

# **SECCIÓN I**

## **FERMENTACIÓN RUMINAL**

**Autores**

**Ceballos Alejandro**

**Gallo Jorge**

**Giraldo Luisa M.**

**Medina Gloria E.**

**Osorio Fernando**

**Restrepo Juan E.**

**Suárez Martha C.**

# RECCION I

## REACCIONES DE REACCION

1. 2. 3.

Cerebros de ratón

Gallo de campo

Cerebros de ratón

Cerebros de ratón

Cerebros de ratón

Cerebros de ratón

Cerebros de ratón

# Capítulo 1

## PRINCIPALES FACTORES QUE AFECTAN LA ACTIVIDAD CELULOLÍTICA BACTERIANA EN RUMIANTES

*Juan E. Restrepo B, MV, Esp<sup>1</sup>; Martha C. Suárez A, MV, MSc<sup>2</sup>.*

### Resumen

*La utilización de forrajes, esencial en la nutrición de rumiantes, es posible por la actividad metabólica de poblaciones microbianas que fermentan los alimentos ingeridos por el animal y producen ácidos grasos volátiles (AGV) y proteína microbiana que el animal hospederio emplea para su nutrición. El rumen es un ecosistema abierto de flujo continuo que proporciona un ambiente ideal para mantener las poblaciones de hongos, protozoos y bacterias. Un adecuado suministro de alimentos permite mantener estables las condiciones ruminales mejorando el crecimiento de estas poblaciones. El conocimiento del ecosistema ruminal, en especial de las condiciones y requerimientos para el crecimiento de poblaciones bacterianas celulolíticas que degradan fibra, como *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Ruminococcus albus*, y poblaciones que interactúan con éstas, así como los principales factores que pueden afectar este proceso, son indispensables para diseñar estrategias que permitan una utilización óptima de los forrajes. La degradación de la celulosa en el rumen puede verse afectada por diversos facto-*

---

<sup>1</sup> Departamento de Asistencia Técnica, COLANTA E-mail: jrestrepo66@yahoo.com

<sup>2</sup> Profesora Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia.

res como el pH, la dieta suministrada, el tamaño de partícula del forraje, la proporción y fuente de proteína, la fibra, y la energía, así como las interacciones de las bacterias con poblaciones de otras bacterias, hongos y protozoos. El crecimiento óptimo de bacterias celulolíticas se alcanza a un pH de 6.3 a 6.8, a pH superior de 7.0 o inferiores a 6.3 se detiene el crecimiento. El uso de suplementos alimenticios, ricos en carbohidratos de fácil degradación, favorece la acidosis ruminal y puede disminuir las poblaciones celulolíticas y por lo tanto la digestibilidad de la fibra. La incorporación de nitrógeno por las poblaciones de bacterias celulolíticas esta determinada por la presencia de aminoácidos y péptidos y los niveles de energía en la dieta. La adhesión bacteriana al sustrato favorece la hidrólisis enzimática y el tamaño de partícula del forraje permite manipular el tiempo de retención ruminal, incrementando la degradación de la fibra. Para optimizar el crecimiento microbiano se deben establecer los requerimientos de nitrógeno, péptidos, aminoácidos, fibra y energía de los microorganismos. Se debe estudiar otras estrategias para aumentar la degradación de la celulosa como la adición de enzimas y otros aditivos, hongos, ionóforos, o la utilización de microorganismos genéticamente modificados.

**Palabras clave:** Celulosa, fermentación, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*.

## Major factors affecting bacterial cellulolytic activity in ruminants

### Summary

The rumen is a continuous open system with ideal conditions for the growth of bacteria, fungi and protozoa. These microorganisms are responsible for the degradation of forage components that yield volatile fatty acids and microbial protein that are used by the animal for its own nutrition. For optimal use of forages it is necessary to know the requirements and optimal growth conditions for cellulolytic bacteria such as *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* and *Ruminococcus albus* and others that interact with them. Ruminal pH, particle size, amount and type of protein, fiber and energy content of the diet can affect ruminal cellulose degradation as well as the interactions among bacteria, fungi and protozoa. Optimal growth of cellulolytic bacteria is achieved at pH between 6.3 and 6.8 but at pH values over 7.0 and below 6.3 their growth is substantially reduced. The use of supplements containing easily degradable carbohydrates decreases the amount of cellulolytic bacteria and consequently fiber degradation leading to ruminal acidosis. The amount of aminoacids



and peptides and the energy levels of the diet determine nitrogen incorporation by cellulolytic bacteria. . Bacterial adhesion to substrate favors enzymatic hydrolysis and changes in forage particle size allows the manipulation of ruminal retention time, increasing fiber degradation. Nitrogen, aminoacids, peptides, fiber and energy requirements of microorganisms have to be established to optimize microbial growth. Other strategies to increase cellulose degradation such as addition of enzymes fungi, ionophores and the use of genetically modified microorganisms need to be investigated.

**Key words:** Cellulose, fermentation, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*.

## Introducción.

El uso de insumos agrícolas para la producción animal esta compitiendo con la alimentación humana, en la medida en que se destinan grandes cantidades de cereales para la elaboración de alimentos balanceados para animales. El Departamento de planeación de la Cooperativa Lechera Colanta Ltda. reportó para el año 2.001 la utilización de 219.768 toneladas de cereales para la elaboración de concentrados para bovinos, en las diferentes plantas productoras de concentrado en Antioquia (13). El uso excesivo de alimentos a base de cereales en herbívoros, impide un adecuado funcionamiento ruminal. Una alternativa para la alimentación de los bovinos es la utilización de residuos de cosecha y de forrajes producidos a bajos costos, que estos rumiantes tienen la habilidad de transformar, mediante de la fermentación microbiana en el rumen, en proteína de alta calidad (41).

La búsqueda de estrategias que permitan la utilización más racional de recursos agrícolas involucra el conocimiento del rumen; este ecosistema donde microorganismos endosimbiontes (protozoos, hongos y bacterias) transforman los diferentes substratos ingeridos por el rumiante en ácidos grasos volátiles y proteína microbiana utilizable para la nutrición del hospedador. Un adecuado suministro de alimentos permite mantener las condiciones ruminales óptimas para el crecimiento de las diferentes poblaciones, mejorando la fermentación de la ingesta (41).

Conocer las condiciones ideales para el crecimiento y proliferación de poblaciones bacterianas celulolíticas degradadoras de fibra como *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Ruminococcus albus* y de otras po-

blaciones que interactúan con éstas, así como los principales factores que pueden afectar este proceso, nos llevará a proponer alternativas en la alimentación del rumiante para mejorar la utilización de la celulosa (11,16,45,43).

El crecimiento óptimo de bacterias celulolíticas se alcanza a un pH de 6.3 a 6.8., a pH superior de 7.0 o inferiores a 6.3 disminuye el crecimiento, entrando en un período de latencia y reanudando su crecimiento cuando las condiciones ruminales se normalizan; aunque las poblaciones no vuelven a los niveles de degradación que tenían antes del período de acidosis. En las ganaderías lecheras del trópico alto, en nuestro medio, a las vacas se les suministra suplemento alimenticio, mezcla de cereales, en ocasiones dos veces al día, lo cual favorece la presentación de alteraciones ruminales disminuyendo por ende las poblaciones celulolíticas y la digestibilidad de la fibra (2,29).

Bochi, *et al.* (1999) determinaron que la digestibilidad *in vivo* de los forrajes y la actividad celulolítica bacteriana con diferentes dietas, disminuía cuando éstas eran altas en concentrado (7); Ramanzin, citado por Barcena, *et al.* (1994) reporta que el incremento del consumo de materia seca incrementa la digestibilidad de la materia orgánica (5). De igual forma la adhesión bacteriana al sustrato permite una mayor eficiencia de la hidrólisis enzimática y una mayor disponibilidad de los productos en la digestión de la pared celular, además de proteger a las bacterias adheridas de la predación de otros microorganismos ruminales y de aumentar el tiempo de retención bacteriana en el rumen (29, 34, 41). Considerar el tamaño de partícula de forraje suministrada y la naturaleza del alimento fibroso, nos permite manipular la tasa de retención ruminal, incrementando la degradación de la fibra.

El amonio constituye la principal fuente para la síntesis de proteína bacteriana; entre un 50 y 70% del total (27). El crecimiento bacteriano es mayor cuando se incorporan péptidos y aminoácidos (aa) en la dieta (4). Atasoglu, *et al.* (2001), colocaron colonias puras de bacterias celulolíticas en diferentes niveles de péptidos, encontrando que a niveles de 10g/l la incorporación de amoníaco variaba de un 45-75% y a niveles de 1g/l la incorporación de amoníaco era en promedio un 80% (3). La habilidad de las bacterias para la incorporación de nitrógeno o de aa de la dieta está influenciado también por los niveles de energía de la misma (30). La disponibilidad de ATP por parte de los microorganismos ruminales incrementa la multiplicación celular, proporcionando al hospedador (rumiante) un incremento en la degradación de los sustratos ingeridos. El  $Y_{ATP}$  es la medida del ATP producido por los microorganismos: de acuerdo con los modelos matemáticos, se necesita de 3.62 moles de  $Y_{ATP}$  para producir 100g de materia



seca microbiana. El crecimiento bacteriano en el rumen se mide en términos de  $Y_{ATP}$ , cuantificando la transformación de alimentos de la ingesta animal en proteína bacteriana.

Finalmente otro factor a considerar cuando se busca la eficiencia de poblaciones celulolíticas son las interacciones de estos microorganismos con otras poblaciones bacterianas, hongos y protozoos. Los microorganismos ruminales crecen según el alimento suministrado a sus hospedadores, presentándose interacciones de comensalismo, mutualismo, parasitismo, entre otras, en un ecosistema abierto de flujo continuo (45). Estas interacciones se ven afectadas en nuestras ganaderías del trópico alto, por la forma de suministro de alimento concentrado a las vacas de leche, y en el trópico bajo por la falta de suplemento alimenticio (2).

