

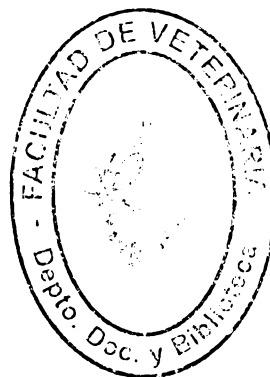
**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**“SUPLEMENTACIÓN DE PASTURA TEMPLADA DE ALTA CALIDAD CON  
DIFERENTES NIVELES DE CEBADA, MAÍZ O PULPA DE CITRUS: EFECTO  
SOBRE LA PRODUCCIÓN DE GAS *IN VITRO*”**

por

**Nicolle POMIÉS FIGUEROA**



**TESIS DE GRADO presentada como uno de los  
requisitos para obtener el título de Doctor en  
Ciencias Veterinarias**

**ORIENTACIÓN: Higiene, inspección, control y  
tecnología de los alimentos de origen animal.**

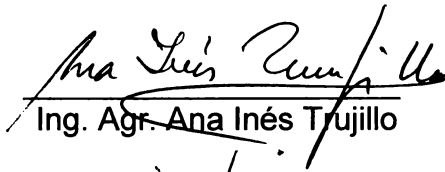
**MODALIDAD Ensayo Experimental**

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2011**

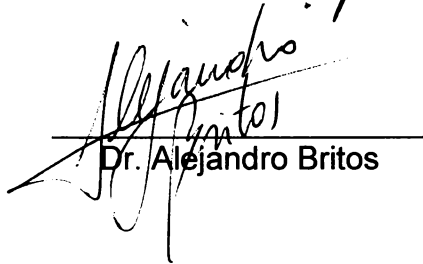


**PÁGINA DE APROBACIÓN:**

Presidente de Mesa:

  
Ing. Agr. Ana Inés Trujillo

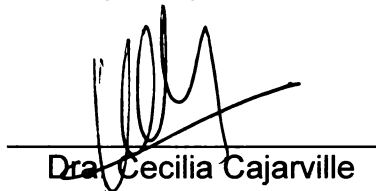
Segundo Miembro (Tutor):

  
Dr. Alejandro Britos

Tercer Miembro:

\_\_\_\_\_  
Ing. Agr. Alejandro Mendoza

Co-tutor:

  
Dra. Cecilia Cajarville

Autor:

  
Nicolle Pomiés

Fecha:

4 de marzo de 2011

FACULTAD DE VETERINARIA

Aprobado con 12 (doce) vot

## **AGRADECIMIENTOS:**

A mis padres y hermanos por su apoyo e incentivo continuo.

A Alejandro y Cecilia por haberme dado la oportunidad de hacer mi trabajo final y su paciencia en todo este tiempo.

A los demás integrantes del departamento de Nutrición Animal, Analía y Sebastián por su apoyo en diferentes etapas del trabajo.

A mis amigas, amigos, compañeras y compañeros de facultad por los momentos vividos en todos estos años.

A Maximiliano, por su apoyo incondicional y estar siempre.

## TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN:.....	II
AGRADECIMIENTOS:.....	III
TABLA DE CONTENIDO .....	IV
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	V
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VI
1. RESUMEN .....	1
2. SUMMARY.....	2
3. INTRODUCCIÓN .....	3
4. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA.....	4
4.1. DIGESTIÓN RUMINAL .....	4
4.2. PASTURAS TEMPLADAS DE ALTA CALIDAD.....	7
4.3. SUPLEMENTACIÓN.....	8
4.4 SUPLEMENTACIÓN CON PULPA DE CITRUS.....	10
4.5. PRODUCCIÓN DE GAS <i>IN VITRO</i> .....	13
4.5.1. Alcances y Usos de la técnica de producción de gas <i>in vitro</i> .....	13
4.5.2. Análisis de los Resultados Obtenidos a partir de la Técnica de Producción de gas <i>in vitro</i> .....	14
5. HIPÓTESIS.....	16
6. OBJETIVOS.....	16
6.1. OBJETIVO GENERAL.....	16
6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
7.1 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	17
7.2. DETERMINACIONES Y TÉCNICAS.....	18
7.2.1. Producción de gas <i>in vitro</i> .....	18
7.3. ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA:.....	20
7.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS:.....	20
8. RESULTADOS.....	21
9. DISCUSIÓN.....	25
9.1. PRODUCCIÓN POTENCIAL DE GAS POR GRAMO DE MATERIA SECA INCUBADA (a).....	25
9.2. TASA FRACCIONAL DE PRODUCCIÓN DE GAS (kd).....	27
9.3. TIEMPO DE RETARDO EN LA PRODUCCIÓN DE GAS (L).....	28
10. CONCLUSIONES.....	30
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31

## LISTA DE CUADROS Y FIGURAS



<b>Cuadro I.</b> Composición de las muestras según proporción de forraje (pastura templada de alta calidad) y 3 concentrados maíz, cebada y pulpa de citrus. ....	17
<b>Cuadro II.</b> Composición química de los alimentos, composición botánica y disponibilidad de la pastura.....	17
<b>Cuadro III.</b> Composición de las soluciones utilizadas en el medio de incubación para la producción de gas <i>in vitro</i> .....	19
<b>Cuadro IV.</b> Medias de los Parámetros de producción de gas <i>in vitro</i> obtenidos por el modelo exponencial simple con latencia de cada concentrado en diferentes niveles de inclusión. ....	21
<b>Figura 1.</b> Volumen total de gas producido (V ml/g MSincubada) en función del tiempo (h) obtenido por el modelo exponencial simple con latencia .....	15
<b>Figura 2.</b> Producción potencial de gas (a) en función del porcentaje de inclusión de cada concentrado.....	22
<b>Figura 3.</b> Tasa fraccional de producción de gas en función de la inclusión de cada suplemento.....	23
<b>Figura 4.</b> Tiempo de retardo en producción de gas en función de la inclusión de cada suplemento.....	24

## LISTA DE ABREVIATURAS

**a:** producción potencial de gas  
**AA:** aminoácidos  
**AGV:** ácidos grasos volátiles  
**C:** cebada  
**ENL:** energía neta de lactación  
**EEM:** error estándar de la media  
**F:** forraje  
**FAD:** fibra ácido detergente  
**FND:** fibra neutro detergente  
**Kd:** Tasa Fraccional de producción de gas  
**L:** tiempo de retardo en la producción de gas  
**Lag:** tiempo de retardo en la producción de gas  
**M:** maíz  
**ml/gMSi:** ml de gas/ g Materia seca incubada  
**MO:** materia orgánica  
**m.o:** microorganismos  
**MOD:** materia orgánica digestible  
**MS:** materia seca  
**MUN:** niveles de urea en leche  
**NDSC:** carbohidrato neutro detergente soluble  
**NDSF:** fibra neutro detergente soluble.  
**NH<sub>3</sub>:** amoníaco  
**P:** probabilidad  
**PB:** proteína bruta  
**PC:** pulpa de citrus  
**R<sup>2</sup>:** Coeficiente de determinación  
**RMSE:** raíz cuadrada del error cuadrático medio  
**t:** tiempo de incubación  
**V:** volumen total de gas producido

