

Efecto del Fibrozyme® en la degradabilidad y la cinética de degradación de la paja de garbanzo (*Cicer arietinum*)

Effect of Fibrozyme® on degradability and degradation kinetics of chickpea straw (*Cicer arietinum*)

Hugo de Jesús López-Inzunza¹
Bertha Bienvenida Chongo-García²
Orestes La O-León³
Juan Eulogio Guerra-Liera⁴
Hugo López-López⁵
Maribel Luna-López⁶
Luciano Abelino López-Juárez⁷
Samuel Jesús Castro-Camacho⁸

Fecha de recepción: 2 de enero de 2018
Fecha de aprobación: 7 de mayo de 2018

DOI: <http://doi.org/10.19053/01228420.v15.n2.2018.8391>

Resumen

Se realizó un experimento con la finalidad de estudiar un complejo de enzimas fibrolíticas exógenas (Fibrozyme®) sobre los parámetros de degradabilidad ruminal *in situ* y la cinética de degradación de la materia seca (MS) de la paja de garbanzo (*Cicer arietinum*). Se utilizaron dos toros suizos (700 kg PV) con cánula ruminal, en un diseño de bloques al azar, donde cada animal constituyó un bloque. Se evaluaron tres niveles de enzima (0, 1 y 2 g Fibrozyme® kg forraje⁻¹ MS). Se colocaron bolsas nailon a cinco tiempos de incubación (6, 12, 24, 48 y 72 h). Los resultados demuestran que la inclusión de 2 g Fibrozyme® kg⁻¹ MS mejora la digestibilidad *in situ* de la materia seca en paja de garbanzo ($P < 0.05$) para todas las horas incubadas, así como los parámetros de la cinética de degradación. Se concluye que el Fibrozyme® evalua-

1 Universidad Autónoma de Sinaloa (Culiacán de Rosales-Sinaloa, México).

2 Ph. D. Instituto de Ciencia Animal (Mayabeque, Cuba). bchongo@ica.co.cu.

3 Ph. D. Instituto de Ciencia Animal (Mayabeque, Cuba). olao@ica.co.cu.

4 Ph. D. Universidad Autónoma de Sinaloa (Culiacán de Rosales, Sinaloa, México).

5 Universidad Autónoma de Sinaloa (Culiacán de Rosales, Sinaloa, México).

6 Universidad Autónoma de Sinaloa (Culiacán de Rosales, Sinaloa, México). maribelluna@uas.edu.mx.

7 Universidad Autónoma de Sinaloa (Culiacán de Rosales, Sinaloa, México).

8 Universidad Autónoma de Sinaloa (Culiacán de Rosales, Sinaloa, México).



do en una dosis de 2 g kg⁻¹ forraje MS mejoró la cinética de degradación y la degradabilidad ruminal *in situ* de la MS del esquilmo agrícola evaluado.

Palabras clave: degradabilidad *in situ*; fibrozyme; paja de garbanzo; rumiantes.

Abstract

This research aimed at studying the effect of a complex of exogenous fibrolytic enzymes (Fibrozyme®) on the *in situ* ruminal degradability parameters and degradation kinetics of dry matter (DM) of the chickpea (*Cicer arietinum*) straw. For the experiment, we used two cannulated Swiss bulls (700 kg PV), in a randomized block design, where each animal represented a block. We evaluated three enzyme levels (0, 1, and 2 g Fibrozyme® kg forage⁻¹ DM), and put nylon bags at five different incubation times (6, 12, 24, 48, and 72 h). The results showed that including 2 g of Fibrozyme® kg⁻¹ DM improves *in situ* digestibility of dry matter of chickpea straw ($P < 0.05$) for all incubation times, as well as the degradation kinetics parameters. We conclude that 2 g kg⁻¹ forage DM of the studied Fibrozyme® improves the *in situ* degradation kinetics and ruminal degradability of DM of the evaluated farm residue.

Keywords: chickpea straw; fibrozyme; *in situ* degradability; ruminant.