Para optimizar este crecimiento de poblaciones microbianas, los investigadores se han basado en fórmulas y modelos matemáticos para saber los requerimientos de nitrógeno, péptidos, amino ácidos, fibra y energía que deben hacer parte de la ración (31) El reto para los nutricionistas es suministrar forraje verde o seco, combinado con alimentos concentrados en el momento óptimo, en las cantidades necesarias, combinando las diferentes materias primas: almidones de rápida y lenta degradación, proteínas y aditivos para que puedan ser utilizados de manera eficiente por los microorganismos ruminales.

En la presente revisión de literatura se consideraran aspectos relacionados con la utilización eficiente de la celulosa por parte de las poblaciones bacterianas, teniendo en cuenta los principales factores que afectan el crecimiento de estas poblaciones tales como el pH, los componentes, proporciones y tamaño de partícula de la dieta suministrada, así como las interacciones de estos microorganismos con otras poblaciones del rumen.

### **Microorganismos del ecosistema ruminal**

El rumen es un ecosistema abierto y continuo que proporciona un ambiente ideal para mantener las diferentes poblaciones de microorganismos (bacterias, hongos, protozoos). Estas poblaciones están en interacción permanente a través de diversas estrategias como el mutualismo (benéficas para ambos microorganismos), el comensalismo (benéfica para uno sin influir en el otro), el parasitismo (benéfica para uno con desventaja para el otro) y la competencia (compiten varios microorganismos por sustrato o por espacio), permitiendo a través de procesos fermentativos microbianos que el rumiante obtenga los nutrientes indispensables para su nutrición (4,6,15). Lo ideal es mantener condiciones ruminales estables

que permitan un crecimiento de las diferentes poblaciones de microorganismos, para así tener una mejor fermentación (41). Hungate (1966), citado por Yokoyama (1993), considera que el mejor ejemplo de un sistema cooperativo es la relación animal-microbios en el rumen, donde éstos últimos se han constituido como endosimbiontes en el transcurso de la evolución (45). La región dorsal del rumen posee más materia seca, 14-18%, que la región ventral que tiene entre 6-9%. La temperatura se mantiene entre 38 - 42 °C, el pH ruminal 6.2- 6.8 (14, 41) y la cantidad de gases es, aproximadamente, CO<sub>2</sub> : 65%, CH<sub>4</sub> : 27%, N<sub>2</sub> : 7%, O<sub>2</sub> : 0.6%, H<sub>2</sub> : 0.2%, H<sub>2</sub>S : 0.01% (45).

La habilidad para degradar sustratos vegetales es debida a la actividad metabólica de un gran número de especies de bacterias, protozoos y hongos. Las poblaciones bacterianas del rumen se han aislado y cultivado en medios anaerobios descritos desde los años de 1940-1950 (22). En la década de 1980 se identificaron las poblaciones de hongos, que antes se tenían como protozoos ciliados (7). El número de bacterias ruminales anaerobias oscila entre 10<sup>10</sup>-10<sup>11</sup> células por gramo de contenido ruminal y, en una menor cuantía, anaerobias facultativas 10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> células por gramo (45). Baldwin *et al.* (1983) plantea que dos tercios de las bacterias están ubicadas en la pared ruminal (4). Bryant, citado por Yokoyama (1993) ha descrito por lo menos 36 géneros y 63 especies de bacterias ruminales, de las cuales 16 géneros y 28 especies se consideran importantes en términos del metabolismo animal (45).

Varios autores han clasificado las poblaciones de bacterias del rumen agrupándolas según su morfología, el sustrato que fermentan, el producto final generado en la fermentación, o las interacciones con las partículas de alimento. En los años recientes se ha podido evaluar y caracterizar las poblaciones del rumen por medio de la tecnología del ADN (4,16, 18, 21,45). Czerkawski y Cheng, citado por Fondevila (1998) clasifican las bacterias en tres subpoblaciones, con base a la interacción con las partículas de alimento: 1) las vehiculizadas con el fluido ruminal; 2) las débilmente asociadas con las partículas; y 3) las firmemente adheridos a dichas partículas. Los dos últimos grupos representan el 70-80% de la población (16).

Otra clasificación de las diferentes poblaciones bacterianas es la propuesta por Baldwin, *et al.* (1983) la cual se resume en la tabla 1. Esta clasificación es tomada por el autor a partir de la realizada por Hungate (1966) que se basa en especificidad del sustrato, productos de la fermentación y requerimientos nutricionales para su crecimiento (4).



**TABLA 1 Microorganismos ruminales**

ESPECIE MICROBIANA	NÚMERO DE CEPAS/ TOTAL AISLADAS	SUSTRATO SECUNDARIO <sup>a</sup>	PRODUCTOS EN CULTIVO MIXTO <sup>b</sup>	FACTORES DE CRECIMIENTO
<b>Celulolíticas</b>				
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	5 de 9	ST,P	A,P <sub>s</sub> ,CO <sub>2</sub>	VFA,V,N,NH <sub>3</sub> , BIOTINA,PAB
<i>Ruminococcus albus</i>	3 de 5		A, H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub>	VFA,N,NH <sub>3</sub> , BIOTINA,PAB
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	3 de 5		A, P <sub>s</sub> , H <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub>	VFA,N,NH <sub>3</sub> , BIOTINA,PAB
<b>Amilolíticas y Destrinolíticas</b>				
<i>Bacteroides amylophilus</i>	1 de 10	P, SR		NH <sub>3</sub>
<i>Sreptococcus bovis</i>	0 de 20	SS, PR	A,L,CO <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> )	AA,
<i>Succinimonas amylolytica</i>	1 de 3		A,P <sub>s</sub> ,CO <sub>2</sub>	BIOTINA
<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>	1 de 13	P	A,P <sub>s</sub> ,L,CO <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> )	BFA AA
<b>Sacarolíticas</b>				
<i>Bacteriodes ruminicola</i>	10 de 19	ST, P, PR	A,P,CO <sub>2</sub> , (H <sub>2</sub> )	VFA
<i>Butyrivibrio fribrisolvens</i>	8 de 12	C, ST, PR	A,B,L,CO <sub>2</sub> , (H <sub>2</sub> )	VFA,NH <sub>3</sub> ,AA, BIOTINA,ACIDO FOLICO, PIRIDOXAL
<i>Megasphaera elsdenii</i>	0 de 1	L, PR	A,P,B,V,H,CO <sub>2</sub>	AA
<i>Selenomonas ruminantium</i>	4 dew 12	ST, L	A, P, L, H, CO <sub>2</sub>	VFA,MET
<b>Utilización de Hidrógeno</b>				
<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>	< 1		CH <sub>2</sub>	VFA,NH <sub>3</sub>
<i>Vibrio succinogenes</i>	0		P, NH <sub>3</sub>	NH <sub>3</sub>
<b>Protozoos</b>				
<i>Isotrichia, Epidinium, Diplodinium sp.</i>		ST, SS	A, B, L, H, CO <sub>2</sub>	BACTERIAS

Continúa...

Tabla 1. Continuación

<i>Dasytrichia</i> ,			
<i>Diplodinium sp.</i>		ST, SS	A, B, L, H, CO <sub>2</sub> BACTERIAS
<i>Entodinium sp.</i>			
La suma	40 de 75	ST	A, P, B, L, CO <sub>2</sub> BACTERIAS (H <sub>2</sub> )

<sup>a</sup> C holocelulosa, ST almidón, SS azúcar soluble, P peptina, PR proteína, L lactato

<sup>b</sup> A Acetato, P Propionato, B Butirato, V Valerato, L Lactato, P<sub>s</sub> Organismos que hidrogenan el succinato en propionato y CO<sub>2</sub>

<sup>c</sup> VFA Acidos Grasos Volátiles, V Valerato, AA amino ácidos, MET Metionina; PAB, Para Amino Benzoico

Fuente: Baldwin RL, MJ Allison.1983.

La clasificación con base al ADN permite una mayor exactitud en la identificación de cada género y especie. La secuencia natural de contenidos de Guanina – Citosina a nivel de las poblaciones bacterianas está en un rango de 25-70%; en el medio ambiente mesófilo del rumen la proporción de las bases Guanina – Citosina es de 30 - 54%. Las clasificaciones bacterianas por su morfología y características físico - químicas no permiten identificar exactamente las bacterias (30). En los últimos años la comparación de la fracción 16S del rRNA ha permitido, con mayor exactitud, caracterizar las cepas (4,22,43). Koretsugo, *et al.* (2001) comparó el DNA, Guanina+Citosina, del *F. succinogenes* con el de la *Prevotella ruminicola*, observando un gran polimorfismo genético en estas dos bacterias ruminales (21).

Yokoyama (1993) clasifica las bacterias del rumen según su morfología, el sustrato que fermentan o los productos que genere esta fermentación. Por la morfología, se sigue el criterio clásico de los tres grupos: cocos, bacilos y espirilos, además de otras características citoplasmáticas específicas, como la adherencia superficial y los apéndices; el tamaño oscila entre 0.3 y 50 mm. La dosificación por el sustrato que fermentan o los productos finales en el rumen, propuesta por el mismo autor, es la más práctica para comprender la degradación de los alimentos ingeridos por el rumiante y para dilucidar las rutas metabólicas.

Yokoyama (1993) reconoce por lo menos diez grupos de bacterias con base en la utilización de celulosa, hemicelulosa, almidones, azúcares, ácidos grasos intermedios, proteínas, lípidos, producción de metano, utilización de péptidos y producción de amonio. En este tipo de clasificación se presenta una superposición entre varias especies de bacterias porque la mayoría son capaces de fermentar varios sustratos (45). A continuación se describen las principales bacterias de cada grupo.



Las principales especies celulolíticas son: *Fibrobacter succinogenes* anteriormente *Bacteroides succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Ruminococcus albus*. Este grupo es el que ocupa un nicho más específico dentro del rumen (4). Hay otras bacterias consideradas como celulolíticas secundarias por aprovechar los productos de la fermentación de sustratos fibrosos: *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Clostridium cellulosolvens*, *Clostridium locheadii* (45). La población de bacterias celulolíticas incrementan la digestibilidad de la fracción fibrosa de la dieta. En la presente revisión se profundizará sobre las bacterias celulolíticas, dada la importancia en la transformación de alimentos de baja calidad (como son los ricos en celulosa que es el carbohidrato más abundantes en la naturaleza) en proteína de alta calidad.