## 1. RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fue estimar la fermentescibilidad ruminal *in vitro* de muestras compuestas por diferentes proporciones de pastura templada de alta calidad y maíz, cebada o pulpa de citrus. Para la determinación de la producción de gas *in vitro* se conformaron muestras compuestas por el forraje y cada uno de los 3 concentrados en 9 proporciones distintas. Se evaluaron de esta forma cada uno de los alimentos y combinaciones de 0 a 100% de a 10% (n =31). Se utilizaron frascos de fermentación de 125 ml de capacidad, que se incubaron a 39° C con 0,5g de cada uno de los sustratos por triplicado. A cada frasco se le adicionó 38 ml de solución basal libre de N, 2 ml de solución buffer y 0.5 ml de solución reductora y 10 ml líquido ruminal. La presión de gas producido fue registrado a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 48, 72 y 96 h de incubación. Los resultados de producción de gas se ajustaron a un modelo exponencial simple:  $V = a (1 - e^{-kd \times (t - L)})$  mediante un procedimiento de regresión no lineal. Para los parámetros obtenidos de cada muestra compuesta por el forraje y los tres concentrados, se realizaron análisis de regresión en función del nivel de inclusión de concentrado. Se observó un aumento lineal de la producción potencial de gas (a), este aumento se produjo en los tres alimentos de igual forma. Para la tasa fraccional de producción de gas (kd) se observó una disminución a medida que aumentó el nivel de inclusión de concentrado pero la disminución del kd no fue de la misma magnitud para la inclusión de cada concentrado, presentando el maíz la mayor disminución de la pendiente. Se observó que a medida que aumenta el nivel de inclusión de maíz o cebada aumenta el tiempo de retardo en la producción de gas (L). En general, la inclusión de un concentrado fibroso como la pulpa de citrus produjo fenómenos similares, y en similar magnitud que la inclusión de concentrados almidonáceos.

## **2. SUMMARY**

The aim of this work was to estimate *in vitro* ruminal fermentescibility of mixtures composed of different proportions of high quality temperate pasture and corn grain, barley grain or citrus pulp. To determine *in vitro* gas production samples, were composed of forage and each one of the 3 supplements in 9 different proportions. This way, each feedstuff and their different combinations from 0 to 100% by 10% steps (n=31) were evaluated. 125 ml fermentation flasks were used to incubate 0,5 g of each substrates in triplicate at 39°C. To each fermentation flank, 38.5mL of N-free media, 2ml of buffer solution, 0,5 ml of reducing solution and ruminal fluid were added. Gas pressure was registered at 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 48, 72 y 96 h of incubation. The gas production results were adjusted to a simple exponential model:  $V = a (1 - e^{(-kd \times (t - L))})$  by nonlinear regression procedure. Regression analyses of each *in vitro* gas production parameter of substrates were performed according to the level of inclusion of concentrate. A lineal increment of the potential gas production (a) was observed for the 3 supplements in the same manner. The fractional rate of gas production (kd) was depressed as the level of supplement inclusion increased, however, the kd depression had not the same magnitude for each supplement, the corn inclusion a higher slope. It was observed that as the level of corn or barley inclusion increased, the lag time of gas production (L) increased too. In general, the inclusion of fibrous concentrate such as citrus pulp produced similar results to the inclusion of starchy concentrate.



### **3. INTRODUCCIÓN**

El país cuenta con un área terrestre total de 17,6 millones de ha, de las cuales 16,4 se dedican a distintos rubros agropecuarios. Cuenta con un stock bovino de 11.773.000 de cabezas de ganado bovino y 9.558.000 de ovinos (DIEA, 2009). Los forrajes que se cultivan en áreas templadas del mundo son los alimentos que más contribuyen a la producción mundial de alimentos provenientes de los rumiantes (Elizalde, 2003). En Uruguay existe 2.677.493 de ha de mejoramientos forrajeros siendo un 17,4% del total de la superficie destinada a pastoreo (DIEA, 2009). Se incluyen campos mejorados y fertilizados, praderas artificiales y cultivos forrajeros anuales (DIEA, 2009).

Los sistemas de producción animal en la región son básicamente pastoriles, con una dependencia estratégica de la suplementación de concentrados (Rearte y Santini, 1989) La alimentación con subproductos de la cosecha y el procesamiento de alimentos para el ganado es una práctica tan antigua como la domesticación de los animales por los humanos (Bampidis y Robinson, 2006). Los subproductos citrícolas son componentes importantes en los sistemas de alimentación de rumiantes de muchas áreas del mundo, y son comúnmente utilizados como fuentes de energía alimentaria (Bampidis y Robinson, 2006).

En Uruguay la producción de cítricos representa unas 16.146 ha de superficie efectiva (DIEA, 2009). Se producen anualmente unas 268.621 toneladas de cítricos de los cuales el 48% se exporta, el 39% se industrializa y el 13% se comercializa en el mercado interno (DIEA, 2009). La industrialización de la producción cítrica genera subproductos que pueden ser utilizados en la alimentación de rumiantes. La utilización de subproductos de la industria cítrica en la alimentación de rumiantes tiene dos ventajas importantes. En primer lugar, disminuye la dependencia del ganado al consumo de granos, de alto costo, los cuales también son utilizados en la alimentación de los seres humanos. En segundo lugar permite disminuir los costos de eliminación de estos residuos por parte de la industria (Grasser y col., 1995). Se debe considerar el crecimiento sostenido que tiene la industria alimenticia humana lo que va generando problemas con los desechos de su procesamiento. Es por ello que en diversas partes del mundo se han generado investigaciones sobre los efectos en la producción animal a partir del uso de los subproductos citrícolas en la alimentación de rumiantes (Fegeros y col., 1995; Grasser y col., 1995; Ariza y col., 2001; Barrios-Urdaneta y col., 2003; Delahoy y col., 2003; Henrique y col., 2003; 2004; Navamuel y col., 2002; Gehman y col., 2006).

Es importante también obtener datos de cómo influye la asociación de estos subproductos sobre la alimentación de rumiantes en base a pasturas templadas de alta calidad ya que existe escasa bibliografía sobre producción de gas *in vitro* en lo referente a suplementación con diferentes niveles de concentrado sobre pastura templada de alta calidad.