Para citar este artículo:

López-Inzunza HJ., Chongo-García BB., O-León O., Guerra-Liera JE., López-López H., Luna-López M., López-Juárez LA., Castro-Camacho SJ. Efecto del Fibrozyme® en la degradabilidad y la cinética de degradación de la paja de garbanzo (*Cicer arietinum*). *Ciencia y Agricultura*. 2018; 15(2): 7-13.

I. Introducción

Uno de los mayores retos de los nutricionistas agropecuarios es encontrar estrategias sostenibles de alimentación para los rumiantes, y para ello es necesario llevar a cabo estudios fisiológicos que permitan entender mejor los procesos digestivos del animal (1). En diferentes regiones de México, los esquilmos agrícolas son una fuente de energía abundante y barata para los rumiantes, pero su aporte nutricional es insuficiente, debido a su poco valor alimenticio, su baja digestibilidad y estado de lignificación (2), por lo que se ha intentado mejorar su digestibilidad a través de procesos físicos, químicos y biológicos o mediante aditivos, como las enzimas (3).

Los métodos físicos y químicos que se han desarrollado mejoran la degradabilidad, sin embargo, su aplicación no es recomendable debido a los costos y al riesgo de corrosión, toxicidad y contaminación ambiental. Ante esta situación, las enzimas son una alternativa para aprovechar los nutrientes de los esquilmos.

Los componentes primarios de la pared celular son la celulosa y la hemicelulosa, que son degradadas por las enzimas de bacterias y protozoos ruminales (4). Aunque este proceso es eficiente, se buscan métodos que mejoren la digestión de la fibra por el ganado, como la adición de celulasas y xilanasas que complementen la actividad celulolítica de las bacterias ruminales (5). Es así como la suplementación con enzimas, a pesar de la incertidumbre e inconsistencia de los resultados obtenidos hasta hoy, se presenta como una de las alternativas biotecnológicas capaces de contribuir a estimular los complejos mecanismos de degradación de la pared celular de los forrajes.

El uso de enzimas ha sido evaluado en forrajes de buena calidad, como la alfalfa (*Medicago sativa*), o en cereales con un contenido regular de fibra; pero, los estudios con esquilmos agrícolas son aún insuficientes. Además, el conocimiento de la degradabilidad y su cinética son fundamentales para establecer el valor nutritivo y, por tanto, para la formulación de raciones para rumiantes. De ahí que el presente experimento tuvo como objetivo estudiar el efecto de diferentes niveles de Fibrozyme® en la degradabi-

lidad ruminal *in situ* y en la cinética de degradación de la MS del esquilmo agrícola de la paja de garbanzo, para la alimentación de rumiantes.

II. Materiales y métodos

La investigación se realizó en la posta zootécnica y el laboratorio de bromatología y nutrición animal de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Sinaloa, México, localizada en el municipio Culiacán, en el km 17.5 de la carretera Culiacán-El Dorado, con longitud 107° 24´ y latitud 24° 49´ norte, una altura de 62 m. s. n. m. y temperatura media anual de 24.9 °C (la mínima en enero, con 19.4 °C, y la máxima en mayo, con 29.3 °C). El clima es cálido y semiseco, con precipitación anual de 671.7 mm (agosto con el mayor índice, 203.1 mm, y mayo con el menor, 1.6 mm) (6).

A. Tratamientos

Los tratamientos fueron tres niveles de enzima: 0, 1 y 2 g de Fibrozyme® kg⁻¹ forraje MS, seleccionados de acuerdo con las recomendaciones del fabricante; en un diseño con tres tratamientos, descritos en la Tabla I.

Tabla I. Diseño de los tratamientos experimentales.

Esquilmo	Niveles de Fibrozyme® (g kg ⁻¹ MS)
<i>C. arietinum</i>	0
	1
	2

B. Colección y procesamiento de las muestras

Para estudiar la degradabilidad ruminal *in situ* de la MS se utilizaron las muestras del esquilmo agrícola de *C. arietinum* procedentes de la Unión Ganadera Regional de Sinaloa (UGRS). Las muestras recolectadas se homogeneizaron para obtener un pool de muestra representativo. El material se secó en estufas de aire forzado a 60 °C durante 48 h; luego, se molió a un tamaño de partícula 2 mm y se utilizó para la prueba de degradabilidad de la MS.