Los principales géneros con actividad proteolítica son *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Bacteroides rumenicola* y *Lachnospira mutiparus*. Otras bacterias peptinolíticas son: *Succinivibrio destrinosolvens*, *Treponema spp.* y *Streptococcus bovis* (45). El *Butyrivibrio fibrisolvens* posee la exopectato liasa, una enzima extracelular que divide la cadena de los péptidos en la parte final y hay otras bacterias que producen peptato liasas que rompen la cadena al azar (45).

Al grupo de bacterias con capacidad amilolíticas pertenecen *Streptococcus bovis*, *Bacteroides amylophilus*, *Succinimonas amylolytica* y *Bacteroides rumenicola*. Las bacterias amilolíticas proliferan cuando hay dietas ricas en almidones, aunque el *Bacteroides rumenicola* prevalece cuando las dietas son pobres en ellos. La enzima predominante es la alfa amilasa, enzima extracelular que parte la cadena al azar. La producción de esta enzima depende del crecimiento de estas bacterias y de un pH entre 6.0 y 6.8 (45). El *Fibrobacter succinogenes*, celulolíticas por excelencia, fermenta levemente el almidón. La fermentación de la dextrina es específica para el *Succinivibrio destrinosolvens* (17).

Los azúcares simples son hidrolizados por todas las bacterias que degradan carbohidratos, esto por la gran cantidad de azúcares que hay en la dieta (4). El *Ruminococcus flavefaciens* no fermenta la glucosa pero si fermenta la celobiosa en forma eficiente. Los *Lactobacillus spp.* como el *Lactobacillus vitulinus* y el *Lactobacillus ruminus* fermenta glucosa en el rumen. Estas especies bacterianas aparecen en gran número cuando se consumen dietas ricas en cereales o cuando las plantas tiene altos contenidos de azúcares (45). El *Fibrobacter succinogenes* fermenta la glucosa produciendo ácido láctico (17).

Las bacterias productoras de ácidos grasos volátiles intermedios producen lactato, succinato y acetato (45). El lactato puede ser fermentado a ácido acético o ácido

propiónico por bacterias como la *Megasphaera elsdenii* y *Selenomona ruminantium*. La producción de ácido láctico se debe a una ingesta alta de carbohidratos no estructurales (41). El succinato es convertido en propionato + CO<sub>2</sub> por la *Selenomona ruminantium*, *Veillonella alcalescens*, *Anaerovibrio lipolytica*, *Propionibacteria spp.* El acetato es convertido en metano por *Methanobrevibacter ruminantium* (45).

Los lípidos son metabolizados activamente en el rumen. *Anaerovibrio lipolytica* hidroliza triglicéridos y fosfolípidos para generar de glicerol y/o ácidos grasos. Los galactolípidos, fosfolípidos y sulfolípidos de los forrajes son hidrolizados por el *Butyrivibrio fibrisolvens* (45).

Las principales bacterias metanogénicas en el rumen son: *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobacterium formicicum* y *Methanomicrobium mobile*. El metano se produce al reducir el dióxido de carbono por las bacteria metanogénicas y la adición de H<sub>2</sub>. Los principales donadores de H<sub>2</sub> son el formato y el succinato. El metano ocupa el 30-40% del gas en el rumen (35) esto favorece la producción de hidrogeniones. El *Ruminococcus sp.* es un gran productor de hidrogeniones y el *Methanobacterium sp.* los utiliza (41). Los microorganismos que fermentan el ácido láctico requieren de cuatro días de retención del sustrato para sobrevivir y los resultados de esta fermentación son Ácidos Grasos Volátiles (AGV); por otra parte no se acumula metanol, porque es degradado en metano y CO<sub>2</sub> (41).

Los péptidos son fermentados activamente por otro grupo de bacterias, principalmente *Bacteroides amylophilus*, *Bacteroides ruminicola*, *Butyrivibrio fibrisolvens* y *Streptococcus bovis*, que abundan en el rumen; en animales alimentados solo con tamo de trigo son escasas porque para su crecimiento requieren de proteína soluble, aa, péptidos o amonio (NH<sub>3</sub>) (23). Se ha encontrado que hasta el 38% de las bacterias ruminales son proteolíticas (45). Para el efecto existen por lo menos tres proteasas microbianas: Cistina-proteasa, Serina-proteasa y Metallo-proteasa (5).

Las productoras de amoníaco son: *Provatella ruminicola*, *Bacteroides ruminicola*, *Megasphaera elsdenii*, *Selenomona ruminantium* y *Butyrivibrio sp.* Estas obtienen el amoníaco de la hidrólisis de la urea. Las bacterias urolíticas representan el 5% de la población total del rumen (45). La *Provatella ruminicola* es la mayor productora de amonio en el rumen (8). Los niveles máximos de amoníaco en el rumen, se alcanzan a las dos horas posingesta, coincidiendo con el máximo crecimiento de las bacterias proteolíticas (17). Las proteínas bacterianas se sintetizan por la degradación total o parcial de proteínas brutas, aa, péptidos o NH<sub>3</sub>, de la dieta (9).



## Crecimiento bacteriano

El aumento del número de bacterias en el rumen, está determinado por la disponibilidad de ATP para llenar los requerimientos energéticos para la multiplicación bacteriana y proporciona al hospedador (rumiante) un incremento en la degradación de los sustratos ingeridos; así se genera gran cantidad de proteína microbiana para la nutrición del rumiante. El ATP es la unidad de medida de energía de los microorganismos ruminales. El ATP en los microorganismos se divide en: el de mantenimiento ( $M_{ATP}$ ) y de producción ( $Y_{ATP}$ ). El  $M_{ATP}$  es el ATP que se requiere para el crecimiento, la osmoregulación, la molaridad, los recambios de los componentes de la dieta, la producción de proteína extracelular (enzimas) y el transporte activo. El  $Y_{ATP}$  se define como el peso en gramos de células secas que se produce por mol de ATP (4,31,36,38). El 40 -60% de la materia seca de las bacterias son proteína y para el crecimiento bacteriano se requiere una gran cantidad de  $Y_{ATP}$  (11).

El  $Y_{ATP}$  disponible se evalúa normalmente sobre la vía fermentativa (12,36). En condiciones aeróbicas, una mol de carbohidratos fermentable produce 36 moles de ATP. En medio anaeróbico se generan cuatro moles de ATP, al convertir la glucosa en AGV por medio de la fermentación de los microorganismos ruminales (36). De acuerdo con los modelos matemáticos, se necesitan 3.62 moles de  $Y_{ATP}$  para producir 100g de materia seca microbiana; 28g pueden ser generados por una mol de  $Y_{ATP}$  (11). Por cada 10-12g de pared celular seca se genera un mol de  $Y_{ATP}$  (11), Baldwin, *et al.* (1983) indicaron que se necesita de 25-34g de materia seca para la producción de una mol de  $Y_{ATP}$  (4). En la fermentación ruminal, una mol de carbohidratos puede producir dos moles de ácido acético o dos moles de piruvato o una mol de butirato. Dos moles de  $Y_{ATP}$  producen una mol de acetato o tres de butirato o tres de propionato y una mol de  $Y_{ATP}$  produce una mol del metano (36). Con bajo pH, el etanol es precursor del ácido láctico generando dos  $Y_{ATP}$  para el crecimiento bacteriano. La generación de este  $Y_{ATP}$  va a depender de la fuente de energía del sustrato (41).

Hungate, citado por Laredo, *et al.* (1996) calculó que la fermentación ruminal puede producir 10g de proteína microbiana por cada 100 g. de carbohidratos fermentados (23). La eficiencia de producción de proteína cruda está entre 12-16 g por cada 100g de TDN (Nutrientes Total Digeribles). Carulla, *et al.* (1999) cita a Satter y Slyter quienes concluyen que los niveles óptimos para el crecimiento microbiano *in vitro* son de 50 mg  $NH_3/l$  (9), Leng (1989) plantea que para dietas altas en fibra y bajas en proteína, los niveles de amoníaco ruminal deben de ser 200mg/l (36) para alcanzar un máximo crecimiento microbiano.

Cuando se dan dietas con sincronía entre las proteínas y las fuentes de carbohidratos, comparándolas con dietas asincrónicas, la producción de proteína cruda microbiana se incrementa en un 11-20% (30). Cuando los niveles de amoníaco son bajos, se necesita más  $Y_{ATP}$  para la incorporación de los aa a las proteínas, pero si el amoníaco suministrado en la dieta es alto, éste se incorpora sin necesidad de  $Y_{ATP}$ . La tasa de máxima incorporación de amoníaco va de 5 - 8 mg  $NH_3$  /100 ml (14). Chaudry (1998) reporta que a niveles de 15 - 20 mg  $NH_3$  /100ml se dan las mayores tasas de incorporación de amoníaco (11). Baldwin, *et al.* (1983) afirman que la incorporación de aa por parte de las bacterias ruminales es más del 20% del total de la proteína bacteriana (4). El flujo de proteína cruda microbiana varía de 1.64 a 1.34 Kg/día, con un intermedio de 1.46 -1.48 Kg/día dependiendo de la fuente de alimento ingerido por el animal (30).

En el reciclaje de nitrógeno las bacterias y los protozoos juegan un papel importante asegurando la continuidad en el crecimiento bacteriano cuando las dietas son bajas en este alimento. Wells, *et al.* (1996) reportan un estudio utilizando nitrógeno marcado ( $^{15}N$ ) donde recuperan el marcador en el intestino delgado en más del 50%; se concluye que el resto es reciclado en el rumen. El *F. succinogenes* se lisa en su fase de crecimiento y esta lisis es independiente de la tasa de crecimiento (44).