## **4. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA**

### **4.1. DIGESTIÓN RUMINAL**

La estrategia alimentaria de los rumiantes se basa en la simbiosis establecida entre los microorganismos ruminales (m.o.) y el huésped. En general la alimentación de los rumiantes se basa principalmente en forrajes, los cuales presentan en su composición altos porcentajes de polisacáridos como la celulosa. Los rumiantes poseen un sistema de fermentación microbiana de los alimentos previo a la acción de las propias enzimas digestivas (Owens y Goetsch, 1988; Beever y Mould, 2000; McDonald, 2006). Los m.o. utilizan parcialmente a los alimentos aportando productos de la fermentación ruminal con valor nutritivo para el rumiante, los ácidos grasos volátiles (AGV) y la proteína microbiana (Calsamiglia y Ferret, 2002). El grado y tipo de transformación de los alimentos en el rumen determina el rendimiento productivo del animal (Mackie y White, 1990).

La digestión en los rumiantes es el resultado neto de una secuencia de procesos que ocurren en diferentes segmentos del tracto gastrointestinal. Esta secuencia incluye: fermentación de los componentes de la dieta por los microorganismos en el retículo-rumen, la hidrólisis ácida y degradación enzimática en el abomaso e intestino, y la segunda fermentación en el ciego y en el intestino grueso (Merchen y col., 1997). La fermentación de alimentos en el rumen produce AGV de cadena corta principalmente acético, propiónico y butírico, así como también dióxido de carbono, metano, amoníaco, y en ocasiones ácido láctico (Mackie y White, 1990). Gran parte de los ácidos producidos se absorben directamente en el rumen, retículo y omaso, aunque cierta cantidad puede pasar al abomaso y absorberse en el intestino delgado. Algunos productos de la digestión de los carbohidratos son utilizados por los m.o. para formar sus propios polisacáridos celulares (McDonald, 2006).

El rumen proporciona un ambiente ideal para el mantenimiento de una población microbiana dinámica y a la vez estable (Kamra, 2005). Es dinámica ya que cambia considerablemente según las modificaciones de la dieta, adaptándose a los nuevos ingredientes alimenticios y es estable porque ingresan al rumen cotidianamente con el alimento, agua y aire millones de microorganismos y no se producen alteraciones en el ecosistema ruminal (Kamra, 2005). La microbiota ruminal se clasifica principalmente por el tipo de sustrato que utilizan y por los productos que generan en la fermentación. La dieta es el principal factor que influye sobre el número y proporciones relativas de las distintas especies que habitan el rumen (Yokohama y Johnson, 1988). Las dietas a base de forraje, ricas en celulosa y con un contenido intermedio en azúcares solubles estimulan la acción de bacterias celulolíticas y sacarolíticas y las dietas ricas en almidón aumentan la actividad de las bacterias amilolíticas (Owens y Goetsch, 1988). Las bacterias celulolíticas que degradan carbohidratos estructurales tienen bajos requerimientos de mantenimiento, crecimiento lento, y utilizan  $\text{NH}_3$  como principal fuente de N, mientras que las bacterias amilolíticas que degradan carbohidratos no estructurales, tienen mayores requerimientos de mantenimiento, rápido crecimiento, utilizan  $\text{NH}_3$ , péptidos, y AA como fuentes de N (Bach y col., 2005).

Diversas características del retículo-rumen proporcionan un sistema de cultivo continuo para la microbiota (McDonald, 2006). Una de ellas es la capacidad de mantener un pH normal en el rumen que oscile entre 6,2 y 7,0. De todos los factores del medio ruminal, el pH es el más susceptible a variación (Calsamiglia y Ferret, 2002; Kamra, 2005). Esta variación resulta del equilibrio entre la producción de ácidos en la fermentación, la rapidez de absorción de los mismos y el aporte de fosfatos y bicarbonatos provenientes de la saliva que actúan como tampones (McDonald, 2006). Otra característica del medio ruminal es tener una temperatura estable entre 38 y 42°C, debido al metabolismo corporal y al calor generado por la propia fermentación ruminal. La humedad es otra característica fundamental del retículo-rumen debido a la gran cantidad de agua libre proveniente del agua de bebida, salivación y alimentación. A su vez, mantiene un ambiente de anaerobiosis como consecuencia del rápido consumo de oxígeno que ingresa al rumen (McDonald, 2006).

Las condiciones ruminales ideales para la degradación ruminal de carbohidratos estructurales y la síntesis de proteína microbiana están caracterizadas por un pH entre 6,7 - 6,8, una concentración de  $\text{NH}_3$  de al menos 5-8 mg/dl y de AGV de 75-90 mMol/l, con una relación acético/propiónico de 3,5/1 (Rearte, 1992; Van Soest, 1994). Además, para la óptima fermentación ruminal de los alimentos es necesario un tiempo de permanencia de éstos en el órgano suficiente como para asegurar la degradación de las paredes celulares vegetales por los microorganismos, los cuales deben recibir aportes equilibrados de N y energía en forma de carbohidratos (Calsamiglia y Ferret, 2002).

Los carbohidratos, las proteínas y los lípidos de los alimentos suelen ser polímeros que deben ser divididos hasta formas monómeras para su fermentación o absorción (Owens y Goetsch, 1988). Las proteínas de los alimentos son hidrolizadas por los microorganismos del rumen hasta péptidos y aminoácidos, algunos pueden degradarse hasta ácidos orgánicos,  $\text{NH}_3$  y dióxido de carbono. El  $\text{NH}_3$  producido es utilizado por los m.o. para sintetizar proteína microbiana. La proteína microbiana producida en el rumen es una fuente importante de aminoácidos para el animal hospedador (Strobel y Russell, 1986), ya que las bacterias ruminales pueden sintetizar todos los aminoácidos esenciales y no esenciales, de modo que el rumiante obtiene estos últimos independientemente de su presencia en el alimento (McDonald, 2006). Sin embargo la síntesis de aminoácidos por los m.o. no es suficiente para cubrir las necesidades de aminoácidos para las producciones elevadas. Los niveles de producción pueden ser aumentados proporcionando aminoácidos esenciales adicionales en una región post ruminal (Owens y Goetsch, 1988).

Los carbohidratos de la dieta se dividen en monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos como el almidón, celulosa, hemicelulosas y pectinas (McDonald, 2006). Los polisacáridos estructurales representan la mayor parte de la pared celular de los vegetales, la celulosa es el polisacárido estructural que más abunda en la naturaleza. Las membranas de las células vegetales contienen compuestos íntimamente asociados como la hemicelulosa, que son menos resistentes que la celulosa a la acción de los ácidos. Las pectinas son carbohidratos que forman parte de la membrana celular, sin embargo tras la extracción del material vegetal con solución neutro detergente, las pectinas son solubilizadas y forman parte de la fracción soluble de la célula (Fahey y Berger, 1988).