C. Degradabilidad ruminal *in situ*

La determinación de la degradabilidad ruminal de la MS del material vegetal se realizó según el procedimiento de las bolsas nailon, o *in situ*, descrito por Mehrez y Orskov (7).

En todos los casos se pesaron 5 g de muestra, con un tamaño de partícula de 2 mm por bolsa de nailon (con 15 cm de largo por 7.5 cm de ancho de dimensiones internas y 52 micrones (μm) de porosidad), previamente taradas e identificadas. Las bolsas se cerraron y se introdujeron en el saco ventral del rumen; posteriormente, se extrajeron, a las 6, 12, 24, 48 y 72 h de incubación. Las bolsas, cuando se retiraron del rumen, se lavaron por fuera con agua corriente hasta que salieran limpias. Para determinar la fracción soluble en los casos en que se realizó, se utilizó el procedimiento descrito por Pedraza (8), en el que se pesaron 2 g de muestra de MS conocida y se colocaron en un beaker con 150 ml de agua destilada a temperatura (T) ambiente (20-25 °C) durante 105 minutos, con agitación sistemática. La solución se filtró a través de un papel de filtro Whatman N. ° 1 (15 cm de diámetro) y se lavó el residuo con agua destilada hasta que se recogieron 500 ml del filtrado. El papel de filtro con el residuo insoluble, junto con el resto de las bolsas de los diferentes horarios de incubación, se colocaron en bandejas de aluminio y se secaron en estufas de aire forzado a 60 °C durante 48 h; después se transfirieron a una desecadora y se pesaron. La diferencia entre el peso inicial de la muestra colocada en las bolsas de nailon y el peso de los residuos después de la incubación ruminal se utilizó para determinar la materia seca degradada en el rumen.

D. Cinética de degradación

Para estimar los parámetros de la cinética de degradación se utilizó el modelo no lineal propuesto por McDonald (9), por presentar la fase de colonización (Lag o lag) de la fibra por los microorganismos, $P = a + b * (1 - e^{-c*(t-t_0)})$, para $t > t_0$.

Donde:

P: Degradabilidad ruminal. Es la degradación ruminal del indicador evaluado en el tiempo "t" de permanencia en el rumen.

a: Fracción soluble

b: Fracción que se degrada en el tiempo t

e: Base de los logaritmos naturales

c: Tasa de degradación de la fracción "b"

t: Tiempo de incubación, h

Lag: fase de colonización o lag (h). Tiempo que emplean los microorganismos del rumen para colonizar las paredes celulares de los forrajes y adherirse a ellas.

E. Análisis bromatológico

Los análisis correspondientes a Materia Seca Aparente (MSA, desecado a 60 °C por 48 h), Materia Seca Residual (MSR, desecado a 105 °C por 24 h), Ceniza (C), Materia Orgánica (MO) y Proteína Bruta (PB) se determinaron por AOAC (10); los de la FDN, la FDA, la hemicelulosa (HEMI) y el contenido celular (CC), por Goering y Van Soest (11). Los análisis bromatológicos se realizaron en el Laboratorio de Bromatología y Nutrición Animal de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Sinaloa (FAUAS).

F. Procesamiento estadístico

Para los parámetros de cinética de degradabilidad, los resultados se procesaron por el programa Neway para microcomputadoras, con soporte Microsoft Excel sobre Windows®, el cual permite fijar dichos parámetros de los modelos no lineales utilizados (12). Los datos fueron analizados mediante el software estadístico InfoStat (13), y las medias se compararon con la prueba de Duncan para $P < 0.05$ (14).

III. Resultados y discusión

Los resultados presentados en la Tabla II muestran la composición bromatológica de la paja de garbanzo. Los contenidos de nutrientes de este esquilmo están dentro del rango de valores previos

que se reportan para estos subproductos (15). Sin embargo, difieren de los obtenidos por Meneses *et al.* (16) al estudiar la composición nutricional de los rastrojos. Los resultados variables pudieran deberse principalmente a factores tales como el tipo de planta, la especie y la variedad, la porción hoja-tallo seleccionada, la aplicación de fertilizantes, la calidad del suelo, el riego, las enfermedades de las plantas, el grado de madurez, el manejo y las condiciones de almacenamiento, entre otros (17).

