

ARTÍCULO CIENTÍFICO

Hugo Jiménez¹ y
Edgar Benítez²

ABSTRACT

Title: Influence of sulphurum and type of substrate on the growth of ruminal fungi *Neocallimastix frontalis* and *Orpinomyces intercalaris*

The study was aimed at evaluating *in vitro* fungal colonization and specific enzyme activity (xylanase and cellulase) of *Neocallimastix frontalis* H10001 and *Orpinomyces intercalaris* H20013 rumen fungi on *Brachiaria decumbens* and *Pennisetum clandestinum* leaves. Three sodium sulphate levels (0%, 4% and 12% w/v) were used for testing *in vitro* fungal colonization and enzyme activity. Colonization was evaluated by quantifying the number of sporangia on leaf fragments. Enzyme activity was determined by measuring the amount of reduced sugar on supernatant fraction. Type × grass and sulphur interaction levels ($P < 0.05$) affect sporangial number. The sporangial number for *N. frontalis* increased ($P < 0.05$) when S was added, except for *N. frontalis* on *B. decumbens*, whilst adding S increased ($P < 0.05$) *O. intercalaris* sporangial number in both grasses. The highest sporangial numbers were detected on *O. intercalaris* and *P. clandestinum* at 4% and 12% S (12.77 and 14.82 sporangia-mm⁻², respectively). Extracellular xylanolytic activity was affected ($P < 0.05$) by grass type. The highest extracellular xylanolytic activity was detected in *O. intercalaris* supernatant on *B. decumbens*. Extracellular cellulolytic activity was affected ($P < 0.05$) by type × grass sulphur interaction levels. Adding 4% S increased ($P < 0.05$) extracellular cellulolytic activity in *N. frontalis* and *O. intercalaris* supernatants in both grasses; there were no effects on extracellular cellulolytic activity from *N. frontalis* supernatant on *P. clandestinum* and *O. intercalaris* supernatant on *B. decumbens* compared to control. Extracellular cellulolytic activity was reduced ($P < 0.05$) in *N. frontalis* on *B. decumbens* and *O. intercalaris* on *P. clandestinum*. Variation in sporangial number and of pure rumen fungi culture (*N. frontalis* and *O. intercalaris*) extracellular cellulolytic activity depended on grass type as well as culture medium S level. S could improve rumen fungi growth and development.

Key words: Colonization, rumen fungi, enzymatic activity, *Neocallimastix frontalis*, *Orpinomyces intercalaris*.

Recibido: enero 4 de 2005.
Aceptado: mayo 2 de 2005.

1. Programa Nacional de Fisiología y Nutrición Animal, CORPOICA, C.I. Tibaitatá.

A.A. 240142 Las Palmas, Bogotá, Colombia.
e-mail: hjimenez@corpoica.org.co,

2. Programa Nacional de Biometría, CORPOICA, C.I. Tibaitatá.

Influencia del azufre y del tipo de sustrato sobre el crecimiento de los hongos ruminales *Neocallimastix frontalis* y *Orpinomyces intercalaris*

RESUMEN

Se evaluó la colonización *in vitro* y la actividad enzimática extracelular (xilanolítica y celulolítica) de los hongos ruminales *Neocallimastix frontalis* H10001 y *Orpinomyces intercalaris* H20013 sobre hojas de las gramíneas *Brachiaria decumbens* y *Pennisetum clandestinum*. Para promover la colonización y actividad enzimática se utilizaron tres niveles de sulfato de sodio (0%, 4% y 12% p/v). La colonización se evaluó determinando el número de esporangios-mm⁻² y la actividad enzimática se evaluó en el sobrenadante a las 72 h por cuantificación de los azúcares reductores liberados durante el proceso. El número de esporangios varió ($P < 0,05$) con la interacción tipo de gramínea × nivel de azufre. Para *N. frontalis* la adición de S incrementó el número de esporangios excepto para *N. frontalis* sobre *B. decumbens* ($P < 0,05$); mientras que para *O. intercalaris* la adición de S incrementó el número de esporangios en ambas gramíneas ($P < 0,05$). El mayor número de esporangios se obtuvo con *O. intercalaris* sobre *P. clandestinum* en las concentraciones de 4 y 12% de S (12,77 y 14,82 esporangios-mm⁻², respectivamente). La actividad xilanolítica extracelular varió ($P < 0,05$) con el tipo de gramínea; la mayor actividad xilanolítica extracelular se determinó en el sobrenadante de *O. intercalaris* sobre *B. decumbens*. La actividad celulolítica extracelular varió ($P < 0,05$) con la interacción tipo de gramínea × nivel de azufre. La utilización de 4% de S incrementó ($P < 0,05$) la actividad celulolítica extracelular de los sobrenadantes de *N. frontalis* y *O. intercalaris* en ambas gramíneas; mientras que la adición de 12% de S no afectó ($P > 0,05$) la actividad celulolítica de *N. frontalis* sobre *P. clandestinum* y de *O. intercalaris* sobre *B. decumbens* en comparación con el control; no obstante, la actividad celulolítica extracelular en los sobrenadantes de *N. frontalis* sobre *B. decumbens* y de *O. intercalaris* sobre *P. clandestinum* se redujeron ($P < 0,05$). Los resultados de este estudio indican que el número de esporangios y la actividad celulolítica extracelular de cultivos puros de los hongos *N. frontalis* y *O. intercalaris* dependen del tipo de gramínea y del nivel de S presente en el medio de cultivo; así mismo, la presencia de S mejora el crecimiento y desarrollo de los hongos.

Palabras clave: Colonización, hongos ruminales, actividad enzimática, *Neocallimastix frontalis*, *Orpinomyces intercalaris*.

INTRODUCCIÓN

LOS HONGOS DEL RUMEN son los primeros microorganismos en colonizar los tejidos vegetales y contribuyen activamente al rompimiento de la fibra (Akin and Windham, 1989; Bauchop, 1979). La estrecha afinidad de sus esporangios por diferentes tejidos vegetales sugiere que su papel es clave en los procesos de degradación y transformación del alimento (Bauchop, 1979). Su actividad degradativa depende de la producción de un amplio rango de enzimas hidrolíticas que incluye celulasas, hemicelulasas, proteasas, amilasas, pectinasas y esterasas, encargadas de debilitar los materiales fibrosos y facilitar el acceso de las bacterias ruminales al interior de los tejidos vegetales (Lowe *et al.*, 1987; Barichievich y Calza, 1990).