Según el sistema de detergentes propuesto por Van Soest (1982), los carbohidratos se pueden clasificar en solubles en detergente neutro y en fibra neutro detergente. Dentro del grupo de los solubles se encuentran el almidón, las pectinas, azúcares y carbohidratos solubles y dentro de la FDN o pared celular está la celulosa, hemicelulosa y lignina. La hemicelulosa es soluble en detergente ácido y la celulosa y la lignina son insolubles en detergente ácido y conforman la fracción denominada FDA. La fracción hidratos de carbono soluble en detergente neutro (NDSC) se caracteriza por ser una fuente de energía rápidamente disponible que favorece el crecimiento microbiano ruminal (Van Soest, 1994; Ariza y col., 2001). La fracción NDSC incluye ácidos orgánicos, azúcares simples, oligosacáridos, almidones, fructanos, materias pécticas, y los (1-3) (1-4) -  $\beta$ -glucanos (Van Soest y col., 1991). A pesar de que las pectinas y los (1-3) (1-4) -  $\beta$ -glucanos son carbohidratos estructurales, son solubles en detergente neutro. Hall y col. (1997) en Ariza y col. (2001) clasifican a las pectinas y a los (1-3) (1-4) -  $\beta$ -glucanos en una fracción de polisacáridos no almidonáceos y se refirió a esta fracción como fibra neutro detergente soluble (NDSF), que también incluye los fructanos.

La fermentación de carbohidratos no fibrosos tales como azúcares, almidón o fibra soluble, difieren en las características de la digestión y en los perfiles de los ácidos orgánicos producidos (Strobel y Russell, 1986). La fermentación ruminal de forrajes fibrosos en un estado avanzado de maduración genera perfiles de AGV con una elevada concentración de ácido acético. Los forrajes en un estadio más temprano de maduración tienden a producir cantidades algo menores de ácido acético y mayores de ácido propiónico.

Una de las principales determinantes de la síntesis de proteína microbiana es la disponibilidad ruminal de sustratos energéticos, es por eso que la utilización de concentrados ricos en energía fermentescible hace más eficiente la captura del N producido a nivel ruminal a partir de pasturas de alta calidad (Van Soest y col., 1991). Huntington (1997) sugiere que la baja disponibilidad de energía, o la falta de sincronía entre la energía y el suministro de N, limitan el uso de N disponible por los m.o.. Una consecuencia de esta asincronía es que el  $\text{NH}_3$  que no es transformado en proteína microbiana es absorbido al torrente sanguíneo y se convierte en urea en el hígado. Parte de este  $\text{NH}_3$  no capturado por la masa microbiana es absorbido y excretado en la orina como urea (Van Vuuren y col., 1993a). La detoxificación hepática por el exceso de  $\text{NH}_3$  ruminal requiere un gasto calórico equivalente a 0,2 Mcal de ENL/100 g de exceso de consumo de proteína cruda (Twiggs y Van Gils, 1988). Por otra parte, elevadas concentraciones plasmáticas de nitrógeno ureico han estado asociados con la disminución en la performance reproductiva de vacas lecheras de alta producción (McCormick y col., 2001; Gehman y col., 2006).

La microbiota ruminal puede ser considerada como el órgano metabólicamente más adaptable y renovable del cuerpo del rumiante, que desempeña un papel vital en la nutrición normal y en las funciones fisiológicas del animal hospedador (Mackie y White, 1990). Cuando esta relación simbiótica se altera como consecuencia de cambios en la alimentación o por la presencia de sustancia no deseadas, se produce un desequilibrio en la población microbiana ruminal que puede conducir a la aparición de alteraciones patológicas (Calsamiglia y Ferret, 2002).

## 4.2. PASTURAS TEMPLADAS DE ALTA CALIDAD

Las pasturas constituyen la fuente de alimentación más económica para los rumiantes, por lo cual es fundamental potenciar la eficiencia con que el forraje es cosechado y transformado en producto final (Gómez, 1997). La calidad del forraje es quizás el factor más importante en la productividad de los rumiantes, si el principal alimento es la pastura (Van Soest, 1994). El valor alimenticio de un forraje para la producción animal, es el producto de la concentración de nutrientes contenidos en el forraje (valor nutritivo) y la cantidad de un forraje que un animal consume (consumo voluntario) (Galli, 1997).

La producción anual de pasturas de clima templado depende de la fertilidad del suelo, condiciones ecológicas y climáticas (Rearte y Pieroni, 2001). Las pasturas templadas varían en su composición química y el grado de degradación ruminal según la época del año en que sean consumida y/o evaluada (Van Vuuren y col., 1993b). La producción de materia seca tiene su pico en primavera, lo que representa en promedio el 45 - 50% del rendimiento anual, produciéndose una disminución en el verano cuando el pasto es más maduro, teniendo un nuevo rebrote en otoño, para tener su tasa más baja de crecimiento en invierno (Rearte y Pieroni, 2001).

Kolver y col. (1998), establecieron que una pastura de alta calidad es aquella que presenta una digestibilidad mayor al 70% y según Santini (2002) son las que presentan 70% de digestibilidad y 18% de PB. Las pasturas de clima templado suelen tener altos niveles de proteína bruta y bajos niveles de carbohidratos no estructurales solubles (Elizalde y Santini, 1992). A mayor calidad de la pastura, menor contenido de fibra, mayor contenido de carbohidratos solubles, lo que resulta en un menor pH ruminal (Rearte y Santini, 1989). Las materias nitrogenadas de las pasturas templadas son de rápida degradación ruminal (Nápoli y Santini, 1988ab; Rearte y Santini, 1989; Elizalde, 2003; Repetto y col., 2005) provocando una rápida liberación de  $\text{NH}_3$  en el rumen. Las materias nitrogenadas de las pasturas templadas de alta calidad conducen a mayores pérdidas ruminales de N a iguales consumos de N a partir de forrajes secos (Elizalde, 2003). La degradación ruminal es más rápida en forrajes más tiernos que en forrajes más groseros, en hojas que tallos y en leguminosas que gramíneas (Van Soest, 1994).

La composición del forraje consumido se ve afectada por la especie forrajera, la parte de la planta ingerida y la etapa fisiológica del vegetal (Elizalde y col., 1999a). La fase de crecimiento es el factor más importante que afecta a la composición y valor nutritivo de la hierba. La digestibilidad desciende a medida que las plantas maduran de acuerdo al grado de incrustación de lignina en las paredes celulares vegetales (McDonald, 2006). La digestibilidad de los forrajes no sólo depende de su etapa de madurez sino también del proceso de digestión que se produce en el rumen. La digestión de la fibra en el rumen dependerá de la tasa de digestión, que se verá afectada por la actividad bacteriana, así como el tiempo de retención en ese compartimiento (Rearte y Pieroni, 2001). Cuando el contenido de proteína de los forrajes de alta calidad supera el 14-16% de la materia seca, ocurren pérdidas ruminales de N como  $\text{NH}_3$  (Elizalde, 2003).