Tabla II. Composición bromatológica (%) de la paja de garbanzo.

VARIABLES	%
Materia seca	91.54
Proteína	5.49
Fibra detergente neutro	68.38
Fibra detergente ácido	42.85
Hemicelulosa	25.54
Contenido celular	31.60
Cenizas	6.41

Al analizar el comportamiento de la cinética y los parámetros de degradabilidad se observa que el Fibrozyme® mejoró la degradación *in situ* de la MS del esquilmo agrícola en estudio. En cuanto al efecto del Fibrozyme® en la paja de garbanzo, en general, mejora la DISMS, con diferencias significativas a favor de T2 en todos los horarios de muestreo. El aumento de la degradabilidad ruminal de la MS obtenido con la suplementación enzimática con Fibrozyme® se relacionan con lo planteado por Díaz (18) acerca del efecto positivo de la suplementación de las dietas de rumiantes con enzimas exógenas en el aumento de la eficiencia de utilización del alimento y el incremento del número de bacterias celulolíticas.

Asimismo, esto puede indicar que el uso de la enzima incrementa la actividad fibrolítica a consecuencia de un aumento bacteriano (19) y la mejora de la capacidad de hidrólisis ruminal, debido a la adición de la actividad de las enzimas y su sinergia con las enzimas microbianas ruminales (20, 21), con incremento de la población de bacterias fibrolíticas (22).

Con respecto a las características de la cinética de degradación ruminal, se observa que el esquilmo estudiado tiene en su MS una fracción soluble (a), que es superior en el tratamiento con el mayor nivel de Fibrozyme®, mientras que el tratamiento control fue el inferior. El alto contenido de esta fracción en el tratamiento donde se utilizó 2 g de Fibrozyme® kg⁻¹ forraje MS pudiera estar dado por la solubilidad causada por el actuar de la enzima en los componentes estructurales de los esquilmos.

Es posible también que se haya presentado un efecto sinérgico entre la acción enzimática del preparado y las enzimas ruminales que pudiese haber favorecido, por una parte, el acceso de la enzima a su sustrato y, por otra, la degradación de la parte interna de la pared, liberando el contenido celular. Al respecto, Van Soest (23) menciona que el contenido celular es el material no lignificado fácilmente solubilizado en detergente neutro, que constituye la parte más disponible del forraje para el animal y que está compuesto por lípidos, azúcares, ácidos orgánicos, nitrógeno no proteico, proteína soluble y pectinas.

La fracción degradable si el tiempo no es limitante (b) aumentó con la inclusión de Fibrozyme®; esta fue superior en el tratamiento con mayor nivel de la enzima, lo cual pudiera estar relacionado en gran medida con la penetración de las enzimas a la fracción fibrosa de la pared celular (carbohidratos estructurales), dando como resultado la degradación y fraccionamiento del complejo lignocelulósico (24) en carbohidratos más simples y potencialmente más aprovechables por los rumiantes, con el consiguiente aumento del potencial de degradabilidad ruminal (a + b) y de la tasa de degradación (c).

Un aspecto interesante relacionado con este último parámetro es que, según Sampaio (25), las tasas de degradación inferiores a 2 % h⁻¹ son características de alimentos de baja calidad, que necesitan mayor tiempo de permanencia en el rumen para su degradación.

Tabla III. Degradación ruminal *in situ* de la MS del esquilmo agrícola tratado con diferentes niveles de Fibrozyme®

Tratamiento	Tiempo de incubación (h)				
	6	12	24	48	72
TC	21.11 ^a	27.50 ^a	34.77 ^a	41.17 ^a	46.06 ^a
T1	22.77 ^b	27.61 ^a	34.50 ^a	42.72 ^b	49.50 ^b
T2	27.33 ^c	32.83 ^b	36.55 ^b	45.83 ^c	60.44 ^c

*Medias con letra distinta son diferentes (P < 0.05)

Tabla IV. Cinética de degradación ruminal *in situ* de la MS en el esquilmo agrícola de garbanzo tratado con diferentes niveles de Fibrozyme®. DS: Desviación estándar.