Los chytridiomycetes del rumen se agrupan en dos categorías: monocéntricos (*Neocallimastix*, *Caecomycetes* y *Piromycetes*) y policéntricos (*Orpinomyces* y *Anaeromyces*), clasificación que se basa en las características morfológicas y ultraestructurales; sin embargo, desde el punto de vista bioquímico, los hongos se consideran bastante similares (Ho y Barr, 1995; Yanke *et al.*, 1996). Barr (1983) considera que los hongos policéntricos son los Chytridiomycetes más evolucionados por su mayor producción de zoosporangios y su habilidad de reproducción vegetativa mediante fragmentación del rizomicelio, en tanto que la reproducción de los monocéntricos, se asocia con la formación de zoosporas.

El grado de colonización de los hongos ruminales se relaciona con el tipo y calidad de la dieta sobre la cual crecen (Grenet *et al.*, 1989). Los hongos del rumen son particularmente abundantes en animales alimentados con dietas altas en fibra y su número aumenta en alimentos tales como pajas, forrajes de baja calidad y residuos de cosecha (Trinci *et al.*, 1994). Adicionalmente, varios autores han encontrado que la adición de azufre (S) incrementa el tamaño de las poblaciones fungales en el rumen sobre sustratos de crecimiento como pajas, henos y forrajes con bajo contenido de S al tiempo que aumenta su degradación (Akin *et al.*, 1990; Grenet *et al.*, 1989; Bauchop, 1979; Orpin, 1977). Sin embargo, existe poca información referente al efecto del S sobre la colonización de cultivos puros de hongos ruminales sobre forrajes tropicales.

En el presente estudio se evaluó el efecto del tipo de forraje y la de la suplementación con azufre inorgánico (sulfato de sodio) en el crecimiento y en la actividad enzimática *in vitro* de los hongos ruminales *N. frontalis* H10001 y *O. intercalaris* H20013.

Materiales y métodos

Microorganismos y medios de cultivo. Para los ensayos de colonización se utilizaron dos hongos del rumen suministrados por el banco de germoplasma de microorganismos del tracto gastrointestinal de CORPOICA (CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca). La especie *N. frontalis* H10001 fue aislada de un ovino de raza Black Face en pastoreo de Kikuyo (*P. clandestinum*); por su parte, el hongo *O. intercalaris* H20013 fue aislado de un bovino Sanmartinero en pastoreo de *Brachiaria dictyoneura*.

El medio utilizado para el cultivo de los hongos es una modificación de la metodología de Lowe *et al.* (1985). Este medio contenía una solución basal compuesta por extracto de levadura, 0.05% (w/v); fluido ruminal clarificado 25% (w/v); 17 ml de K_2HPO_4 ($3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$); solución de sal mineral compuesta por KH_2PO_4 ($3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$); $(NH_4)_2SO_4$ ($6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$); NaCl ($6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$); $MgSO_4$ ($1,2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) y $CaCl_2\cdot 2H_2O$ ($0,8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$); neopeptona 0,1% (w/v); $NaHCO_3$ 0,6% (w/v); solución de hemina (10 ml); solución de resazurin ($1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$); L-cisteína como agente reductor 0,1% (w/v); 100 μl de una solución de vitaminas; 100 μl de una solución de antibióticos que contenía ampicilina ($0,1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) y cloranfenicol ($0,05\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$); como fuente de carbono se

utilizaron fragmentos de heno (área $0,5 \times 0,5\text{ cm}$) de *B. decumbens* o *P. clandestinum* obtenidos de la sección media de la lámina foliar de las hojas.

Fuentes de azufre. Para evaluar el efecto del azufre sobre el crecimiento fungal se utilizó como fuente de azufre sulfato de sodio (AnalytiCals®, Carlo Erba, Cod. 483257). Se establecieron como tratamientos tres concentraciones diferentes de S en el medio de cultivo (0%, 4% y 12%); la cuantificación del contenido de S en el medio de cultivo para cada uno de los tratamientos correspondió a 358, 377,6 y 435,2 ppm de S respectivamente, la cuantificación de S se realizó por el método de Tabatabai y Bremner (1970).

Forrajes. Como sustrato y fuente de nutrientes del medio de crecimiento fungal se utilizaron láminas foliares de *B. decumbens* obtenido de praderas del C.I La Libertad (Villavicencio, Meta) localizado a 336 m.s.n.m con una temperatura promedio de 27 °C. Las hojas de *P. clandestinum* se obtuvieron de praderas del C.I. Tibaitatá (Cundinamarca) localizado a 2.643 m.s.n.m con temperatura promedio de 13 °C. Ambas gramíneas tenían 65 días de rebrote. Las plantas se cortaron a una altura de 10 cm por encima del suelo y se secaron a 25 °C durante 3 días.

Análisis químico de las hojas. Se realizaron análisis químicos de lignina y proteína cruda, N (micro-Kjeldahl), de acuerdo con las metodologías de la AOAC (Association of Official Analytical Chemist, 1995). La fibra en detergente neutro (FDN) y fibra en detergente ácido (FDA) fueron determinadas siguiendo el método de Goering y Van Soest (1970), y el contenido de azufre (S) se determinó por el método de Tabatabai y Bremner (1970) (Tabla 1).

Colonización de fragmentos de las hojas. Para la determinación del número de esporangios sobre las hojas de *B. decumbens* y *P. clandestinum*, se utilizaron seis fragmentos de hoja ($0,5 \times 0,5\text{ cm}$) en cada tubo. Para cada combinación de hongo-pasto-nivel de azufre, se adicionó 1 ml de un inóculo microbioal que contenía aproximadamente 1×10^3 UFT $\cdot\text{ml}^{-1}$. Los tubos permanecieron en incubación por 72 h a 39 °C. Posteriormente, los fragmentos colonizados se fijaron en formalina al 10%. Los recuentos del número de cabezas esporangiales se realizaron bajo microscopio de luz (10X) utilizando

5 campos seleccionados aleatoriamente (Akin, 1987). Para la observación de los esporangios se utilizó solución de yodo.