Durante ciertas épocas del año (principios de primavera, otoño e invierno), las pasturas de calidad presentan contenidos proteicos (20-30%) que se encuentran muy por encima de la concentración requerida por animales de alta producción (Rearte y Santini, 1989).

Los estudios realizados por Rearte y Santini (1989) demostraron que el medio ambiente ruminal en el ganado consumiendo forraje de alta calidad es diferente al ambiente ruminal reportado en ganado alimentado con dietas basada en alimentos procesados como heno, ensilado y concentrado. La ingestión de pasturas templadas de alta calidad además de ocasionar mayores concentraciones de  $\text{NH}_3$  ruminal también promueve ambientes ruminales con menores pH, y mayores concentraciones de AGV con menores relaciones acético/propiónico que los ideales (Nápoli y Santini, 1988a; Nápoli y Santini, 1988b; Rearte y Santini, 1989). De Veth y Kolver (2001 a y b) observaron que la disminución más acusada de la digestibilidad *in vitro* de la MS de una pastura de alta calidad es por debajo de un pH de 5,8, y que períodos cortos (4 h) de pH subóptimo (5,4) reducen la digestibilidad de la MS, MO y FND.

Bargo y col. (2003) indican que dos factores que limitan la producción de leche en animales alimentados en base a pastura de alta calidad, son los bajos consumos de materia seca y el alto contenido de proteína de alta degradabilidad que poseen las pasturas templadas.

La productividad en rumiantes está determinada por el consumo de materia seca, la cantidad de nutrientes digestibles de la misma y la eficiencia con que estos nutrientes son utilizados y transformados en productos (Rearte y Santini, 1989). Una alternativa para mejorar el perfil nutricional de animales alimentados con forrajes de alta calidad puede lograrse a través de la suplementación energética (Elizalde, 2003).

#### 4.3. SUPLEMENTACIÓN

La información existente en cuanto a la suplementación indica que las respuestas productivas que pueden ser obtenidas con altos niveles de concentrados son superiores a los que se pueden obtener en pastoreo, aún en condiciones óptimas (Gómez, 1997). La sustitución parcial del forraje fresco por alimentos ricos en energía, ha sido utilizada como herramienta para mejorar la performance animal cuando se alimenta a los rumiantes con pasturas templadas de alta calidad (Elizalde y Santini, 1992). La interacción entre un forraje de alta calidad y un concentrado como suplemento a veces no es tenida en cuenta; animales alimentados con forrajes de baja calidad nunca alcanzan a producir al mismo nivel que animales alimentados con forraje de alta calidad y menor cantidad de suplemento (Van Soest, 1994).

La suplementación puede ser energética o proteica, en los sistemas que se basan en la utilización de pasturas templadas la proteína no representa una limitante por lo que la energía es el principal nutriente limitante. Por este motivo, los concentrados energéticos son habitualmente incluidos en las estrategias de alimentación (Bargo y col., 2002). El suplemento puede utilizarse en diferentes situaciones; cuando la pastura no cubre los requerimientos de los animales, cuando se desea aumentar la carga animal o cuando se quiere aumentar los niveles de producción (Rosso, 1997). En forrajes frescos y en determinadas épocas del año ocurren considerables pérdidas de N en el rumen debido a que la concentración ruminal excede la disponibilidad de energía y limita la capacidad de síntesis microbiana (Elizalde, 2003).

Dos factores influyen en la ingesta de nutrientes cuando el ganado en pastoreo es suplementado con concentrado, la sustitución del consumo de forraje por concentrado y la depresión sobre la digestión de la fibra (Rearte y Pieroni, 2001). Elizalde (2003),

denomina sustitución, cuando se suplementa un forraje de alta calidad y en condiciones no limitantes de disponibilidad, el consumo de pastura disminuye en mayor proporción que el aumento del consumo total de materia seca, provocado por la suplementación. En otras palabras es la disminución en el consumo de materia seca de pastura por unidad de consumo de concentrado (Rearte y Pieroni, 2001). Normalmente los efectos de sustitución son mayores cuanto mayor es la calidad del forraje. En pasturas de alta calidad el efecto de la suplementación sobre tasa de sustitución es más importante que el efecto sobre la digestión de la fibra, mientras que en pasturas de baja calidad ocurre lo contrario, significa que la depresión en la digestión de la fibra es lo que más afecta a la ingesta de nutrientes (Elizalde y col., 1999b).

Como suplementos de pasturas se utilizan concentrados energéticos ricos en almidón (como los granos de cereales) y también pueden ser utilizados subproductos como la pulpa de citrus (concentrado energético fibroso). Los cereales poseen contenidos de almidón de hasta 72% y pueden ser clasificados en rápida (trigo y cebada) y lentamente degradables (maíz y sorgo) (Offner y col., 2003). El grano de maíz es un cereal de lenta degradación y de alto valor energético, posee un alto contenido en almidón (63-65%), y un bajo contenido de fibra neutro detergente (FND) 8-9%. La FND está compuesta por celulosa y pentosanas, con un bajo contenido en lignina. (Repetto y col., 2003; Offner y col., 2003). Mientras que el grano de cebada es un cereal de rápida degradación, posee un contenido de almidón de 50-55%, 2-3% de azúcares y 17-19% de FND (Repetto y col., 2003; Offner y col., 2003).

El almidón es el componente energético principal de los granos (Huntington, 1997). La digestión del almidón en el tracto digestivo de los rumiantes tiene una gran influencia en las diversas respuestas digestivas de los animales. Es necesario estimar con precisión la cantidad de almidón degradado en el rumen, debido a que los valores de almidón degradado presentan especial interés en la formulación de la dieta (Offner y col., 2003). Existe una relación negativa entre la cantidad de almidón ruminal degradado y pH ruminal (Sauvant, 1999). La reducción en el pH ruminal inhibe la digestión de fibra (Mould y Col., 1984). Grant y Mertens (1992) sugirieron que una abrupta reducción en el pH de 6,2 a 5,8 producto de la fermentación del almidón inhibe las bacterias celulolíticas. La tasa de rápida degradación del almidón además de deprimir la digestibilidad de la fibra puede afectar la fermentación ruminal y la síntesis de la proteína microbiana (Ørskov, 1986). La extensión en la tasa de digestión ruminal de la cebada, la avena y el trigo es alta (80 % en promedio) y resulta inferior y más variable en los almidones de maíz (65 % en promedio) y de sorgo (42 % en promedio) (Nocek y Tamminga, 1991).

El riesgo de acidosis es tanto mayor cuanto mayor sea la cantidad y la velocidad de degradación de los Hidratos de Carbono no Fibrosos. El potencial acidogénico de los diferentes ingredientes depende de la velocidad de degradación de los almidones, que varía entre especies vegetales, y puede modificarse física o químicamente (Calsamiglia y Ferret, 2005).