Esquilmo	Dosis de enzima	Parámetros					
		Fracción soluble (a%)	Fracción degradable si el tiempo no es limitante (b%)	Potencial de degradabilidad ruminal (a + b%)	Tasa de degradación ruminal (c%/h)	Fase Lag (h)	DS
Garbanzo	0	11.88	41.33	53.21	0.05	1.35	0.51
	1	11.93	45.00	56.93	0.06	1.28	0.56
	2	16.99	50.01	67.00	0.08	1.19	0.43

IV. Conclusiones

Hubo una disminución de la fase lag con el incremento del nivel de Fibrozyme®, la cual, a su vez, se relaciona con el incremento de la tasa de degradación (c). El argumento para la explicación de estos efectos positivos está relacionado con el posible beneficio de la adición de las polisacaridasas extracelulares, que da como resultado un ataque inmediato del material vegetal que se va a consumir, proporcionando con ello mayor disponibilidad de carbohidratos que estimula el crecimiento y la actividad microbiana, con disminución, por tanto, de la fase lag (26). A lo que se añade el efecto del Fibrozyme® en la ruptura de los constituyentes de la pared celular, lo cual permite una mayor superficie de exposición de la fibra a los microorganismos ruminales, con la consecuente reducción de la fase lag.

Según Callaway y Martin (27), la estimulación de la degradación de la celulosa se asocia con la disminución en el tiempo de latencia o colonización, lo que resulta en un incremento inicial de la tasa

de digestión por los microorganismos ruminales. Dawson y Tricarico (28) encontraron que el Fibrozyme® incrementa la tasa de desaparición de la FDN, haciendo disponibles los componentes de la fibra de la pared celular al ataque de los microorganismos del rumen, reduciendo así la fase lag.

Se concluye que el Fibrozyme®, en una dosis de 2 g kg⁻¹ forraje MS, mejoró la cinética de digestión y la degradabilidad ruminal *in situ* de la MS del esquilmo agrícola.

Referencias

- (1) López JR. Efecto de la suplementación con concentrado en indicadores de la fisiología digestiva y consumo de nutrientes en bucerros (*Bubalus bubalis*) alimentados con pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*). Tesis de Doctorado. Instituto de Ciencia Animal, La Habana, Cuba. 2009.
- (2) Fuentes J., Magaña C., Suárez L., Peña R., Rodríguez S., Ortiz B. Análisis químico y digestibilidad "in vitro" de rastrojo de maíz (*Z. mays L.*). *Agronomía Mesoamericana*; 2001; 12(2): 189-192.
- (3) Coronel U., Ortega M., Mendoza G., Sánchez T., Ayala J, Becerril C. Effect of two strains of *S. cerevisiae* on productive performance of heifers. En: *Nutrition Society*, England, Jul. 2001.