Determinación de la actividad enzimática específica. La actividad enzimática extracelular (celulolítica y xilanolítica) se determinó a partir de las enzimas liberadas al medio de cultivo por los hongos ruminales durante el proceso de colonización; para tal fin, se recolectaron los sobrenadantes de cada una de las combinaciones hongo-pasto-nivel de azufre obtenidas después de 72 h a 39 °C. Los sobrenadantes fueron clarificados por centrifugación (Beckman Instrument, model J2-21) a 10.000 rpm por 30 min.

La actividad celulolítica fue medida como la cantidad de azúcares reductores liberados después de la incubación del sobrenadante con el sustrato carboximetilcelulosa (CMC). La reacción se llevó a cabo después de incubar 50 μl del sobrenadante en 450 μl de buffer citrato (pH 6.0) que contenía $5,5\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de CMC a 50 °C por 30 min. La reacción enzimática fue terminada colocando los tubos en agua hirviendo. Posteriormente, las muestras se centrifugaron (Eppendorf, Centrifuge 5415 C) a 10.000 rpm por 10 min. A partir del sobrenadante resultante se analizó la cantidad de azúcares reductores liberados según el método de Somogy (1952); se utilizó glucosa como estándar para elaborar la curva de calibración.

La actividad xilanolítica fue medida como la cantidad de azúcares reductores liberados después de la incubación del sobrenadante con el sustrato xilano de Birchwood. La reacción se llevó a cabo después de incubar 50 μl del sobrenadante en 450 μl de buffer citrato (pH 6.0) que contenía $6,5\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de xilano a 50 °C por 30 min. La reacción enzimática fue terminada colocando los tubos en agua hirviendo. Posteriormente, las muestras se centrifugaron (Eppendorf, Centrifuge 5415 C) a 10.000 rpm por 10 min. A partir del sobrenadante resultante se analizó la cantidad de azúcares reductores liberados según el método de Somogy (1952); se utilizó xilosa como estándar para elaborar la curva de calibración.

La actividad enzimática se expresó como los micromoles de azúcares reductores liberados durante 1 minuto y por 1 mg de proteína en el sobrenadante. Para todos los casos, la proteína presente en los extractos extracelulares se cuantificó por el método de Lowry *et al.* (1951) usando albúmina sérica bovina como estándar.

Análisis estadístico. Se utilizó un modelo lineal con factores fijos (hongos, forrajes, niveles de azufre), como se describe a continuación:

$$y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \theta_k + (\alpha\theta)_{ik} + (\beta\theta)_{jk} + (\alpha\beta\theta)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl}$$

Donde *y* es la variable de respuesta (número de esporangios o actividad celulolítica o actividad xilanolítica); μ es la media de la población para las variables respectivas; α_i con *i*-ésimo género de hongo; β_j con el *j*-ésimo forraje; $(\alpha\beta)_{ij}$ interacción forraje por hongo; θ_k con el *k*-ésimo nivel de azufre; $(\alpha\theta)_{ik}$ con la interacción azufre por hongo; $(\beta\theta)_{jk}$ con la interacción forraje por azufre; $(\alpha\beta\theta)_{ijk}$ con la interacción hongo por forraje por azufre; ε_{ijkl} corresponde al error del modelo. El ensayo se replicó en el tiempo dos veces, para el análisis de las interacciones se realizó con la opción SLICE del procedimiento GLM del programa S.A.S® v. 8.2®.

Resultados

En la Tabla 1 se observa el análisis de la composición nutricional de las láminas foliares de las gramíneas. En general, la composición nutricional de *P. clandestinum* fue mejor que *B. decumbens*. La gramínea *P. clandestinum* presentó mayores contenidos de proteína cruda y azufre en sus hojas que *B. decumbens*; mientras que el contenido de pared celular (FDN) y lignina fue menor que *B. decumbens*.

Tabla 1. Composición química de láminas foliares de dos gramíneas*

Contenido (%)**	<i>P. clandestinum</i>	<i>B. decumbens</i>
PC	20.02	14.16
FDA	26.25	28.96
FDN	57.24	61.8
Lignina	6.1	7.8
S	0.20	0.07

* 65 días: edad de rebrote.
** Porcentajes basados en el contenido de materia seca.

El número de esporangios de los hongos ruminales varió ($P < 0,05$) con la interacción forraje x nivel de azufre en cada hongo ruminal (Tablas 2 y 3). El número de esporangios de *N. frontalis* en *B. decumbens* no respondió ($P > 0,05$) a la adición de S, en tanto que en *P. clandestinum* el número de esporangios se incrementó ($P < 0,05$) con la adición de S (Tabla 2). El mayor número de

esporangios se obtuvo en *P. clandestinum* con los niveles de 4% y 12% de S (12,77 y 14,82 esporangios·mm⁻²) respectivamente, y fue superior ($P < 0,05$) a lo encontrado en *B. decumbens* (5,29 y 6,27 esporangios·mm⁻²) respectivamente.

En el caso de *O. intercalaris*, el número de esporangios aumentó ($P < 0,05$) al incrementar los niveles de azufre en ambas gramíneas; aunque, al comparar los tratamientos que recibieron S no se observaron diferencias en el número de esporangios. Por otra parte, en el tratamiento testigo el número de esporangios en *P. clandestinum* fue superior ($P < 0,05$) a *B. decumbens* (9,91 y 6,67 esporangios·mm⁻²) respectivamente.

Al comparar el número de esporangios de los hongos ruminales en cada gramínea (Tabla 3) se encontró que en el tratamiento testigo no hubo diferencias en el número de esporangios ($P > 0,05$) entre *N. frontalis* y *O. intercalaris* para el caso de *B. decumbens*; en tanto que en los

tratamientos que recibieron S, el número de esporangios de *O. intercalaris* fue superior ($P < 0,05$) al número de esporangios de *N. frontalis*.

En el caso de *P. clandestinum*, el número de esporangios en los tratamientos que recibieron S no se presentaron ($P > 0,05$) diferencias; mientras que, en el tratamiento testigo el número de esporangios ($P < 0,05$) fue mayor para *O. intercalaris* que para *N. frontalis* (9,91 vs. 6,27 esporangios·mm⁻²) respectivamente.