## Bacterias celulolíticas

El conocimiento de las principales características de crecimiento de las bacterias celulolíticas ruminales proporciona elementos para mejorar o mantener sus condiciones ambientales constantes y así lograr un mejor aprovechamiento del alimento ingerido por el animal. Cada especie bacteriana posee características diferentes en la utilización de nutrientes dependiendo del tipo de ración a fermentar; esto afecta la tasa de digestión de la celulosa y por ende la producción del animal (ver Tabla2) (42,43). Las principales bacterias celulolíticas degradadoras de fibra en el rumen son: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Ruminococcus albus*. La principal característica de estas bacterias es la especialización en el uso de la celulosa como fuente de los carbohidratos para su crecimiento (11,16-20,43-45). Estas especies pueden hidrolizar la celulosa o utilizar los productos de esta hidrólisis (celulodextrina) que podrán ser utilizados por otros microorganismos ruminales como protozoos, bacterias proteolíticas, bacterias utilizadoras de la celulodextrina o bacterias celulolíticas oportunistas (11). Weimer, *et al.* (1999) reportaron que las bacterias celulolíticas a las tres horas post-ingesta, en dietas a base de alfalfa o forraje de maíz, predominan en un 0.3 - 3.9 % con relación a otras bacterias; la especie más abundante fue el *R.*



*albus*. Las poblaciones de bacterias celulolíticas son relativamente pequeñas pero son fundamentales en la proporción de los AGV; los principales son: Acético (Ac), Propiónico (Pr) y Butírico (Bu), los cuales son utilizados por el animal como fuente de energía y carbono. Las concentraciones y relaciones Ac: Pr: Bu varían con de la dieta; por ejemplo, 78:16:5 en una dieta celulolítica y 66:24:10 en una dieta con abundante almidón o azúcares solubles (33, 43).

El conocimiento de los requerimientos de nitrógeno, por parte de las bacterias celulolíticas es importante para optimizar su producción. El amoníaco es principalmente usado por las bacterias que degradan carbohidratos complejos; las bacterias que degradan azúcares sencillos requieren más proteína preformada (45). La habilidad de las bacterias para la incorporación de nitrógeno o de aa está influenciada por los niveles de energía de la misma (30). El amonio es la principal fuente para la síntesis de proteína en el rumen, equivalente a un 50 a 70% de la proteína bacteriana (27) El crecimiento bacteriano es mayor cuando se incorporan péptidos y aa en la dieta (4).

Christell, *et al.* (1999) describen que la ruta de aprovechamiento del amoníaco, por parte del *F. succinogenes*, es por la ruta glutámico deshidrogenasa y alanino deshidrogenasa, que son activas en presencia de NAD y NADP como cofactores. La incorporación del amoníaco no se limitó cuando las concentraciones de amonio fueron bajas, incorporando glucosa a la célula y cambiando la fuente de ácidos grasos de acético a propiónico (27). Atasoglu, *et al.* (2001) describen que al incorporar 1g/l de péptidos la incorporación de amoníaco era en promedio de un 80% (3). Matheron (1999) encontró que los aa requeridos por *F. Succinogenes* eran: aspartato, glutamina, alanina y valina (27). De igual manera Atasoglu, *et al.* (2001) reportan que las bacterias proliferan mejor en presencia de determinados aa que en presencia de péptidos, y que la fenil alanina puede ser un factor limitante para el crecimiento del *F. Succinogenes* BL2 (3). Este factor limitante en una población estudiada debe poner en alerta a los nutricionistas de rumiantes para estudiar los requerimientos de amino ácidos en las dietas, como se realiza en monogástricos. La materia orgánica rica en celulosa, generalmente pobre en energía, necesita de la flora microbiana para su fermentación, y esta flora, a su vez, depende de la concentración del amoníaco en el rumen.

En la tabla 2 se muestran los carbohidratos fermentables por algunas bacterias celulolíticas y algunas no celulolíticas. Laredo, *et al.* (1996) en trabajos *in vivo*, en ovejas, adicionaron urea al 2% a una dieta de afrecho de maíz, con una proteína total de la ración del 14% y altos niveles de energía: la concentración de amoníaco se incrementó en forma lineal (23). Estos resultados llevaron a los inves-

Biogénesis

tigadores a concluir que la falta de energía altera la asimilación de amonio, por efecto sobre la multiplicación microbiana (30) y que el máximo crecimiento bacteriano se logra en las dietas cuando la base forrajera alcanza el 70% (23).

**Tabla 2. Utilización de carbohidratos por bacterias ruminales celulolíticas y no celulolíticas**

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

Abreviaturas: A: arabinosa, C: celobiosa, F: fructosa, G: glucosa, Ga: galactosa, L: lactosa, M: maltosa,

Mn: manosa, R: ramnosa, S: sacarosa y X: xilosa.

Tomado de : Weimer P. 1996.

En varios estudios Sniffer y Robinson (1987) citados por Febel, *et al.* (1996) mostraron que el crecimiento bacteriano en dietas con diferentes niveles de fibra es variable; pero, en todos los casos es ascendente, hasta llegar a niveles del 70%, más allá de los cuales el crecimiento se reduce (14). El NRC (1989) reporta que cuando la fibra está por debajo del 40% (20% de Fibra Detergente Neutra, FDN) hay decrecimiento de la población microbiana. Cuando la FDN está por debajo



del 20% de la materia seca total, se estima que el crecimiento bacteriano se reduce en un 2.5% por cada 1% de decrecimiento de la FDN (31). Weimer, *et al.* (1999) reportan que las poblaciones de *R. albus* fueron más altas que las del *R. flavefaciens* y *F. succinogenes* en dietas con alta FDN: sin embargo, el *R. albus* fue menor que los otros dos cuando las dietas tenían menos de 24% de FDN (43). Acorde con los resultados descritos por los autores anteriores la falta de FDN en niveles adecuados provoca una disminución en los movimientos ruminales y una baja en la rumia, lo que altera la producción de saliva (solución tampón del rumen)

Carulla, *et al.* (1999) cita a Mertens, quien afirma que en dietas a base en ensilaje de maíz las vacas lecheras consume cerca de 1.2 Kg de FDN por cada 100Kg de peso vivo. Otros autores plantean que ese consumo es de 1.4Kg (10). El crecimiento del *R. albus* mostró una correlación positiva con respecto a la producción de leche (43). La actividad bacteriana puede ser medida indirectamente por la tasa de pasaje y la tasa de degradación de los alimentos (35). Bochi, *et al.* (1999) determinaron que la digestibilidad *in vivo* de los forrajes con diferentes dietas, disminuía cuando las dietas eran altas en concentrado; la diferencia de las dietas solo fue estadísticamente significativa en algunos tratamientos (7). Ramanzin, citado por Barcena, *et al.* (1994) indica que al incrementar el consumo de materia seca se incrementa la digestibilidad de la materia orgánica y se disminuye la digestibilidad de la pared celular de la planta (5). El *Ruminococcus albus* fermenta principalmente a Acetato y a Lactato; al respecto. Paggi, *et al.* (2001) realizaron ensayos en los cuales se agregaron diferentes concentraciones de ácidos grasos de cadena corta, y encontraron que esta población bacteriana tenía un crecimiento bajo cuando la osmolaridad del medio cambiaba de 50 mM a 300 mM. Así concluyeron que algunos productos finales de la fermentación ruminal pueden alterar el desarrollo de *R. albus* (33).

El *R. albus* y el *R. flavefaciens* mostraron una correlación positiva a la producción de butiratos (43). Los *Ruminococcus sp.* incrementaron las concentraciones de butirato en el rumen, pero a estas especies no se les conoce como productoras de este AGV; Weimer, *et al.* (1999) sugieren que los *Ruminococcus sp.* incrementan la población de otras bacterias que sí son productoras del butirato (43).

## Degradación de la fibra

La degradación de celulosa esta dada por un complejo sistema de microorganismos que forman un ecosistema compartido por bacterias, hongos y protozoos, cada uno con un papel diferente, con primacia de las bacterias degradadoras de

celulosa y hemicelulosa (6). Dos son las etapas en que se llevan a cabo la digestión microbiana de los polisacáridos estructurales en el rumen: en primer lugar, la colonización y la adhesión de los microorganismos a la estructura vegetal (29,41); y, en segundo lugar, la acción enzimática sobre dichos sustratos, independiente de la utilización de los productos resultantes (29). La magnitud de estos procesos depende de la naturaleza de la pared celular vegetal, a las características de la población microbiana implicada en dichos procesos y de las condiciones del ambiente ruminal para favorecer o limitar estos procesos (16).

La adherencia bacteriana a la pared celular incrementa la tasa de digestión de los forrajes, y este factor prima sobre otros como la motilidad y la resistencia a medios ácidos (41). La tasa de digestibilidad de la celulosa se aumenta con el grado de contacto de las bacterias a la superficie celular. El tamaño de la partícula de forraje es importante en la adherencia de las bacterias al sustrato, a mayor fragmentación de la partícula alimenticia más superficie de contacto van a tener las bacterias para actuar. Los experimentos realizados por Flint (1997) sugieren que el primer orden de digestión está en función del sustrato y de la rapidez de colonización de las células bacterianas a la pared celular (15).

La adhesión íntima al sustrato permite una mayor eficiencia de la hidrólisis enzimática y una mayor disponibilidad de los productos en la digestión de la pared celular, además de proteger a las bacterias adheridas de la predación por parte de otros microorganismos ruminales y de aumentar el tiempo de retención bacteriana en el rumen. La importancia de la adhesión de las bacterias celulolíticas a la pared celular para la degradación de ésta se ha llegado a considerar como requisito indispensable en la celulolisis. Especies bacterianas sin capacidad adherente, o cepas no adherentes de las especies celulolíticas tienen una trascendencia mínima en la digestión de los polisacáridos de la pared celular. Las estructuras específicas implicadas en la adhesión bacteriana han sido revisadas por Pell y Schofield citados por Fondevila (1998) y también descritos por Weimer (1996) quien las resume en tres estructuras: glicocálix, celulosomas y sectores de enlace de enzimas celulolíticas (16,42). Los mecanismos de adhesión de *R. albus* a las células del sustrato, así como la secreción de celulasas, no están dilucidados (16). Pegden (1998) identificó dos moléculas de polipéptidos con requerimiento obligatorio de celulosa del *R. albus*  $\delta$ , el cual posee una estructura típica del Pili, (macroproteína que comprende cuatro tipos de proteínas fibrosas producidas por bacterias patógenas gramnegativas). La presencia de esta molécula sugiere que se trata de una nueva proteína celulosa obligada, que podría estar involucrada en la adhesión del *R. albus* al sustrato y puede extrapolarse esta distribución a la familia de bacterias grampositivas con proteínas del Pili (34)



El efecto de algunos factores ambientales sobre la adhesión de las principales bacterias celulolíticas para los cultivos *in vitro* de las tres especies en el rumen, las resume Pell, A. and P. Schofield (1993) citado por Fondevila (1998): la presencia de oxígeno no es tolerada por el *Ruminococcus spp.* pero si por el *F. succinogenes* hasta niveles del 20%. Cuando se someten a temperaturas extremas para su cultivo, las tres especies mueren a 4<sup>o</sup> C. La temperatura optima para su crecimiento es de 38<sup>o</sup> C mientras que el pH, en las diferentes especies, está en diferentes rangos: *R. albus* entre 5.5. y menor de 8.0, el *F. succinogenes* de 5.3 a 6.8 y el *R. flavefaciens* de 4.0 a 8.0. Para su crecimiento las tres especies requieren de la presencia de Calcio y el *F. succinogenes* y *R. flavefaciens* requieren adicionalmente Magnesio. Las tres especies requieren de la adición de Celobiosa, Amilopeptina, Metil celulosa; el *F. succinogenes*, no requiere de glucosa para crecer. Las proteasas inhiben el crecimiento de las tres especies (16).