- (4) Chalupa W. Chemical control of rumen microbial metabolism. En: 5th *International Symposium on Ruminant Physiology*, England, 1979. pp. 325-347.
- (5) Feng P., Hunt C., Pritchard GT., Julien WE. Effect of enzyme preparations on *in situ* and *in vitro* degradation and *in vivo* digestive characteristics of mature cool-season grass forage in beef steers. *J. Anim. Sci.* 1996; 74: 1349-1357. DOI: <https://doi.org/10.2527/1996.7461349x>.
- (6) García E. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana). Offset Larios S.A. México D.F. 1988.
- (7) Mehrez AZ., Ørskov ER. A study of the artificial bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. *J. Agric. Sci.* 1977; 88: 645-650. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0021859600037321>.
- (8) Pedraza RM. Valoración nutritiva del follaje de *Gliricidia sepium* (Jacq.) kunth ex walp y su efecto en el ambiente ruminal. Tesis Doctor en Ciencias Veterinarias. Instituto de Ciencia Animal. La Habana, Cuba; 2000.
- (9) McDonald IM. A revised model for the estimation of protein degradability in the rumen. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*. 1981; 92: 499-501. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0021859600032081>.
- (10) Association of Official Analytical Chemists (AOAC). *Official Methods of Analysis*, 16th Edition, 5th revisión. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA. 2005.
- (11) Goering HK., Van S. Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). *Agricultural Handbook No. 379*. ARS-USDA. Washington, D. C. 20 p. 1970.
- (12) Chen B. NEWAY Excel. An excel application program for processing feed degradability data. Rowett Research Institute. Bucksburn. Reino Unido. 1997.
- (13) Di Rienzo JA., Casanoves F., Balzarini MG., González L., Tablada M., Robledo CW. InfoStat versión 2012. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. DOI: <https://doi.org/10.2307/3001478>.
- (14) Duncan DB. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics*, 1955; 11: 1.
- (15) Sánchez AE., Ortega CME., Mendoza MG., Montañez VO., Buntinx DSE. Rastrojo de maíz tratado con urea y metionina. *Inter-ciencia*. 2012; 37(5): 395-399.
- (16) Meneses M. Villegas M., González S, Miranda L., Loera O. Estudio de la composición nutrimental de paja de sorgo tratada con *Trametes sp.* EUM1 y *Pleurotus sapidus*. In: Memorias del XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Guerrero, México. CD. 2009.
- (17) Kafizadeh F, Maleki E. Composición química, digestibilidad *in vitro* y producción de paja de diferentes variedades y accesiones de garbanzo. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 2011.
- (18) Díaz A. Estrategias para mejorar el valor nutritivo de los forrajes en producción convencional y ecológica. Tesis de doctorado. Universidad de León, España. 2017.
- (19) Giraldo LA., Tejido ML., Ranilla MJ., Ramos S., Carro MD. Influence of direct-fed fibrolytic enzymes on diet digestibility and ruminal activity in sheep fed a grass hay-based diet. *J. Anim. Sci.* 2008; 86: 1617-1623. DOI: <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0343>.
- (20) Newbold J. Proposed mechanisms for enzymes as modifiers of ruminal fermentation. In *Proceedings of the 8th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium*, Gainesville, Florida, USA, pp. 146-159. 1997.
- (21) Morgavi DP., Beauchemin KA., Nsereko VL., Rode LM., Iwawasa AD., Yang WZ., McAllister TA., Wang Y. Synergy between the ruminal fibrolytic enzymes and enzymes from *T. longibrachiatum*. *J. Dairy Sci.* 2000; 83: 1310-1321. DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(00\)74997-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)74997-6).
- (22) Tirado G. Efecto de preparaciones enzimáticas y aditivos químicos sobre la digestibilidad del rastrojo de maíz *in vitro* e *in vivo*. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, México; 2011.
- (23) Van Soest PJ. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. O and Brooks, Inc., Corvallis, OR. 374 p. 1982.
- (24) Eun JS., Beauchemin KA. Assesment of the efficacy of varying experimental exogenous fibrolytic enzymes using *in vitro* fermentation characteristics. *Animal Feed Science and Technology*. 2007; 132: 298-315. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeeds-ci.2006.02.014>.
- (25) Sampaio IBM. Experimental desings and modelling techniques in the study of roughage degradation in the rumen and growth ruminants. PhD. Thesis. University of Reading. U. K. 200 pp. 1988.
- (26) González E. Utilización de enzimas fibrolíticas en cabras lecheras. Evaluación de su actividad y características fermentativas *in vitro*. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona. 2004.
- (27) Callaway ES., Martin SH. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* culture on ruminal bacterial that utilize lactate and digest cellulose. *J. Dairy Sci.* 1997; 80: 2035. DOI: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76148-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76148-4).
- (28) Dawson KAM., Tricarico, JM. The exogenous fibrolytic enzymes to enhance microbial activities in the rumen and the performance of ruminant animals. En: *Fifteenth Annual Symposium*, Nothingham, Loughborough, 1999.