En la Tabla 4, sólo se presentan los efectos principales del tipo de gramínea sobre la actividad xilanolítica extracelular para cada hongo ruminal, debido a que no se encontró interacción entre las gramíneas y los diferentes niveles de azufre ($P > 0,05$) para ninguno de los hongos ruminales evaluados. En el sobrenadante de *N. frontalis* en *B. decumbens* la actividad xilanolítica es muy baja ($P > 0,05$) respecto a *P. clandestinum*; mientras que para *O. intercalaris*, la acti-

Tabla 2. Efecto del nivel de azufre sobre el número de esporangios (esporangios·mm⁻²) de dos hongos ruminales en dos gramíneas diferentes.

Hongos	Gramíneas	Niveles de S		
		Sin S	4%	12%
<i>N. frontalis</i>	<i>B. decumbens</i>	4.78 ^a ± 0.16	5.29 ^b ± 0.16	6.27 ^a ± 0.13
	<i>P. clandestinum</i>	6.27 ^b ± 0.13	12.77 ^a ± 0.18	14.82 ^a ± 0.13
<i>O. intercalaris</i>	<i>B. decumbens</i>	6.67 ^b ± 0.24	14.48 ^a ± 0.31	17.2 ^a ± 0.22
	<i>P. clandestinum</i>	9.91 ^b ± 0.2	13.92 ^a ± 0.3	14.55 ^a ± 0.24

Promedios con letras similares no difieren ($P > 0,05$). Letras minúsculas separan promedios dentro de cada hongo respecto del nivel de azufre y las letras mayúsculas separan promedios dentro de cada hongo según cada forraje. Significancia observada ($P < 0,05$) para la interacción nivel de azufre x tipo de gramínea.

Tabla 3. Número de esporangios (esporangios·mm⁻²) de dos hongos ruminales comparados con dos gramíneas y tres niveles de azufre.

Gramíneas	Hongos	Niveles de S		
		Sin S	4%	12%
<i>B. decumbens</i>	<i>N. frontalis</i>	4.78 ^a ± 0.16	5.29 ^a ± 0.16	6.27 ^a ± 0.13
	<i>O. intercalaris</i>	6.67 ^a ± 0.24	14.48 ^b ± 0.31	17.2 ^b ± 0.22
<i>P. clandestinum</i>	<i>N. frontalis</i>	6.27 ^a ± 0.13	12.77 ^a ± 0.18	14.82 ^a ± 0.13
	<i>O. intercalaris</i>	9.91 ^b ± 0.2	13.92 ^a ± 0.3	14.55 ^a ± 0.24

Promedios con letras similares no difieren ($P > 0,05$) dentro de cada nivel de azufre y forraje. Significancia observada ($P < 0,05$) para la interacción nivel de azufre x tipo de gramínea.

Tabla 4. Actividad xilanolítica extracelular (xilosa µmol/min·mg⁻¹ proteína) en el sobrenadante de dos hongos ruminales comparados con dos gramíneas.

Hongos	Forraje	(xilosa µmol/min·mg ⁻¹ proteína)
<i>N. frontalis</i>	<i>B. decumbens</i>	0.001 ^b
	<i>P. clandestinum</i>	0.59 ^a
<i>O. intercalaris</i>	<i>B. decumbens</i>	1.28 ^a
	<i>P. clandestinum</i>	0.67 ^b

Promedios con letras similares no difieren ($P > 0,05$) dentro de cada hongo y forraje.

vidad xilanolítica fue mayor ($P < 0,05$) en *B. decumbens* que en *P. clandestinum*.

La actividad celulolítica extracelular presente en el sobrenadante de los cultivos de los hongos ruminales varió ($P < 0,05$) con la interacción forraje \times nivel de azufre (Tablas 5 y 6) para cada una de las especies de hongos. Para el nivel de 4% de S en las combinaciones de *N. frontalis* en *B. decumbens* o *P. clandestinum*, la actividad celulolítica extracelular se incrementó ($P < 0,05$) con la adición de S (Tabla 5), en tanto que la adición de 12% de S disminuyó ($P < 0,05$) la actividad celulolítica en la combinación *N. frontalis* en *B. decumbens*; mientras que para *N. frontalis* en *P. clandestinum*, la actividad celulolítica no se afectó ($P > 0,05$) en comparación con el tratamiento control. La mayor actividad celulolítica extracelular se presentó en *B. decumbens* en el nivel de 4% de S (glucosa $0,130 \mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteína), y fue superior ($P < 0,05$) a lo encontrado en *P. clandestinum* (glucosa $0,062 \mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteína).

En el caso de *O. intercalaris*, la adición de 4% de S incrementó ($P < 0,05$) la actividad celulolítica extracelular en los sobrenadantes de los cultivos que contenían ambas gramíneas (Tabla 5). La inclusión de 12% de S no afectó ($P > 0,05$) la actividad celulolítica extracelular en la combinación con *B. decumbens*, en tanto que en la combinación con *P. clandestini-*

num la actividad estuvo por debajo de los límites de detección. La mayor actividad celulolítica extracelular se presentó en *B. decumbens* en el nivel de 4% de S (glucosa $0,075 \mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteína), y fue superior ($P < 0,05$) a lo encontrado en *P. clandestinum* (glucosa $0,042 \mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteína).

Al comparar la actividad celulolítica extracelular de los hongos ruminales en cada gramínea (Tabla 6), se encontró que en *B. decumbens* la actividad celulolítica extracelular de *N. frontalis* fue mayor ($P < 0,05$) que *O. intercalaris* en todos los tratamientos. De la misma manera, la actividad celulolítica de *N. frontalis* fue mayor ($P < 0,05$) que *O. intercalaris* en todos los tratamientos para el caso de *P. clandestinum*.