Fondevila (1998) plantea que la capa de cutina que cubre la epidermis de los vegetales es prácticamente impermeable a la adhesión de los microorganismos, excepto para algunos hongos: por eso la colonización los tejidos fermentables a través de estomas o a partir de cortes o secciones libres de esa cutícula, que se obtienen en gran medida en la masticación. La pared celular de la planta contiene hasta 18 - 24 % de sílice lo que le confiere una mayor resistencia a la ruptura y a su digestión. Esta proporción puede aumentar bajo condiciones de alta temperatura, luz y aridez. La epidermis está débilmente adherida al mesófilo en las hojas de leguminosas y de muchas gramíneas C3 (gramíneas zona subtropical), pero firmemente fijada a los haces vasculares en las C4 (gramíneas zona tropical) por lo que se puede afectar el proceso de digestión. La epidermis libre de esta cutícula, es degradada en menos de 8 horas en el rumen. El xilema y el esclerénquima de las hojas de las gramíneas son una barrera a la colonización y a la acción de las enzimas microbianas, debido a su densidad. No obstante, el esclerénquima de las hojas, aunque lignificado, no es totalmente inalcanzable a la colonización microbiana, pues puede observarse cierta degradación en sus zonas periféricas. Las hifas de los hongos tienen capacidad para perforar los tejidos vegetales más lignificados, con lo que favorecen el acceso bacteriano a los tejidos internos. La proporción de xilema y esclerénquima es similar en gramíneas C3 y C4; sin embargo, una mayor proporción de epidermis y vainas de paquetes parenquimatosos en las C4 (en mayor proporción en condiciones adversas de crecimiento), suponen una barrera adicional al ataque microbiano. La estructura radial y compacta del mesófilo en las hojas de gramíneas tropicales retrasan la degradación. No existen diferencias específicas entre las hojas de leguminosas de origen tropical o templado; aunque son, en general, muy



digestibles, los taninos presentes en algunas especies puede retrasar la digestión del mesófilo de la hoja. Los tallos, tanto de leguminosas como de gramíneas C3 y C4, presentan una estructura rígida, donde la epidermis, el esclerénquima y el tejido vascular están muy lignificados y son prácticamente indigeribles. El parénquima se lignifica con la madurez de la planta disminuyendo su digestibilidad. Las diferencias en las proporciones de tejidos entre las distintas gramíneas no son significantivas en el caso de los tallos pues son las condiciones de cultivo las que determinan diferencias en su digestibilidad. No parece que el parénquima de los tallos de leguminosas se lignifique conforme avanza la madurez de la planta, lo que garantiza una mayor degradación de los tallos de especies leguminosas respecto a los de gramíneas (16).

Las enzimas implicadas en los diversos procesos de degradación de celulosa y hemicelulosa de la pared celular vegetal, están distribuidas entre las especies celulolíticas de microorganismos ruminales. Como ejemplo, *F. succinogenes*, uno de los organismos más estudiados, produce al menos 8 glucanasas diferentes, una celodextrinasa, una celobiosidasa y una celobiasa, además de una endoxilanasas, una glucuronidasa, varias estererasas y una arabinofuranosidasa (12-16).

Las enzimas de *F. succinogenes* son muy activas frente a celulosa cristalina, pero esta acción es mínima en extractos libres de celulosa, contrario a las celulasas de *R. flavefaciens*, mantienen su actividad en ausencia de las bacterias productoras de estas enzimas (16). Se ha observado que algunos de los complejos enzimáticos que los microorganismos celulolíticos ruminales poseen, además de su acción catalítica, son responsables de la actividad hidrolítica; una parte responsable de la adhesión de la enzima al sustrato, que aumenta por ello la eficiencia enzimática. Considerando la localización superficial de las enzimas celulolíticas en las bacterias ruminales, estos sectores de enlace de las enzimas (*cellulose binding domains*) contribuyen también la adhesión microbiana al sustrato. De hecho, es el tipo de enlace sobre el que actúan lo que determina su especificidad, pudiendo atacar un mismo tipo de enzima tanto las cadenas de celulosa como las de xilano. Por otra parte, es curioso que cada microorganismo, en lugar de una sola, produce varias enzimas que actúan de forma muy similar. Las tres especies celulolíticas principales tienen depolimerasas con capacidad de romper las cadenas de hemicelulosa y en menor medida, la pectina de los forrajes. Dada la especificidad de las glucanasas por el tipo de enlace, el *F. Succinogenes* no es capaz de utilizar los productos de esta hidrólisis y el *R. flavefaciens* los utiliza poco (16).



## El pH como regulador de la actividad de las bacterias celulolíticas

El pH es determinante en los procesos microbiológicos del rumen, particularmente en la digestión de la fibra (43). La degradación de los carbohidratos modifica los valores del pH en el licor ruminal, afectando las poblaciones microbianas. El crecimiento de las bacterias celulolíticas es máximo cuando el pH está cerca de la neutralidad (14,29,41,42). Los rumiantes dependen de las bacterias celulolíticas, pero éstas no resisten el pH bajo que se pueden dar después de ingerir gran cantidad de alimentos concentrados (14,42). La rata de degradación de la celulosa en concentraciones bajas 12.5 g/l, en cultivos *in vitro*, decrece cuando el pH descende de 6.86 a 6.02 (29). Galindo, *et al.* (1993) reportan que las dietas suplementadas con proteína y carbohidratos solubles, presentaron pH más bajo 6.4, en comparación con el control 6.8 (1). En animales sometidos a dietas forrajeras, con mezclas de gramíneas y leguminosas, la dinámica de la fermentación ruminal fue optima con un pH de 6,7 y no presentó variación entre diferentes dietas; este pH garantiza una adecuada actividad ruminal (1). Al rededor de 6.7 se alcanzan los mayores rendimientos en el crecimiento bacteriano, degradando almidones, azúcares, péptidos, hemicelulosa y celulosa (14-42). Es de interés común lograr estabilizar el pH ruminal posingesta y poder utilizar el ácido láctico por parte de las bacterias, para bajar los costos de pérdida de energía. El pH ruminal es más alto cuando los animales se encuentran en ayuno, debido a que los procesos fermentativos están en franco decrecimiento en el rumen (17).

Barcena, *et al.* (1994) citan a Mertens, quien plantea que a un pH por debajo de 6.2 se inhibe el crecimiento de hongos y bacterias celulolíticas (5). Van Soest (1994) plantea que un pH menor de 6.0 inhibe la degradación de la celulosa (41). Los microorganismos pueden sobrevivir por largos periodos de tiempo a pH ácido (17) disminuyendo su actividad celulolítica. La adaptación de las bacterias ruminales a nuevos sustratos se da en dos semanas (11), otros autores señalan que ésta ocurre entre cuatro y seis semanas (29); la importancia de esto radica en que los cambios muy marcados en el ambiente ruminal disminuyen la digestibilidad de la fibra.

Russell, *et al.* (1996) exponen que no hay actividad de las especies celulolíticas en pH inferiores a 6.1 (35). Barcena, *et al.* (1994) dicen que la digestibilidad de los forrajes se ve fuertemente deprimida cuando el pH está entre 6.3-6.0 y sufren una drástica disminución cuando cae por debajo de 6.0 (5). Russell y Wilson citados por Mouriño, *et al.* (2001) evidenciaron que las bacterias celulolíticas (*F. succinogenes*) no crecían en cultivos *in vitro* de celulosa y celobiosa cuando el pH

era menor de 6.0. (29). Hutjens (1996) realizó varias mediciones de pH, por el método de la ruminocentesis en dos grupos de vacas: Normales, las que tenían un pH igual o mayor a 5.9 y anormales las de pH de 5.5 o menos (19). Bochi, *et al.* (1999) reportan que en dietas con proporciones de 60 o 80 % de concentrado en la ración total, los niveles del pH descenden por debajo de 6.0 (5). La actividad celulolítica continua a pH menor de 6.0 en forma reducida y el *R. flavefaciens* produce primero acetato y luego succinato, mientras que el *F. Succinogenes* va a producir propionato (43). La proporción de acetato-propionato en un rumen normal es de 2.2 – 2.4; cuando el pH está entre 5.9- 6.2 la proporción es 2.48 - 2.46, respectivamente (19). En animales suplementados con maíz el pH desciende rápidamente y esto ocurre a medida que se incrementan los niveles del grano, sugiriendo que hay decrecimiento del número de bacterias celulolíticas (42). Weimer, *et al.* (1999) compararon dietas de maíz con dietas de heno de alfalfa y encontraron que la dieta de alfalfa, con un mayor contenido de materia seca, producía menos fluctuaciones en el pH en las 12 horas siguientes a la alimentación (0.3 vs 0.8) (43). En trabajos realizados por Mouriño, *et al.* (2001) se demostró que la actividad celulolítica empezaba cuando el pH estaba por encima de 6.0. (29)

El pH ruminal varía principalmente con la dieta (tipo de alimentos ingeridos) y la frecuencia de la ingesta. La tasa de fermentación de la celulosa decrece a medida que se incrementa la FDN. Este parece ser un indicador indirecto del pH ruminal: a menor FDN menor pH (30). Varios autores, citados Mouriño, *et al.* (2001) señalan que raciones altas en concentrados disminuyen en el pH y esto baja la digestibilidad de los forrajes (29). El trabajo realizado por Bochi, *et al.* (1999) midiendo los niveles de diferentes dietas de concentrado 20, 40, 60, 80 % sobre la digestibilidad de la fibra, encontró que cuando la dieta tenía el 80% de concentrado, el pH caía por más largo tiempo (22.8h) que cuando las dietas tenían los otros niveles (7). Orskov (1.983) citado por Barcena, *et al.* (1994), reporta que el pH ruminal de animales que recibieron dietas ricas en concentrado disminuye y cuando este vuelve a sus valores normales, las bacterias celulolíticas no logran recuperar el crecimiento óptimo (5). Estos resultados sugieren que los animales con esta dieta tuvieron una reducción de la flora celulolítica del rumen (5). El pH ruminal cae cuando hay más carbohidratos solubles en el rumen produciendo efectos negativos en la degradación de la fibra. Dietas con TMR (ración total de nutrientes) estabilizan el pH ruminal, por acostumbriamiento de la flora ruminal a una dieta con las mismas materias primas (19). Los cambios constantes y bruscos de materias primas para la elaboración de suplementos alimenticios en nuestro medio, mantienen el rumen en continuo cambio con lo cual se reduce la degradación de la fibra.