Los NDSC varían en sus características de fermentación y digestión, así como el perfil de nutrientes que proporcionan. La fermentación ruminal de los mono- y oligosacáridos (azúcares) y el almidón tienden a producir relativamente más propionato que acetato, y pueden producir ácido láctico. Por el contrario, las NDSF, tales como materias pécticas,

tienden a producir más acetato y no generan cantidades apreciables de propionato y de ácido láctico (Strobel y Russell, 1986).

Algunos NDSC como algunos oligosacáridos, azúcares y el almidón tienen la potencialidad de ser digeridos en el intestino delgado, y los monosacáridos resultantes son absorbidos. Los polisacáridos de la NDSF se digieren sólo por las enzimas microbianas (Leiva y col., 2000).

#### 4.4 SUPLEMENTACIÓN CON PULPA DE CITRUS

Muchos de los subproductos industriales tienen un valor potencial como alimento para los animales. Los rumiantes, en especial, tienen la capacidad única de utilizar la fibra, debido a su microflora ruminal. Muchos estudios han demostrado el valor nutritivo de los subproductos de la agroindustria (Boucque y Fiems, 1988; Grasser y col., 1995; Bampidis y Robinson, 2006). Esto significa que los cereales pueden ser reemplazados en gran medida por estos subproductos (Boucque y Fiems, 1988; Henrique y col., 2003) principalmente como componente energético de la dieta. En consecuencia, la competencia por los cereales entre la nutrición humana y animal puede ser disminuida (Boucque y Fiems, 1988; Henrique y col., 2003).

El costo de la alimentación en la producción ganadera es la variable principal, por lo tanto, en la producción ganadera con éxito, la reducción de los costos de alimentación y mantenimiento de la productividad es una estrategia fundamental. Una ventaja importante de los subproductos agroindustriales es su bajo costo. Sin embargo, el uso de subproductos húmedos puede estar limitado por el alto costo del transporte. En consecuencia, la mayoría de los subproductos húmedos utilizados como alimentos deberían proceder de plantas procesadoras ubicadas a nivel regional (Grasser y col., 1995; FEDNA, 2004)

Los subproductos de la industria cítrica son una alternativa práctica porque el ecosistema microbiano ruminal puede utilizar subproductos alimenticios que contengan altos niveles de fibras estructurales. Estos subproductos son capaces de satisfacer las necesidades nutricionales de la microbiota ruminal, para su mantenimiento, crecimiento, reproducción y para la producción de proteína microbiana (Bampidis y Robinson, 2006). Los principales subproductos cítricos en la alimentación de rumiantes son la pulpa fresca de cítricos, ensilado de cítricos, pulpa de cítricos, harina de cítricos, melazas de cítricos, licores de cortezas de cítricos (Bampidis y Robinson, 2006).

La pulpa de citrus es el residuo tras la extracción del jugo. Su composición en base seca es de 60-65% cáscara, 30-35% pulpa o pasta y 0-10% de semillas (Martínez y Fernández, 1979; FEDNA, 2004). Representa entre el 49 y 69% del peso de la fruta. Es un alimento muy palatable que puede ser utilizado fresco, ensilado o deshidratado, (FEDNA, 2004) aunque ensilado y fresco puede ocasionar dificultades de acostumbamiento (Klopfenstein y Owen, 1981).

La composición química de la pulpa de cítricos tiene un contenido bajo en proteína bruta (6-9% sobre materia seca) y en extracto etéreo (2-4% sobre materia seca) (FEDNA, 2004). Su composición química está caracterizada por contener altos niveles de pectinas (30 % base seca) y de azúcares solubles (20-25 % base seca). La FND



(20-25 % base seca) se fracciona en 17% celulosa, 6% hemicelulosas y 2-3% de lignina (Repetto y col., 2003; FEDNA, 2003; FEDNA, 2004; Bampidis y Robinson, 2006). La palatabilidad de la pulpa de cítricos es buena y posee una digestibilidad elevada (Materia Orgánica Digestible del 85%). Entre las características de la proteína de la pulpa de cítricos cabe destacar su elevada solubilidad (35-40%), una degradabilidad efectiva del orden del 65% y una velocidad de degradación del 6 %/h. La digestibilidad intestinal de la proteína que escapa de la degradación ruminal es del orden del 85% (FEDNA, 2004).

La pulpa de cítricos contiene pectina y celulosa, con la pectina que comprende aproximadamente 450 g/kg de pared celular (Sunvold y col., 1995). La pectina se degrada muy rápido y extensamente en el rumen, pero, a diferencia del almidón, el producción de lactato es menor, causando una disminución menor del pH ruminal (Strobel y Russell, 1986; Barrios-Urdaneta y col., 2003).

Diversas investigaciones internacionales indican que es posible la suplementación con derivados de la industria cítrica. En un trabajo realizado por Wing (1974), con novillos alimentados con heno y niveles de suplementación con pulpa de citrus de 0 a 60% se observó que la digestibilidad de la energía, materia seca y proteína no se vieron afectados por la inclusión de pulpa de cítricos.

Pinzón y Wing (1975) indican que la urea en sangre y la producción de amoníaco en rumen disminuyeron en novillos alimentados con un porcentaje en la dieta de 19, 38, o 55% de pulpa de citrus, por lo que la relación acético/propionico fue mayor. La concentración total de AGV fue superior en los tratamientos que incluyeron pulpa de citrus en 19, 38, y 55% que en el 0% pulpa de citrus. Estos autores también sugirieron que la pulpa de cítricos en niveles de suplementación de 38 a 55% aumentó la utilización de N, y disminuyó el nitrógeno ureico en la sangre.

Fegeros y col. (1995) indican que la pulpa de cítricos es un recurso valioso, como producto de alta energía porque puede sustituir parcialmente a los granos de cereales en raciones para rumiantes sin efectos adversos en la producción o composición de leche. Las comparaciones de Proteína Cruda y contenido energético de subproductos con una cantidad equivalente de harina de soja como alimento proteico y con una cantidad equivalente de maíz como alimento energético mostró que los subproductos cítricos no son competitivos como sustitutos de la proteína pero son muy competitivos como fuente energética (Grasser y col., 1995).