Discusión

Los hongos ruminales colonizan preferentemente tejidos vegetales con altos contenidos de fibra y lignina, como el esclerénquima y los haces vasculares de la planta (Ho *et al.*, 1988). Su habilidad para colonizar estos materiales involucra la adherencia de la zoospora sobre la superficie del tejido vegetal y la subsiguiente maduración y formación de un esporangio con el desarrollo de rizoides que penetran y degradan el sustrato (Li and Heath, 1993; Wubah *et al.*, 1993; Trinci *et al.*, 1994). Los hongos anaerobios

debilitan los tejidos vegetales por la producción de potentes enzimas hidrolíticas y por la acción física de las hifas que desarrollan (Ho and Abdullah, 1999). Se ha sugerido que algunos compuestos presentes en los sustratos a los cuales se adhieren los hongos pueden limitar los procesos de colonización (Akin and Rigsby, 1985; Tanaka *et al.*, 1991, citado por Gordon and Phillips, 1998; Wilson, 1994). De la misma manera, el status nutricional de la dieta puede ejercer un efecto sobre la población de los hongos en el rumen (Akin, 1987; Orpin and Greenwood, 1986).

Las diferencias observadas en el número de esporangios de los hongos ruminales sobre los fragmentos de hoja de las dos gramíneas en esta investigación, son consistentes con los trabajos previamente publicados por Bauchop, 1979; Akin, 1987 y Grenet *et al.*, 1989. Los resultados muestran que las gramíneas *B. decumbens* y *P. clandestinum* fueron colonizadas en diferente grado, aún por el mismo hongo ruminal (*N. frontalis*). Ho y Abdullah (1999) sugirieron que algunas dietas pueden ser más favorables para el crecimiento y desarrollo de los hongos que otras, especialmente, aquellas con altos contenidos de fibra. En este mismo sentido, Grenet *et al.* (1989) y Bauchop (1979) encontraron que los animales alimentados con dietas con mayor contenido de fibra soportaban las poblaciones de hongos ruminales más numerosas. En este estudio, las hojas de *B. decumbens* contenían la mayor cantidad de FDN en comparación con *P. clandestinum*; no obstante, el número de esporangios de *N. frontalis* en *B. decumbens* fue inferior ($P < 0,05$) en comparación con el número de esporangios hallados sobre *P. clandestinum*. Estos resultados sugieren que la colonización de los hongos ruminales no sólo depende del contenido de fibra en las hojas de las gramíneas, sino que es posible que existan otros factores asociados a la planta que afectan el desempeño de *N. frontalis* para colonizar los tejidos de *B. decumbens*. Por otro lado, se ha sugerido que la lignina presente en la pared celular de las plantas puede ser un factor selectivo de la adherencia y la colonización de las zoosporas de los hongos ruminales, debido a que los tejidos lignificados confieren resistencia al ataque microbioal por inhibición de los procesos de adherencia y colonización o por limitación del acceso a la acción de las enzimas microbiales (Wilson, 1994; Richards, 1976 y Hartley, 1985 citados

Tabla 5. Efecto del nivel de azufre sobre la actividad celulolítica extracelular (glucosa $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteína) presente en el sobrenadante de dos hongos ruminales en dos diferentes gramíneas y tres niveles de azufre.

Hongos	Gramíneas	Niveles de S		
		Sin S	4%	12%
<i>N. frontalis</i>	<i>B. decumbens</i>	$0.097^{\text{bA}} \pm 6.5 \cdot 10^{-3}$	$0.130^{\text{aA}} \pm 1.2 \cdot 10^{-2}$	$0.053^{\text{cA}} \pm 5.2 \cdot 10^{-3}$
	<i>P. clandestinum</i>	$0.049^{\text{bB}} \pm 7.0 \cdot 10^{-3}$	$0.062^{\text{bB}} \pm 2.2 \cdot 10^{-3}$	$0.058^{\text{bA}} \pm 5.7 \cdot 10^{-3}$
<i>O. intercalaris</i>	<i>B. decumbens</i>	$0.035^{\text{bA}} \pm 7.9 \cdot 10^{-3}$	$0.075^{\text{aA}} \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$	$0.040^{\text{b}} \pm 6.1 \cdot 10^{-3}$
	<i>P. clandestinum</i>	$0.003^{\text{bB}} \pm 2.5 \cdot 10^{-3}$	$0.042^{\text{bB}} \pm 1.5 \cdot 10^{-3}$	N.D

Promedios con letras similares no difieren ($P > 0,05$). Letras minúsculas separan promedios dentro de cada hongo respecto del nivel de azufre y las letras mayúsculas separan promedios dentro de cada hongo según cada forraje. Significancia observada ($P < 0,05$) para la interacción nivel de azufre \times tipo de gramínea.

Tabla 6. Actividad celulolítica extracelular (glucosa $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteína) en el sobrenadante de dos hongos ruminales comparados con dos gramíneas y tres niveles de azufre.

Gramíneas	Hongos	Niveles de S		
		Sin S	4%	12%
<i>B. decumbens</i>	<i>N. frontalis</i>	$0.097^{\text{a}} \pm 6.5 \cdot 10^{-3}$	$0.130^{\text{a}} \pm 1.2 \cdot 10^{-2}$	$0.053^{\text{a}} \pm 5.2 \cdot 10^{-3}$
	<i>O. intercalaris</i>	$0.035^{\text{b}} \pm 7.9 \cdot 10^{-3}$	$0.075^{\text{b}} \pm 1.0 \cdot 10^{-3}$	$0.040^{\text{b}} \pm 6.1 \cdot 10^{-3}$
<i>P. clandestinum</i>	<i>N. frontalis</i>	$0.049^{\text{a}} \pm 7.0 \cdot 10^{-3}$	$0.062^{\text{a}} \pm 2.2 \cdot 10^{-3}$	$0.058 \pm 5.7 \cdot 10^{-3}$
	<i>O. intercalaris</i>	$0.003^{\text{b}} \pm 2.5 \cdot 10^{-3}$	$0.042^{\text{b}} \pm 1.5 \cdot 10^{-3}$	N.D

Promedios con letras similares no difieren ($P > 0,05$) dentro de cada nivel de azufre y forraje. Significancia observada ($P < 0,05$) para la interacción nivel de azufre \times tipo de gramínea.

por Theodorou *et al.*, 1987). Adicionalmente, la lignina presente en la pared celular de las plantas se asocia con ácidos fenólicos y compuestos aromáticos que pueden limitar la degradabilidad de la fibra (Tanaka *et al.*, 1991, citado por Gordon and Phillips, 1998). Los ácidos fenólicos unidos a los polisacáridos de la pared celular o a la lignina ejercen un efecto tóxico sobre cultivos puros de bacterias y hongos ruminales (Akin and Rigsby, 1985; Theodorou *et al.*, 1987). En este estudio se encontró que la concentración de lignina fue mayor en las hojas de *B. decumbens* que en *P. clandestinum*: es probable que una mayor concentración de lignina en las hojas de *B. decumbens* hubiera afectado el proceso de adhesión y colonización de *N. frontalis* sobre *B. decumbens*. Sin embargo, el tamaño de la población de esporangios de *O. intercalaris* no fue entre ambas gramíneas. Estos datos sugieren que las cepas puras de hongos ruminales utilizadas en este trabajo no tiene la misma habilidad para permanecer y adherirse a la pared celular de las dos gramíneas evaluadas. Por consiguiente, cada hongo ruminal mantiene particularidades únicas que les permite colonizar determinados sustratos.