Hay cambios en los niveles ruminales de acetato cuando el pH está entre 5.6 y 6.2 los niveles de propionato cuando está en 6.2 a 6.8 (37). A un pH entre 5.5-6.5 comparado con pH 6.7 la producción de  $Y_{ATP}$  fue menor en un 50% lo que baja la eficiencia en la producción de proteína microbiana (14). A un pH ruminal bajo, se incrementa el propionato, y el acetato y el butirato disminuyen. Weimer (1996) en trabajos realizados midiendo el pH, reporta que cuando éste estaba por debajo de 5.9 el *Ruminococcus sp.* y el *F. succinogenes* no creció en colonias puras. La adhesión a la pared celular por parte del *R. albus* no se da a pH 5.5. Los procesos fermentativos bajan al descender el pH, y esto es debido a la poca adhesión de las bacterias a la pared celular (42). La relación del crecimiento bacteriano con la degradación del sustrato, es en forma lineal cuando el pH desciende y disminuye el poder de adhesión (29). Mouriño *et al.* (2001) reporta que hay mínima actividad fermentativa por parte de las bacterias celulolíticas cuando el pH está entre 5.1 – 5.3 y esta actividad se incrementó cuando los cultivos tenían también bacterias no celulolíticas (29). Otras bacterias celulolíticas secundarias pueden resistir pH bajo; Weimer (1996) reporta que el *Butyrivibrio fibrisolvens* es más resistente a bajo pH, pero no creció a pH por debajo de 5.7 (42). Muchas bacterias prefieren un pH cerca de la neutralidad para su crecimiento, aunque especies como el *Streptococcus bovis* y *Prevotella ruminicola* pueden crecer en un rango de pH de 5.0-6.0 (42).

Cuando las concentraciones de celulosa fueron altas (50g/L), la degradación del sustrato fue del 30% antes de llegar al pH 5.3. En este estudio la digestión produjo pérdidas de Nitrógeno y Fósforo, lo que sugiere que las células bacterianas a pH bajo se desprenden del sustrato (29). El tamaño de la partícula de pasto (fibra efectiva) es fundamental para la inducción de la rumia y esta para la producción de saliva que es la solución tampón del rumen (19).

### **Estrategias para mejorar la utilización de la fibra por poblaciones bacterianas**

El conocimiento de las poblaciones microbianas del rumen ha llevado por muchos años, a nutricionistas y microbiólogos, a buscar la manipulación de este ecosistema para incrementar la eficiencia en la fermentación microbiana de sustratos en animales poligástricos. Baldwin, *et al.* (1983) plantea que el hombre por medio de la manipulación genética introducirá nuevos microorganismos capaces de vivir en el rumen (4). Para mejorar la degradación de los alimentos por los procesos fermentativos del rumen se requiere aumentar el crecimiento de los microorganismos, disminuir el tamaño de la partícula de los alimentos, mantener

niveles de energía constantes y proteína y/o amoníaco disponible para las bacterias ruminales, minimizar los cambios en el pH, incrementar la tasa de pasaje y acelerar la tasa de retención. Los azúcares, almidones y péptidos de los pastos son fermentados rápidamente por bacterias cuyos productos de degradación modifican el pH ruminal siendo este uno de los principales limitantes en la degradación de la celulosa y la hemicelulosa, al inhibir el crecimiento de las poblaciones microbianas específicas, lo que retrasa la fermentación de la fibra y la tasa de pasaje; y esto ocasiona una sensación de saciedad por efecto mecánico en el animal, limitando el consumo de más alimento y bajando la producción. Mantener las poblaciones microbiológicas estables por diferentes medios contribuye a incrementar el aprovechamiento de los alimentos ingeridos optimizando la producción animal (29).

Para mejorar la eficiencia en la utilización de la celulosa se han propuesto dos estrategias, la primera es mejorar las condiciones de las bacterias celulolíticas existentes: incrementando la adherencia a la pared celular y la actividad enzimática, mejorando la resistencia de los microorganismos al bajo pH ruminal y la motilidad de estas bacterias para permitir una colonización más rápida y una penetración al interior de la pared celular del pasto. Una segunda estrategia es introducir la función celulolítica a otras bacterias ruminales (41). El trabajo interdisciplinario de biólogos y nutricionistas puede conducir, mediante biotecnología de ADN recombinante, al desarrollo de herramientas para mejorar la digestión de la fibra (40). Takafumi, *et al.* (2001) reportan que se han identificado 10 genes para la digestión de la fibra en el *F. succinogenes* S85, aunque hasta ahora, estos genes son inestables en *E. coli* (40).

Otra manera de mejorar las condiciones del medio para la degradación de la celulosa es el uso de hongos ruminales que tengan alta afinidad por la celulosa, poniendo en contacto las enzimas con la superficie de la célula. Un complejo multienzimático parecido al que desarrolla la bacteria anaeróbica, no ruminal, *C. thermocellum* sería de gran utilidad. Sobre la superficie celular se liga este complejo multienzimático, de 18-20 proteínas, que van a facilitar la degradación de la microfibrilla de la celulosa. Esta fuerte adherencia favorece el contacto enzimático con la superficie celular; sin embargo, trae la desventaja de no permitir que otros microorganismos actúen sobre la partícula de alimento perdiéndose la producción de proteasas (abundantes en el rumen) por no tener un contacto con la célula vegetal (42).

Con la adición de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* a cultivos *in vitro*, utilizando diferentes sustratos para la fermentación de bacterias ruminales, se en-



contró que la digestión de la materia seca y la FDN se incrementaba en los cultivos mixtos bacterianos (39). En cultivos puros, en medios con celobiosa, se incrementó el crecimiento del *F. succinogenes* y del *R. albus*. Estos estudios muestran que se incrementa el número de bacterias y por tanto la digestión de la fibra (12). La tasa de digestión de la celulosa se incrementa, en las primeras 24 horas, un 11% y no cambia a las 48-72 horas posteriores. Posiblemente esto se deba a que se acelera la tasa de latencia para empezar la digestión (39). La adición de este género de levaduras estabiliza el pH ruminal permitiendo una población estable, lo que se ve reflejado en incremento en la producción del animal.

La digestibilidad de la celulosa se incrementa cuando los hongos son cultivados con bacterias metanogénicas o utilizadoras de lactato; en contraste la celulolisis se inhibe en cultivos puros con *Ruminococcus albus* y *Ruminococcus flavefaciens*. En estudios realizados por Stewart, citado por Chaudhry (1998) se encontró que estas bacterias producían proteínas extracelulares termolábiles inhibitorias de la habilidad celulolítica del hongo *Neocallimastex frontalis*. No se ha observado inhibición cuando se ha cultivado con el *F. succinogenes* (11). Dheority y Tirabasso, citados por Chaudhry (1998) encontraron que las bacterias del rumen producen compuestos termoestables que inhiben el crecimiento de los hongos en el rumen; éstos mismos autores demostraron que también hay factores de crecimiento en el licor ruminal; Chaudry plantea que es probable que exista un equilibrio entre los factores que inhiben y los que estimulan el crecimiento de hongos y que ese equilibrio esté influenciando el tamaño de las poblaciones o su actividad enzimática (11). En este caso se resalta la importancia de las interacciones microbianas del rumen y su influencia en el crecimiento de las diferentes poblaciones.

Desde 1960 se han adicionado enzimas preformadas como suplemento en las dietas para rumiantes. Scott cita a Burrough (1992) quien pudo incrementar la ganancia de peso en un 7% en novillos en confinamiento adicionando enzimas (38). Otros investigadores citados por Scoot y Nisbet (1992) no encontraron ganancias de peso ni aumento en la digestibilidad con adición de enzimas a la dieta (38). El 12% de la energía consumida por el animal se gasta en la producción de metano, esto ha encaminando los investigadores a tratar reducir esta pérdida de energía con la adición de sustancias que inhiban las bacterias metanógenas, con productos como los ionóforos.

Galindo, *et al.* (1993) reportan experimentos realizados con cuatro toros de la raza Holstein, en los cuales se utilizó como alimento el bagazo de la caña en comparación con el bagazo de caña más suplemento energético-proteico. Este autor observó un aumento en las poblaciones de bacterias celulolíticas, amilolíticas

y proteolíticas, sin alteración de la microfauna ruminal. El patrón de fermentación fue de tipo acético y las variaciones que se observan en la fracción molar de los ácidos grasos volátiles (AGV), son consecuencias directas de una mayor degradación de celulosa en el rumen. El incremento de las bacterias celulolíticas fue importante, aumentando la digestión de la fracción fibrosa que alcanzó su máxima a las cuatro horas después de iniciado el consumo de alimento (17).

