in vitro*. La presencia de lignina en las paredes de estas células se confirmó con la tinción de lignina con floroglucinol-HCl, Estos resultados confirman la capacidad de los microorganismos ruminales para adherirse a paredes lignificadas; incubaciones más prolongadas podrían corroborar la actividad degradadora de pared lignificada. Las paredes celulares no lignificadas (parénquima del mesófilo y floema, negativos a floroglucinol-HCl), fueron rápidamente degradados por consorcios de microorganismos ruminales de los cuales, algunas especies produjeron complejos extracelulares que aumentaron con el tiempo de incubación. La herramienta de MEB es muy útil para la descripción detallada de la degradación de la pared celular y el desarrollo de los complejos extracelulares responsables del proceso de degradación de los componentes de pared.

2.8. Literatura citada

- Akin, D. E. 1980. Attack of lignified grass cell walls by a facultatively anaerobic bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* 40(4): 809-820.
- Akin, D. E., and D. Burdick. 1981. Relationships of different histochemical types of lignified cell walls to forage digestibility. *Crop Science* 21: 577-581.
- Akin, D. E., and L. L. Rigsby. 1985. Degradation of bermuda and orchard grass by species of ruminal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 50(4): 825-830.

- Akin, D. E. 1989. Histological and physical factors affecting digestibility of forages. *Agronomy Journal* 81: 17-25.
- Akin, D. E. 2007. Grass lignocelluloses. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 136-140: 3-16.
- Berlyn, G. P., and J. P. Miksche. 1976. *Botanical Microtechnique and Cytochemistry*. The Iowa State University Press, Ames, Iowa. 326 p.
- Buxton, D. R., and D. D. Redfearn. 1997. Plant limitations to fiber digestion and utilization. *In: Conference: New developments in forage science contributing to enhanced fiber utilization by ruminants*. *Journal of Nutrition* 127: 814S-818S.
- Chen, J., and P. J. Weimer. 2001. Competition among three predominant ruminal cellulolytic bacteria in the absence or presence of non-cellulolytic bacteria. *Microbiology* 147: 21-30.
- Doi, R. H. 2008. Cellulases of mesophilic microorganisms: Cellulosome and noncellulosome producers. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1125: 267-279.
- Esau, K. 1977. *Anatomy of Seed Plants*. 2^a. ed. John Wiley & Sons, New York. 550 p.
- Forsberg, C. W., and K. Lam. 1977. Use of adenosine 5'-triphosphate as an indicator of the microbiota biomass in the rumen contents. *Applied and Environmental Microbiology* 33(3): 528-537.
- Grabber, J. H. 2005. How do lignin composition, structure, and cross-linking affect degradability? A review of cell wall model studies. *Crop Science* 48: 820-831.
- Harris, P. H., and B. A. Stone. 2008. Chemistry and molecular organization of plant cell walls. *In: Himmel, M. E. (ed). Biomass Recalcitrance: Deconstructing the Plant Cell Wall for Bioenergy*. Blackwell Publishing, U. K. pp: 61-93.
- Koike, S., J. Pan, Y. Kobayashi, and K. Tanaka. 2003. Kinetics of *in sacco* fiber-attachment of representative ruminal cellulolytic bacteria monitored by competitive PCR. *Journal of Dairy Science* 86: 1429-1435.
- Krishnamurthy, K. V. 1999. *Methods in Cell Wall Cytochemistry*. CRC Press, U. S. A. 318 p.

- Lynd, L. R., P. J. Wimer, W. H. Van Zyl, and I. S. Pretorius. 2002. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66 (3): 506-577.
- Márquez, A., G. Mendoza, J. M. Pinos-Rodríguez, H. Zavaleta, S. González, S. Buntinx, O. Loera, and M. Meneses. 2009. Effect of fibrolytic enzymes and incubation pH on *in vitro* degradation of NDF extracts of alfalfa and orchardgrass. *Italian Journal of Animal Science* 8: 221-230.
- Mauricio, R. M., F. L. Mould, M. S. Dhanoa, E. Owen, K. S. Channa, and M. K. Theodorou. 1999. A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Animal Feed Science and Technology* 79: 321-330.
- Nuciari, M. C. 2008. Degradación de tejidos foliares en *Elymus breviaristatus subsp. scabrifolius* y *E. scabriglumis*. *Agrociencia* XII (2): 68-77.
- Pomar, F., F. Merino, and A. Ros Barceló. 2002. O-4-linked coniferyl and sinapyl aldehydes in lignifying cell walls are the main targets of the Weisner (phloroglucinol-HCl) reaction. *Protoplasma* 220: 17-28.
- Rakotoarivonina, H., M. A. Larson, M. Morrison, J.-P. Girardeau, B Gaillard-Martinie, E. Furano, and P. Mosoni. 2005. The *Ruminococcus albus pilA1-pilA2* locus: expression and putative role of two adjacent *pil* genes in pilus formation and bacterial adhesion to cellulose. *Microbiology* 151: 1291-1299.
- Shinkai, T., T. Ueki, and Y. Kobayashi. 2010. Detection and identification of rumen bacteria constituting a fibrolytic consortium dominated by *Fibrobacter succinogenes*. *Animal Science Production* 81: 72-79.
- Ruzin, S. E. 1999. *Plant Microtechnique and Microscopy*. Oxford University Press, U. S. A. 336 p.
- Theodorou, M. K., B. A. Williams, M. S. Dhanoa, A. B. McAllan, and J. France. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology* 48: 185-197.
- Thomas, H. M., W. G. Morgan, and M. W. Humphreys. 2003. Designing grasses with a future-combining the attributes of *Lolium* and *Festuca*. *Euphytica* 133: 19-26.