Una mayor disponibilidad de azufre en el medio de cultivo incrementó significativamente ($P < 0,05$) el número de cabezas esporangiales de ambos hongos ruminales sobre las láminas foliares de las gramíneas, a excepción de *N. frontalis* sobre *B. decumbens*. La influencia del S sobre el desarrollo esporangial de los hongos ruminales había sido previamente mencionado en los trabajos de Akin *et al.*, 1983 y Akin, 1987. Ellos encontraron que la adición de S en dietas deficientes de S en ovejas, así como el suministro de forrajes fertilizados con S incrementaban el tamaño de la población de esporangios en el rumen de las ovejas. De la misma manera, Gordon *et al.*, (1983) encontraron que la adición de aminoácidos azufrados favoreció el tamaño de las poblaciones de hongos ruminales en ovejas alimentadas con una dieta de paja de trigo. Por consiguiente, la adición de S proporciona a los hongos ruminales un ambiente favorable para el desarrollo de los esporangios, y tal vez influya los eventos de adherencia y colonización de las zoosporas a los sustratos. Adicionalmente, Morrison *et al.* (1990) sugirieron que los hongos ruminales requieren de S en forma de sulfito. Además, estos autores mencionaron que el desempeño de los hongos ruminales en la degra-

dación de la celulosa en el rumen está posiblemente influida por la ineficiencia de las bacterias para producir suficiente sulfito. Sin embargo, la utilización de cultivos puros de hongos del rumen en este trabajo, como la utilización de poblaciones de hongos libres de bacterias según el trabajo de Akin (1987), mostraron que la adición de S en forma de sulfato o azufre elemental respectivamente, incrementaron el tamaño de las poblaciones de esporangios. De manera que el S es un factor importante en los eventos de colonización y crecimiento de los hongos ruminales, no sólo en forma de sulfito, sino además en forma de sulfato y azufre elemental.

Además de las diferencias en el estatus nutricional de las gramíneas, y de la influencia del S presente en el medio de cultivo de los hongos ruminales, la habilidad diferencial encontrada entre *O. intercalaris* y *N. frontalis* para colonizar los tejidos vegetales puede relacionarse también con las diferencias morfológicas y estructurales de los hongos. Barr (1983) citado por Trinci *et al.*, (1994), considera que una mayor producción de esporangios y la reproducción por fragmentación del rizomicelio son características que le dan ventajas a los hongos policéntricos (*O. intercalaris*) sobre los monocéntricos (*N. frontalis*), los cuales únicamente pueden colonizar y aumentar la superficie de interacción con el tejido a través de las zoosporas liberadas, puesto que su ciclo de vida es dependiente de la formación de zoosporas. Por otro lado, se ha establecido que la capacidad de colonización de los hongos del rumen también puede estar asociada con el origen y procedencia de estos microorganismos. Gordon (1985), encontró que los aislados fungales provenientes de diferentes sitios de Australia tenían diferencias en su capacidad para degradar componentes de la fibra de heno de trigo hasta del 50%. Igualmente, Akin *et al.* (1989) encontraron que los hongos ruminales provenientes de bovinos en Australia y Estados Unidos presentaban diferencias en la colonización y degradación del mismo forraje. Estas diferencias en los morfotipos de los hongos encontrados en los diferentes inóculos, sugieren que cada hongo establece un nicho específico de crecimiento para cada dieta y animal, lo cual determina su capacidad de degradación y ataque. Estos reportes respaldan en parte los resultados obtenidos en este estudio, debido a que los hongos ruminales tienen una proceden-

cia completamente diferente. *N. frontalis* proviene de una oveja acostumbrada a alimentarse de un pasto succulento, suave y con un buen contenido nutricional como el *P. clandestinum*; mientras *O. intercalaris* proviene de un bovino criollo (Sanmartinero) acostumbrado a pastorear sobre praderas nativas, las cuales se caracterizan por ser materiales con altos contenidos de pared celular, altos contenidos de lignina, pobres en carbohidratos solubles, proteína cruda y con bajos contenidos de S.

En este estudio se encontró que la actividad xilanolítica extracelular de los hongos fue afectada por el tipo de gramínea en el cual crecieron los hongos y estos resultados son similares a lo encontrado por Barichievich y Calza, 1990; Yanke *et al.*, 1996 y Akin *et al.*, 1990. La producción de enzimas extracelulares con actividad xilanolítica es una característica común de los hongos ruminales. En general, se conoce que las xilanasas se producen en gran cantidad cuando los sustratos de crecimiento de los hongos ruminales contienen xilano y hemicelulosa, los cuales son componentes de la pared celular de las plantas (Wubah *et al.*, 1993; Yanke *et al.*, 1996; Bhat y Hazlewood, 2001). Sin embargo, la producción extracelular de xilanasas puede variar entre diferentes géneros de hongos ruminales en respuesta al mismo sustrato de crecimiento (Yanke *et al.*, 1996). Estos hallazgos previos coinciden con los resultados de este trabajo, en donde se encontró que *O. intercalaris* tuvo la actividad xilanolítica extracelular más alta sobre *B. decumbens* ($1.28 \mu\text{mol de xilosa}/\text{min}\cdot\text{mg}^{-1}$ de proteína) en comparación con los demás resultados (Tabla 4).