Otra alternativa para mejorar la utilización de celulosa es implementar un régimen de frecuencia en la raciones de suplemento ofrecidas al animal; con esto se logra un suministro constante de nutrientes que van a ser utilizados por las bacterias en forma eficiente. En el trabajo realizado por Laredo, *et al.* (1996) en ovejas alimentadas con diferentes frecuencias: una, seis o veinticuatro veces al día, se encontraron diferencias altamente significativas en las concentraciones de hongos cuando se les suministró alimento seis veces por día y se comparó con las otras dos frecuencias de alimentación diarias. No se observó correlación entre la digestión de la celulosa y el número de hongos *versus* la frecuencia de alimentación. Cuando se adicionan factores de crecimiento se encontró un incremento en la digestibilidad de la celulosa, siendo significativamente más alto cuando se dieron seis raciones, comprando con una ración (23). La frecuencia de alimentación aumentó la tasa de recambio del rumen (14-23-38-41).

La lignificación en las plantas es uno de los factores que más afecta la degradación microbiana de los forrajes, tanto por su baja digestibilidad como por su relación íntima con las cadenas de hemicelulosa. El bajo poder higroscópico de la lignina acentúa el proceso de deshidratación de la pared celular a medida que aumenta la edad de la planta, lo que disminuye la accesibilidad a los polisacáridos estructurales por parte de los microorganismos. Además, una considerable proporción de las unidades de arabinosa de las cadenas laterales de xilanos está esterificada con ácidos p-cumárico y ferúlico (en paja de cebada, 2,9 y 6,7% respectivamente) que establecen enlaces con las cadenas de lignina. Aunque estos compuestos fenólicos, especialmente el ácido p-cumárico, son tóxicos para la población microbiana ruminal, su concentración en el contenido del rumen es probablemente insuficiente para generar este efecto. El suministro de forrajes tiernos, cuando la lignina y los xilanos no se han consolidado en la pared celular, favorece la fermentación y aprovechamiento de los carbohidratos de la planta. No obstante, la solubilización a partir de las paredes celulares pudiera provocar, en las zonas de activa degradación, una concentración de fenoles próxima a los niveles tóxicos, por lo que pueden inhibir, o al menos reducir, la actividad fibrolítica bacteriana (16). Botero (1998) reporta en su revisión bibliográfica que los géneros de bacterias *Synergistes ruminicola* degradan las toxinas de las



mimosáceas, y el *Butyrivibrio jonesii* degrada el fluoroacetato de las pasturas del norte de Australia, detoxificando también los compuestos tóxicos de pasturas Centroamericanas y Africanas (8). Esta observación nos permite sugerir que hay un acostumbamiento del animal a dietas donde la base forrajera contenga plantas con niveles altos de tóxicos, ya que los microorganismos del rumen pueden degradarlos sin afectar al animal.

Otra estrategia que se ha propuesto es la introducción de material genético por medio de la técnica del ADN recombinante, utilizando *Prevotella ruminicola* como receptora de genes que codifican la función celulolítica. Esta bacteria posee resistencia a un pH bajo y produce la enzima carboximetilcelulosa que utiliza el ácido láctico. La *Prevotella ruminicola* no puede degradar la celulosa pero sí aprovechar los productos de esta degradación. La *P. ruminicola* no se une a la pared celular pero produce enzimas dominantes con una actividad diez veces mayor que la de otras enzimas celulolíticas. Utilizando estos genes se pueden buscar organismos genéticamente modificados con una mayor eficiencia a nivel ruminal (41).

El *B. fibrisolvens* es otro candidato para la manipulación genética. Esta es la bacteria que soporta mejor los niveles bajos del pH y la mayor motilidad de las células permite una mejor digestión de la pared celular, esta especie parece que libera enzimas al medio permitiendo la digestión.

La introducción de material genético al *F. succinogenes* ha fallado, llevando a los investigadores a plantear la presencia de barreras genéticas para la modificación de este microorganismo. Estudios realizados por Lee, *et al.* (1992) demuestran que el *F. succinogenes* S85 posee un tipo de endonucleasa II que reconoce la secuencia 5' GG (A/T) CC 3'. (24). El estudio del genoma de este género podría contribuir a definir bien la base enzimática de la digestión de fibra en este microorganismo (25). La mayoría de estas enzimas contienen celulasas y xilanasas estructurales muy estables, pero flexibles, que interactúan con sustratos a través de varios complejos enzimáticos (12).

Russell, *et al.* (1996) sugieren que es importante profundizar más acerca de la fisiología y genética de los microorganismos ruminales para así poder entender las interacciones, complejidades y diversidad en el rumen (37). Igualmente, conocer los diferentes mecanismos de transporte bacteriano es un aspecto fundamental para poder evaluar su capacidad de fermentación (28,37,43). Los diferentes trabajos realizados en la introducción de material genético a otras bacterias son exitosos a nivel de laboratorio pero, en la práctica, las interacciones en el

ecosistema ruminal son complejas y la adaptación de los microorganismos genéticamente modificados puede ser difícil.

## Consideraciones finales

Los estudios para incrementar la eficiencia en la fermentación microbianas de sustratos en poligástricos han estado encaminados a mejorar las condiciones ambientales del ecosistema ruminal y a manipular los microorganismos. Las interacciones entre las diferentes poblaciones microbianas, deben de tenerse en cuenta al variar la dieta de los rumiantes, porque hay factores que estimulan o inhiben el crecimiento de algunas cepas. Russell, *et al.* (1996) sugieren que es importante profundizar más acerca de la fisiología y genética de los microorganismos ruminales para poder entender las interacciones, complejidad y la diversidad del rumen. Igualmente, conocer los diferentes mecanismos de transporte bacteriano es un aspecto fundamental para poder evaluar su capacidad de fermentación (37). Dheority y Tirabasso, citados por Chaudhry (1998) encontraron que las bacterias del rumen producen compuestos termoestables que inhiben el crecimiento de los hongos en el rumen; éstos mismos autores demostraron que también hay factores de crecimiento en el licor ruminal. Probablemente exista un equilibrio entre los factores que inhiben y los que estimulan el crecimiento de hongos y que ese equilibrio esté influenciando el tamaño de las poblaciones o su actividad enzimática (11). Mejorar el tamaño de la partícula de los alimentos, minimizar los cambios en el pH, mantener niveles de energía constantes, y proteína y/o amoníaco disponible para las bacterias ruminales; incrementar la tasa de pasaje y acelerar la tasa de retención, minimizando los cambios en la dieta, son los pasos a tener en cuenta para un manejo eficiente de la dieta de los rumiantes.

La importancia de conocer los diferentes parámetros que influyen en la degradación de la celulosa por parte de las poblaciones celulolíticas permite sugerir que la alimentación proporcionada a las vacas lecheras del trópico alto en la región antioqueña no es adecuada; por lo tanto se ocasionan pérdidas económicas para el ganadero. Las diferentes formulaciones alimenticias, la forma de suministro, la restricción a los forrajes de alta calidad y la falta de fibra detergente neutra en niveles adecuados, alteran las poblaciones bacterianas de nuestros rumiantes. Los cambios en el pH, expuestos ampliamente en la presente revisión, proporcionan una inestabilidad en las poblaciones de las bacterias, reduciendo su facultad fermentativa. Estos cambios de pH están contribuyendo a que el animal no mantenga poblaciones bacterianas permanentes, lo que exige nuevos periodos de competencia/adaptación para establecer nuevos nichos, lo cual demora de cuatro a seis semanas, para normalizar a la degradación de las pasturas ofrecidas.



Los cambios en las materias primas de los alimentos concentrados ( mezclas de cereales, salvados y harinas) utilizados en nuestro medio; son otro factor importante en los cambios de las poblaciones bacterianas. Materias primas inapropiadas en los concentrados, la utilización de pasturas y henos de mala calidad (ricos en xilanos y lignina) producen un efecto de llenado mecánico que retrasa la tasa de pasaje e incrementa la tasa de retención, con consecuencias negativas en la celulolisis.

El nitrógeno proporcionado debe de estar acorde con las necesidades de la flora y la fauna del rumen. Un suministro adecuado de nitrógeno, en forma de amoniaco o de proteína preformada es básico para un crecimiento óptimo de estas poblaciones. En el trópico bajo, donde se cuenta con pasturas de baja calidad, pobres en energía y proteína, la adición de nitrógeno no proteico a la ración ha sido una practica común entre los ganaderos; en el trópico alto (en las lecherías especializadas) el suministro de fuentes proteicas en los concentrados es alto, representa un desperdicio, pues el rumen no funciona en forma óptima. Es importante mencionar que se requiere la utilización de péptidos y aminoácidos que puedan ser limitantes en el crecimiento de algunas poblaciones bacterianas, acorde con lo reportado por Atasoglu, *et al.* (2001).


Las interacciones de las diferentes poblaciones ruminales proporcionan en gran medida los elementos necesarios para una degradación eficiente de los forrajes; sin embargo, en el afán de lograr mayor producción, el hombre altera el ecosistema microbiano y recurre a la incorporación de aditivos; así se ha buscado mejorar las condiciones ruminales mediante la incorporación de levadura, ionóforos, estabilizantes de pH y enzimas preformadas a la dieta, con una gran diversidad de resultados.

## Referencias

1. Abarca S, Ibrahim M, Mannetje LT, Franco M. Parámetros de fermentación ruminal de animales en pasturas mezcladas Gramínea-Leguminosa para el Trópico Húmedo de Costa Rica. Revista Facultad Agronomía LUZ 1999; 16: 548-552
2. Aristizabal J. Proteína parte I. Revista Despertar Lechero. Cooperativa Colanta 1998; 16: 7-22.
3. Atasoglu C, Newbold CJ, Wallace RJ. Incorporation of [<sup>15</sup>N]Ammonia by the Cellulolytic Ruminal Bacteria *Fibrobacter succinogenes* BL2, *Ruminococcus albus* SY3, and *Ruminococcus flavefaciens* 17 Applied and Environmental Microbiology 2001, 67: 6: 2819-2822.
4. Baldwin RL; Allison MJ. Rumen metabolism. Journal of animal science 1983; 57: 2: 461-477.
5. Barcena G, Cose R, Roa M, González S. La degradación ruminal del heno de alfalfa y sorgo. Agricultura del las Américas 1994; 226: 12-16.
6. Bayer A, Morag E, Lamed R. The cellulosome- a treasure- trover for biotechnology. TIBTECH 1994;12: (9)
7. Bochi-B, Carro M D, Valdés C, González J S, López S. Digestibilidad *in vitro* de forrajes y concentrados: efectos de la ración de los animales donantes de liquido ruminal. Archivos de Zootecnia 1999 Vol 48 (181): 51-61.
8. Botero J. Biotecnología de los microorganismos del rumen. Monografía. Universidad de Antioquia. Facultad de medicina Veterinaria y de Zootecnia. Medellín 1998; 37P.
9. Carulla J, Hess D, Pardo O, Gonzalez S. El uso de la urea sanguínea y/o urea en leche como herramienta para determinar el balance energía proteína a nivel ruminal. Trabajo de investigación. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia- Universidad Nacional de Colombia. Santa Fe de Bogota. Corpoica.1998;12p.