Weimer, P. J., N. P. J. Price, O. Kroukamp, L. M. Joubert, G. M. Wolfaardt, and W. H. Van Zyl. Studies of the extracellular glycocalyx of the anaerobic cellulolytic bacterium *Ruminococcus albus* 7. *Applied and Environmental Microbiology* 72(12): 7559-7566.

Wilson, D. B. 2008. Three microbial strategies for plant cell wall degradation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1125: 289-297.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES

Rebrotos del complejo *Lolium-Festuca* de 28 a 35 d causaron una reducción en la tasa de producción de gas, lo cual fue lo opuesto a lo observado en la desaparición *in vitro* de la materia seca y al volumen de gas total.

La actividad de carboximetilcelulasas y de xilanasas de microorganismos ruminales adheridos a sólidos no se modificó con la edad de rebrote. Sin embargo, fue posible detectar que la degradación de los compuestos celulósicos antecede a la degradación de los compuestos hemicelulósicos.

Además, las observaciones estructurales con el Microscopio de Barrido de Electrones y la tinción histoquímica para lignina permitieron estudiar con más detalle los procesos de degradación de la pared celular y el proceso de adhesión microbiana a las paredes celulares, así como describir las características de las vías de la degradación del forraje en el ambiente ruminal.

Anexo A

Preparación del inóculo ruminal estandarizado

Solución carbonato de sodio

- 8 g de Na_2CO_3
- Aforar a 100 mL con agua destilada

Solución mineral I

- 6 g de K_2HPO_4
- Aforar a 1000 mL con agua destilada

Solución mineral II

- 6 g de KH_2PO_4
- 6 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 12 g de NaCl
- 2.45 g de MgSO_4
- 1.6 g de CaClH_2O
- Aforar a 1000 mL con agua destilada

Solución reductora

- Solución de NaOH 2N
- 2.5 g de Na_2S
- 2.5 g de L-Cisteína
- 1 gota de rezarzurina (100 mg de rezarsurina aforada a 100 mL de agua destilada)

- Disolver la L-Cisteína en 15 mL de solución de NaOH 2N, agregar agua destilada, luego el Na₂S hasta que disolver y aforar a 100 mL.
- Medir la cantidad de solución reductora requerida (20 mL L⁻¹ de solución mineral reducida) y colocarla en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, agregar 2 gotas de rezarzurina y calentar hasta que se torne incolora.

Solución mineral reducida

- 50 mL de solución carbonato de sodio
- 75 mL de solución mineral I
- 75 mL de solución mineral II
- 20 mL de solución reductora
- 780 mL de agua destilada
- Mezclar y colocar en baño maría a 39 °C con burbujeo constante de CO₂ hasta que la solución se torne incolora.

Inóculo ruminal estandarizado

- Se mezcló el fluido ruminal libre de partículas (100 mL) y la solución mineral reducida en relación 1: 9 v/v en baño maría a 39 °C con flujo constante de CO₂.

Anexo B

Transformación de lecturas de presión a volumen de gas

Las lecturas de presión de gas (kg cm^{-2}) se transformaron a volumen de gas utilizando la siguiente relación lineal obtenida a partir de regresión entre presión y volumen:

$$V = \frac{P + 0.0159}{0.0163}$$

Donde:

V = volumen de gas acumulado en el interior del frasco

P = presión generada por dicho volumen (kg cm^{-2})

La ecuación se obtuvo de la siguiente manera: en frascos color ámbar (100 mL) se agregaron 90 mL de agua colocando un tapón de hule y arillo de aluminio y sellándolos mediante una rizador manual. Posteriormente se inyectó volúmenes de gas conocido y se registró la presión generada por dicho volumen. Mediante regresión lineal simple se calcularon los valores β y β_0 obteniendo la siguiente ecuación de regresión lineal simple:

$$P = -0.0159 + 0.0163 V$$
$$r^2 = 0.9968$$

Donde:

P = presión generada por el volumen de gas depositado en el interior del frasco

V = volumen de gas conocido inyectado dentro de cada frasco.