Es probable que las diferencias encontradas en producción de xilanasas en este trabajo se relacionen con los contenidos de xilano y hemicelulosa presentes en la pared celular de cada una de las gramíneas, como también, con el origen y procedencia de los hongos. Por otro lado, se determinó que la actividad celolítica extracelular determinada en el sobrenadante de los hongos ruminales varió con la interacción tipo de sustrato y azufre. La combinación de tipo de gramínea con una concentración de 4% de S incrementó la actividad celolítica de los hongos; mientras que una concentración mayor (12%) redujo a niveles basales o inhibió completamente la producción de enzimas celolíticas. Se ha sugerido que los hongos ruminales producen constitutivamente celulasas que

degradan la pared celular de las plantas (Wubah *et al.*, 1993; Yanke *et al.*, 1996; Bhat and Hazlewood, 2001); no obstante, se conoce muy poco acerca del efecto del S sobre la producción y actividad de las celulasas. En experimentos *in vitro* llevados a cabo por Stevani (1990) se encontró que la actividad endoglucanasa del rumen fue estimulada por la adición de azufre. De manera similar, Stevani y Durand (1989) citados por Stevani (1990) encontraron en experimentos *in vitro* (Rusitec) que la suplementación con azufre incrementó la degradación de hemicelulosa y celulosa, así como la producción de ácidos grasos de cadena corta en un 35%. Aunque no se conoce claramente el mecanismo de acción del S sobre la actividad degradativa de los hongos, es probable que constituya un elemento limitante en la acción fibrolítica de las enzimas producidas por la microbiota del rumen. Adicionalmente, en este trabajo se observó que la mayor actividad celulolítica de los hongos se determinó en el sobrenadante de *N. frontalis* sobre *B. decumbens*, resultados que contrastan con el bajo número de esporangios de este hongo sobre *P. clandestinum*. Esta situación disímil, puede ser explicada por la habilidad que poseen los hongos ruminales para producir enzimas celulolíticas tanto en su estado vegetativo (esporangio) como por las zoosporas (Mountfort and Asher, 1985; Williams and Orpin, 1987; Gerbi *et al.*, 1996). Williams and Orpin (1987) encontraron que las zoosporas de *Neocallimastix patriciarum* y *Piromyces communis* pueden producir constitutivamente enzimas celulolíticas. Por lo tanto, es probable suponer que la enzimas presente en el sobrenadante de *N. frontalis* sobre *B. decumbens* fueron producidas y liberadas por las zoosporas presentes en el inóculo adicionado al inicio del experimento.

Conclusiones

Los hongos ruminales *N. frontalis* y *O. intercalaris* tienen diferente capacidad de colonización como también difieren en su actividad celulolítica y xilanolítica extracelular; diferencias individuales contenidas en su genoma microbioal que mantiene un grado de variabilidad fenotípica que le permite hacer frente a condiciones contrastantes en los diferentes ecosistemas y sistemas de alimentación donde habitan los rumiantes.

Los hongos ruminales responden a la suplementación con azufre en forma

de sulfato de sodio, quizás por las deficiencias que presentan los forrajes tropicales, en donde, la adición de azufre puede modificar su actividad degradativa y fisiológica. La limitada capacidad de colonización del hongo *N. frontalis* sobre *B. decumbens* pudo estar influenciada por el status nutricional de las hojas de las gramíneas o por la inhabilidad del hongo para defenderse de la toxicidad de compuestos del tipo de ácidos fenólicos.

Los incrementos en actividad celulolítica extracelular de los hongos ruminales por la influencia del azufre ratifica la importancia de este elemento en la nutrición de rumiantes, ya que una limitada disponibilidad de azufre en los forrajes tropicales puede desencadenar un desequilibrio de nutrientes en el rumen.

BIBLIOGRAFÍA

- Akin, D.E. 1983. Rumen bacterial and fungal degradation of *Digitaria pentzii* grown with or without sulfur. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 738-748.
- Akin, D.E. 1987. Association of rumen fungi with various forage grasses. *Anim. Feed Sci. Tech.* 16: 273-285.
- Akin, D.E. y Rigsby, L.L. 1985. Influence of phenolic acids on rumen fungi. *Agron. J.* 77: 180-182.
- Akin, D.E., Gordon, G.L. y Rigsby, L.L. 1989. Comparative fiber degradation by mixed rumen fungi from Australian and U.S.A. cattle. *Anim. Feed Sci. Tech.* 23: 305-321.
- Akin, D.E. y Windham W.R. 1989. Influence of diet on rumen fungi. pp.75-81. *En: J.V. Nolan, R.A. Leng and D.I. Demeyer (eds.). The role of protozoa and fungi in ruminant digestion.* Armidale, Australia.
- Akin, D.E., Bonerman, W.S y Lyon, C.E. 1990. Degradation of leaf blades and stems by monocentric and polycentric isolates of ruminal fungi. *Anim. Feed Sci. Tech.* 31: 205-221.
- Association of Official Analytical Chemist. 1995. Official methods of analysis. 16th ed. A.O.A.C., Washington, pp. 14-125.
- Barichievich, E.M. y Calza, R.E. 1990. Media carbon induction of extracellular cellulose activities in *N. frontalis* isolate EB 188. *Curr. Microbiol.* 20: 265-271.
- Barr, D.J.S. 1983. The zoospore grouping of plant pathogens. *En: Zoospore Plant Pathogens (ed. S. T. Buczaki), Academic Press: London, pp. 161-192.*
- Bauchop, T. 1979. Rumen anaerobic fungi of cattle and sheep. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 148-158.
- Bhat, M.K y Hazlewood, G.P. 2001. Enzymology and other characteristics of cellulases and xylanases. Page 11. *En: Enzymes in Farm Animal Nutrition.* M. Bedford and G. Patridge, CABI Publishing, Oxon, UK.
- Gerbi, C., Bata, J., Breton, A. y Prensier, G. 1996. Glycoside and polysaccharide hydrolase activity of the rumen anaerobic fungus *Caecomyces communis* (*Sphaeromonas communis* SENSU ORPIN) at early and final stages of the developmental cycle. *Curr. Microbiol.* 32: 256-259.
- Goering, H.K. y Van Soest, P.J. 1970. Forage fibre analyses. U.S. Dept. Agric. Agriculture Handbook No. 379.
- Gordon, G.L.R., Gulati, S.K y Ashes, J.R. 1983. Influence of low-sulphur straw on anaerobic fungal numbers in a sheep rumen. *Proc. Nutr. Soc. Aust.* 8: 188.
- Gordon, G.L.R. 1985. The potential for manipulation of rumen fungi. *Rev. Rural Sci.* 6: 124-128.
- Gordon, G.L.R. y Phillips, M.W. 1998. The role of anaerobic gut fungi in ruminant. *Nutr. Res. Rev.* 11: 135-168.
- Grenet, E., Breton, A., Barry, P. y Fonty, G. 1989. Rumen anaerobic fungi and plant substrate colonization as affected by diet composition. *Anim. Feed Sci. Tech.* 26: 55-70.
- Hartley, R.D. 1985. Chemistry of lignocellulosic plant materials and non-microbial processes for increasing their food value for the ruminant, p 10-30. *En: Improved utilisation of lignocellulosic materials in animal feed.* Organization for Economic Cooperation and Development. Paris.
- Ho, Y. M. y Abdullah, N. 1999. The role of rumen fungi in fibre digestion. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 12 (1):104-112.
- Ho, Y. M. y Barr, D.J.S. 1995. Classification of anaerobic gut fungi from herbivores with emphasis on rumen fungi from Malasya. *Mycologia* 87:655-677.
- Ho, Y. M., Abdullah, N. y Jalaludin, S. 1988. Penetrating structure of anaerobic rumen fungi in cattle and swamp buffalo. *J. Gen. Microbiol.* 134:177-181.
- Li, J. y Heath, I.B. 1993. Chytridiomycetous gut fungi often overlooked contributors to herbivore digestion. *Can. J. Microbiol.* 39: 1003-1013.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L y Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Lowe, S.E., Theodorou, M., Trinci, P.J. y Hespell, R.B. 1985. Growth of anaerobic rumen fungi on defined and semi-defined media lacking rumen fluid. *J. Gen. Microbiol.* 131: 2225-2229.
- Lowe, S.E., Griffith, G.G., Milne, A., Theodorou, M y Trinci, P.J. 1987. The cycle and growth kinetics of an anaerobic rumen fungus. *J. Gen. Microbiol.* 133: 1815-1827.