10. Carulla J, Riveros C. Evaluación de la calidad nutricional de los forrajes. Trabajo de investigación. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia- Universidad Nacional de Colombia. Bogota. 1999;15p.
11. Chaudhry AS. Chemical and biological produres to upgrade cereal straws for ruminants. Nutrition Abstracts and Reviews (Serie B) 1998; 68 (5): 319-331.
12. Cheng KJ, Forsberg CW, Minato H, Costerton JW. Microbial ecology and physiology feed degradation within the rumen. Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants: proceeding of the seventh international symposium on ruminant physiology. Copyrigh by Academia Press 1991; 595-625p.
13. Departamento de Plantación Cooperativa Colanta Ltda. Medellín – Antioquia - Colombia. Datos a Diciembre 30 del 2000, del mercado de alimentos balanceados.
14. Febel H, Feteke S. Factors influencing microbial growth and the efficiency of microbial protein synthesis: a review. Acta veterinaria Hungaria 1996; 44 (1): 36-56.
15. Flint H. The rumen microbial ecosystem-recent developments. Trends in microbiology 1997; 5 (12): 483-488.
16. Fondevila M. Procesos implicados en la digestión microbiana de los forrajes de baja calidad. Revista Facultad Agronomía LUZ 1998; 15: 87-106
17. Galindo J, Stuar R, Fundora O, Regalado E, Piedra R, Delgado D, Pérez M. Efecto de la suplementacion en la población microbiana ruminal de toros que consumen residuos de centros de limpieza de caña. Revista Cubana Ciencias Agropecuarias 1993; 27 :171-179.
18. Galindo J, Elias A, Menchaca M, Piedra R. Identificación de bacilos celulolíticos gran- aislados del rumen de vacas que consumen ensilaje. Revista Cubana Ciencias Agropecuarias 1991; 25:165-173.
19. Hutjens MF. Rumen Acidosis. Departament of Animal Sciences. Univerty of Illinois. 1996. 1207 West Gregory Dr. Urbana, Il 61801 (217)333-2928. File:77
20. Iyo AH, Forsberg CW. A cold- glucanase from the ruminal bacterium *Fibrobacter succinogenes* S85 . Applied and Enviromental Microbiology 1999; 65 (3):995-998.
21. Koretsugu O, Roustem I, Aminov, Kiyoshi T, Hiroki M, Takafumi N, Nutsumi N, Yoshimi B. Genomic diversity among ruminal isolates of *Fibrobacter succinogenes* and *Prevotella ruminicola*. Rumen Microbiology Research Team, STAFF-Institute, Tsukuba Japan, 2001.
22. Krause DO, Russell JB. How many ruminal bacteria are there?. Simposium: ruminal microbiology. Journal of dairy science 1996; 79:1467-1475.
23. Laredo M, Anzola H, Cuesta A, Abril A, Rincón M. Manipulación de microorganismos ruminales con diferentes sustratos. Revista ACOVEZ 1996; 21 (2): 4-10
24. Lee SF, Forsberg CW, Gibbins AM. Type II DNA restriction-modification system and an endonuclease from the ruminal bacterium *Fibrobacter succinogenes* S85. Journal of Bacteriology 1992; 174 (16): 5275-5283
25. Lin C, Stahl DA. Comparative analyses reveal a highly conserved endoglucanase in the cellulolytic genus *Fibrobacter*. Journal of Bacteriology 1995; 177 (9):2543-2549.
26. Matheron C, Delort A, Gaudet G, Liptaj T, Forano E. Interactions between Carbon and Nitrogen Metabolism in *Fibrobacter succinogenes* S85: a <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C Nuclear Magnetic Resonance and Enzymatic Study. Applied and Environmental Microbiology 1999; 65 (5):1941-1948.
27. Matheron C, Delort A, Gaudet G, Liptaj T, Forano E. <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H of glycogen futile cycling in strains of the genus *Fibrobacter* Applied and Environmental Microbiology 1998; 64 (1):74-81
28. Morrison M. Do ruminal bacteria Exchange genetic material? Simposium: ruminal microbiology. Journal of dairy science 1996; 79:1476-1586.
29. Mouriño FR, Akkarawongsa, Weimer PJ. Initial pH as a determinant of cellulose digestion rate by mixed ruminal microorganisms in vitro. Journal of dairy science 2001; 84: 848-859.
30. NRC. 2001 Nutrient requirements of dairy cattle. 7 ed. National academy press. Washington, D.C.
31. NRC. 1989 Nutrient requirements of dairy cattle. 6 ed. National academy press. Washington, D.C.
32. Obispo N, Burk D. Efectos de la frecuencia de alimentación sobre el número de los hongos del rumen en ovinos (estudio preliminar) Zootecnia tropical 1998; 16 (2): 229-240.
33. Paggi RA, Fernández HM, Fay JP. Effect of final products of the fermentation ruminal about the growth of *Ruminococcus albus*. IIB, FCEyN, UNMdP - EEA Balcarce, INTA 2001;
34. Pegden RS, Marilyn A, Larson R, Grant J, Morrison M. Adherence of the Gram-Positive Bacterium *Ruminococcus albus* to Cellulose and Identification of a Novel Form of Cellulose-Binding Protein Which Belongs to the Pil Family of Proteins. Journal of Bacteriology 1998; 180 (22): 5921-5927.
35. Peña C. Aspectos de fisiología y metabolismo microbiológicos. ICA. Bogota. Folleto.1982; 62p.
36. Preston T, Leng R. Ajustado a los sistemas de producción pecuario a los recursos disponibles. Consultoria para el desarrollo integrado en el trópico (condrit) Ltda. Cali- Colombia 1989; 250p.
37. Russell J, Wilson D. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH ? Journal of dairy science 1996; 79:1503-1505.
38. Scoot M, Nisbet D. Effect of direct-fed microbials on rumen microbial fermentation. Symposium: Direct-fed microbial and rumen fermentation. Journal of dairy science. 1992; 75: 1736-144.



- 
39. Sullivan HM, SA Martin. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* cultura on in vitro mixed ruminal microorganism fermentation. *Journal of dairy science* 1999; 82: 2011-2016.
40. Takafumi N, Nakamura N, Ogata K, Tajima K, Matsui H, Benno Y. Genome analysis for *Fibrobacter succinogenes* S85 using inverse per-direct sequencing method Rumen Microbiology Research Team, STAFF-Institute, 446-1 Ippaizuka, Kamiyokoba, Tsukuba 305-0854. Japan Collection of Microorganisms, RIKEN. 2001.
41. Van Soest PJ. Nutrition ecology of the ruminant. Cornell University. Second edition. New York 1994;476p.
42. Weimer PJ. Why don't ruminal bacteria digest cellulose faster?. Symposium: ruminal microbiology. *Journal of dairy science* 1996; 79:1496-1502.
43. Weimer PJ, Waghorn GC, Odt CI, Mertens DR. Effect of diet on populaions of three species of ruminal cellulolytic bacteria in lactation dairy cows. *Journal of dairy science* 1999; 82:122-134.
44. Wells JE, Russell JB. Why do many ruminal bacteria die and lyse so quickly?. Symposium: ruminal microbiology. *Journal of dairy science* 1996; 79:1487-1496.
45. Yokoyama M, KA Jhonson. Microbiología del rumen y del intestino. En: *Fisiología digestiva y nutrición* . Ed Church, D.C.. Ed Acribia S.A. Zaragoza España 1993; 138-156p.
46. Zhu WY, AH Kingston, D. Troncoso, RJ Merry, DR Davies, G Pichard, H Thomas, MK Theodorou. Evidence of a role for plant proteases in the degradation of herbage proteins in the rumen of grazing cattle. *Journal of dairy science* 1999; 82:2651-2658.

10. ...  
11. ...  
12. ...  
13. ...  
14. ...  
15. ...  
16. ...  
17. ...  
18. ...  
19. ...  
20. ...

Figura 1. ...

**Manejo y calidad del forraje.** Los sistemas de producción de tropico alto se caracterizan por ser extensivos, en unidades de explotación muy pequeñas (28) lo que conlleva a que el ganadero se vea en la obligación de tener una mayor productividad por hectárea, y para esto recurre a una serie de prácticas que pueden afectar la producción y la salud del animal, además de afectar considerablemente los costos de producción. La principal práctica, que tal vez resuma los problemas que se presentan al tropico alto, es la excesiva fertilización nitrogenada, de donde se deriva una serie de consecuencias que afectan negativamente al animal: pastoreo a ciérras más largas, lo que ocasiona un aumento en el consumo de alimento voluble (5), un aumento en carbohidratos no estructurales muy peltos (6 ó 7%), altos contenidos de potasio y menores niveles de calcio y magnesio (7), bajos niveles de fibra efectiva, y un mayor porcentaje de humedad que afecta negativamente el consumo (una disminución en el MSOM de 63% del peso corporal por cada 1% de aumento en el porcentaje de humedad) (24).

Debe quedar claro, entonces, que la calidad del forraje es lo que define los parámetros digestivos de la dieta y el metabolismo del animal, y esto debe ser el punto de partida para la implementación de propuestas nutricionales, combiéndose con una suplementación que tenga como función la de habilitar la dieta.

Otro (25) propone "que se debe llevar a cabo un programa de fertilización que reconozca la aplicación de nutrientes, especialmente el nitrógeno, para obtener