En investigaciones realizadas por Ariza y col. (2001) se midieron los efectos de carbohidratos sobre la fermentación microbiana comparando maíz y pulpa de citrus. Estos autores sugieren que la digestión de la MO, MS, FDN y FDA no se vieron afectados por las diferentes fuentes de hidratos de carbono. La concentración de N amoniacal fue mayor para la dieta de alimentación con maíz que en la dieta de pulpa cítricos deshidratada. El N total, N microbiano, y el flujo de N ruminal no se vieron afectadas por los tratamientos, sin embargo, la eficiencia de la síntesis de proteína microbiana (g N mo / kg MOD) fue mayor en la dieta de pulpa de cítricos que en la de maíz. Los resultados de este experimento indican que la fibra neutro detergente soluble en forma de pectina de la pulpa de cítricos puede proporcionar fuentes similares de energía en comparación con el almidón de maíz para el crecimiento microbiano ruminal. Además no se encontraron diferencias entre los tratamientos en la

concentración total de AGV en el líquido ruminal (mmol/L), pero, difería en las proporciones de AGV individuales. La concentración de acetato fue mayor para el tratamiento con pulpa de cítricos secos, mientras que el propionato fue mayor para el tratamiento con grano de maíz.

Barrios-Urdaneta y col. (2003) indican que en dietas mixtas, la sustitución de alimentos ricos en almidón por otros ricos en pared celular fácilmente fermentables como la pulpa de cítricos, evita en parte, el efecto negativo sobre la digestibilidad del forraje causada por altos niveles de almidón de la dieta.

En un trabajo realizado por Gehman y col. (2006) donde se alimentó vacas lecheras consumiendo pasturas suplementadas con maíz, cebada más melaza y pulpa de citrus más melaza observaron que los niveles de urea en leche (MUN) fue mayor en los animales que consumieron la dieta suplementada con cebada y melaza que los animales que consumieron maíz o pulpa de citrus y melaza.

Bampidis y Robinson (2006) indican que la suplementación de forrajes con subproductos cítricos, ricos en pectina o fibra neutro detergente soluble, suele tener efecto menos negativo en el medio ambiente ruminal y sobre la actividad celulolítica, que la suplementación con almidón o azúcares, produciendo un aumento de la proporción de ácido acético y disminuyendo la proporción de ácido propiónico. Estos autores afirman que, los coeficientes de digestibilidad de la MS y MO tienden a no ser afectados, disminuye la digestibilidad de la proteína y aumentan los coeficientes de digestibilidad de FDN y FDA. Sin embargo, cuando se alimentan con niveles muy altos de pulpa de citrus desecada, se puede producir paraqueratosis ruminal, sobre todo cuando el nivel de forraje en la dieta es bajo.

En investigaciones recientes a nivel regional, Navamuel y col. (2002) afirman que la suplementación con pulpa fresca de citrus, produjo efectos benéficos desde el punto de vista productivo en vacas de invernada generando ganancias de peso de los animales suplementados en relación a los testigos solo alimentados a pasturas. Los autores afirman que la pulpa de citrus fresca es una importante alternativa alimentaria ya que se obtiene ganancias de peso a reducido costo. Henrique y col. (2004), sustituyendo maíz molido por pulpa de citrus, ofrecida en niveles de 0, 25, 40 y 55% (base seca) de la dieta, no encontraron diferencias en ganancia diaria, peso vivo final, ingestión de MS, conversión, rendimiento de carcasa ni el área de ojo de bife. Estos autores concluyeron que la pulpa de citrus puede sustituir al maíz hasta en 55% de una dieta con alto contenido de concentrados.

A nivel nacional en un estudio realizado por Mattiauda y col. (1997) en vacas lecheras consumiendo pastura de alta calidad suplementadas con afrechillo de trigo o pulpa de citrus, reportan que la suplementación energética en pasturas de alta calidad aumenta la producción de leche y que la suplementación con pulpa de citrus aumentó la concentración de grasa de la leche en forma mayor que la suplementación con afrechillo de trigo.

## 4.5. PRODUCCIÓN DE GAS *IN VITRO*

Las características de fermentación de los alimentos en el rumen pueden ser estudiadas por métodos *in vivo* o *in vitro* (Van Soest, 1994). Con el propósito de evaluar alimentos de forma más rápida, menos costosa y utilizando menor número de animales se desarrollaron las técnicas de fermentación *in vitro*.

Permite determinar la magnitud y la cinética de fermentación del alimento a través del volumen de gas producido durante el proceso fermentativo (Theodorou y col, 1994). Esta técnica se basa en el supuesto de que el gas producido en cultivos inoculados con microorganismos mixtos del intestino grueso o contenido ruminal o heces está directamente relacionado con la cantidad de sustrato fermentado (López y col., 2007). En términos generales la técnica de producción de gas al igual que otros procedimientos *in vitro* utilizan sustratos molidos, medio anaeróbico buffer, inóculo ruminal y temperatura de 39° C (Williams, 2000). Para la medición de producción de gas a presión y volumen constante con transductores de presión o sensores existen métodos que pueden ser manuales, semiautomáticos o totalmente automáticos (Rymer y col., 2005).

En una revisión realizada por Rymer y col. (2005), indicaron que quienes primero propusieron y desarrollaron el principio para la determinación de la degradación y fermentación ruminal potencial de los alimentos por la medición del gas producido en cultivos en sistemas cerrados fueron McBee y Hungate en la década del sesenta. Theodorou y col. (1994) proponen y desarrollan la técnica de la medición manual de la presión usando un transductor de presión, un ensamble de jeringa/transductor que mide el gas acumulado; los sustratos se incuban en frascos sellados causando la acumulación de los gases de la fermentación en el espacio superior, luego se libera el gas acumulado hasta restaurar la presión atmosférica al interior del frasco.

Las principales ventajas de la técnica de producción de gas están dadas por el bienestar animal, tamaño de la muestra, el costo y la descripción de la cinética de fermentación. Como desventaja se menciona la falta de uniformidad en las metodologías, lo que dificulta la comparación de resultados entre grupos de investigación (Williams, 2000). Entre otros efectos que dificultan la comparación entre grupos están, los efectos de cambios en la presión atmosférica afectados por la altitud, efectos de la agitación de la fermentación *in vitro*, efectos del tamaño de la muestra y su preparación, efectos del tipo de inóculo, efectos del uso de blancos, efecto de la composición del medio de cultivo, efectos de los aparatos usados y efectos de los diferentes sistemas de evaluación (Rymer y col., 2005).

### 4.5.1. Alcances y Usos de la técnica de producción de gas *in vitro*

La Técnica de Producción de gas *in vitro* se puede utilizar para la evaluación de los alimentos, para investigar los mecanismos de la fermentación microbiana, y para estudiar el modo de acción de los factores anti-nutritivos, aditivos y suplementos alimenticios (López y col., 2007). También puede ser de valor para la predicción de la digestión y fermentación en el intestino posterior de los seres humanos y otros animales monogástricos (Williams y col., 2005).