- Mountfort, D.O y Asher, R.A. 1985.** Production and regulation of cellulase by two strains of the rumen anaerobic fungus *Neocallimastix frontalis*. Appl. Environ. Microbiol. 49: 1314-1322.
- Morrison, M., Murray, R.M., y Boniface, A.N. 1990.** Nutrient metabolism and rumen microorganisms in sheep fed a poor-quality tropical grass hay supplemented with sulphate. J. Agric. Sci. 115: 269-275.
- Orpin, C.G. 1977.** The rumen flagellate *Piromonas communis*: Its life-history and invasion of plant material in the rumen. J. Gen. Microbiol. 99: 107-117.
- Orpin, C.G y Greenwood, Y. 1986.** The role of haems and related compounds in the nutrition and zoosporogenesis of the rumen Chytridomycete *Neocallimastix frontalis* H8. J. Gen. Microbiol. 132: 2179-2185.
- Richards, G.N. 1976.** Search for factors other than "lignin-shielding" in protection of cell wall polysaccharides from digestion in the rumen, pp. 129-135. *En*: Carbohydrates research plants and animals. Miscellaneous paper No 12. Landbouwhogeschool Wageningen, The Netherlands.
- Somogy, M. 1952.** Notes on sugar determination. J. Biol. Chem. 195: 19-23.
- Stevani, J. 1990.** Etude *in vitro* du rôle du soufre dans l'orientation de l'activité fermentaire des micro-organismes du rumen de mouton et du gros intestin de porc. PhD Thèse Université Paris VII, Paris XI.
- Stevani, J. y Durand, M. 1989.** Effect of sulphur deficiency on fermentation of different carbohydrate sources in an artificial rumen (RUSITEC). Asian-Australasian J. Anim. Sci. 2: 388-389.
- Tabatabai, M.A. y Bremner, J.M. 1970.** A simple turbidimetric method of determining total sulphur in plant materials. J. Paper J6562. IOWA Agriculture and Home Economics Experiment Station, Ames IOWA 50010.
- Tanaka, H., Matsui, H., Ushida, K. y Kojima, Y. 1991.** Effect of coumaric acid on growth and cellulolytic activity of rumen fungi with or without methanogens. *En*: Proceeding of Third International Symposium on the Nutrition of Herbivores, p 35 [M.W Zahari, Z.A Tajaddin and H. K Wong, editors] Serdang, Selangor, Malaysia: Malaysia Society of Animal Production.
- Theodorou, M.K., Gascoyne, D.J., Akin, D.C y Hartley, R.D. 1987.** Effect of phenolic acids and phenolics from plant cell walls on rumenlike fermentation in consecutive batch culture. Appl. Environ. Microbiol. 53(5): 1046-1050.
- Trinci, A.P., Davis, D.R., Gull, K., Lawrence, M.L., Nielsen, B.B., Rickers, A. y Theodorou, M.K. 1994.** Anaerobic fungi in herbivorous animals. Mycol. Res. 98: 129:152.
- Wang, Y., McAllister, T.A., Yanke, L.J. y Cheeke, P.R. 2000.** Effect of steroidal saponin from *Yucca schidigera* extract on ruminal microbe. J. Appl. Microbiol. 88: 887-896.
- Williams, A.G. and Orpin, C.G. 1987.** Glycoside hydrolase enzymes present in the zoospore and vegetative growth stages of the rumen fungi *Neocallimastix patriciarum*, *Piromonas communis* and an unidentified isolate grown on a range of carbohydrate substrate. Can. J. Microbiol. 33: 427-434.
- Wilson, J.R. 1994.** Cell wall characteristics in relation to forage digestion by ruminants. J. Agric. Sci. 122: 173-182.
- Wubah, D.A., Akin, D. and Bonerman, W.S. 1993.** Biology, fiber-digestion, and enzymology of anaerobic zoospore fungi. Crit. Rev. Microbiol. 19(2): 99-115.
- Yanke, L.J., Selinger, L.B., Lynn, J. R and Cheng J. K. 1996.** Comparison of the influence carbon substrates on the fibrolytic activities of anaerobic rumen fungi. Anaerobe 2: 373-378.