Williams (2000) indica que la calidad del alimento puede ser determinada mediante diferencias en la fermentescibilidad de los alimentos sometidos a diversos tratamientos químicos o físicos. La autora indica también que es posible la predicción del contenido de Energía Metabolizable. Magalhaes y col. (2010) indican que la técnica de producción de gas *in vitro* también ha sido empleada para estimar el valor de Energía Digestible y los valores de Energía Metabolizable de las dietas. La técnica tiene potencial para investigar efectos asociativos entre alimentos (Liu y col., 2002). Robinson y col. (2009) afirman que la ración formulada para rumiantes es a menudo una mezcla de distintos alimentos en forma individual, y su valor energético se calcula generalmente como la suma del valor energético de los alimentos individuales que la conforman, asumiendo que el valor energético individual será el mismo cuando estos son combinados. La técnica de producción de gas *in vitro* puede ser utilizada para determinar si ocurren efectos asociativos en los alimentos.

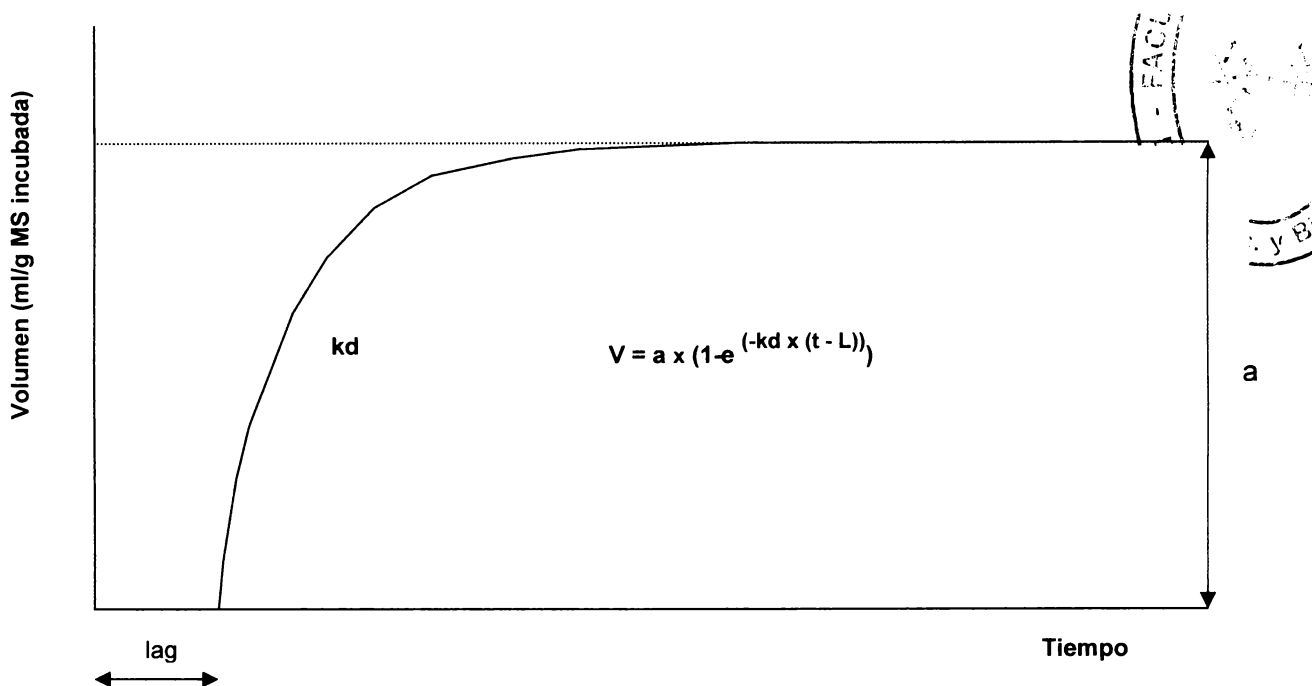
Liu y col. (2002) indican que la técnica ha sido usada como una medida de la degradación ruminal de los alimentos y como un indicador del consumo de MS digestible. De hecho, la tasa fraccional de degradación ha sido un medio para predecir el consumo voluntario de forrajes por los rumiantes (López y col., 1998).

Estudios realizados por Mauricio y col. (2003) indican que la técnica de producción de gas *in vitro* permitió estimar los valores de digestibilidad *in vivo* mediante la comparación de los datos obtenidos entre ambas técnicas y proporcionó información adicional sobre la cinética de fermentación ruminal de silos de sorgo.

#### 4.5.2. Análisis de los Resultados Obtenidos a partir de la Técnica de Producción de gas *in vitro*.

El análisis de los datos obtenidos a partir de la técnica se basa en modelos matemáticos para estimar el índice y grado de digestión acumulativa de los alimentos a partir de la producción de perfiles de gas (López y col., 2007). Expresiones cuantitativas de la cinética de digestión son necesarias para estimar de una forma más precisa la cantidad de nutrientes digeridos desde los alimentos y las propiedades intrínsecas de éstos que limitan su disponibilidad para los rumiantes (López y col., 1998).

Las curvas de producción de gas pueden ser ajustadas a diferentes modelos matemáticos (Posada y Noguera, 2007). La descripción estadística por modelos matemáticos de las curvas de producción de gas permite la comparación de los sustratos, la evaluación de diferentes ambientes de fermentación y proporciona información sobre las tasas de fermentación de los constituyentes (Noguera y col., 2004). Uno de los modelos utilizados es el modelo exponencial simple con latencia (lag) (Figura 1).



**Figura 1. Volumen total de gas producido (V ml/g MS incubada) en función del tiempo (h) obtenido por el modelo exponencial simple con latencia.** L: tiempo de retardo en la producción de gas (h); a = producción potencial de gas (ml/g MSi); kd = tasa de producción de gas (%/h); t = tiempo de incubación (h).

Para la selección del modelo se toma en cuenta la capacidad de ajuste de los datos obtenidos al mismo, la cual es evaluada a través de herramientas estadísticas. Posada y Noguera (2007) indican que los mejores modelos son aquellos que presentan el mejor balance entre la capacidad de ajuste de los datos y la coherencia biológica, siendo necesaria su evaluación en las más variadas condiciones experimentales, a fin de escoger el mejor para cada situación. Para este trabajo se utilizó el modelo exponencial simple con latencia, el cual supone que la tasa de producción de gas es constante y que depende del sustrato disponible una vez alcanzado el tiempo de colonización.

Durante la fase inicial ocurre la hidratación y colonización del sustrato insoluble por los microorganismos ruminales. Cuando el sustrato es saturado con microorganismos y enzimas, la fase exponencial toma lugar; durante esta fase la parte más degradable del sustrato insoluble es degradada primero, y el sustrato menos digestible precisa de más tiempo para ser degradado. Finalmente, cuando la fracción potencialmente degradable ha sido digerida, la producción de gas es cero (Posada y Noguera, 2007).

Los efectos de la suplementación de pasturas de alta calidad con diferentes concentrados energéticos pueden ser determinados mediante la producción de gas *in vitro* y así poder evaluar la magnitud y velocidad de la fermentación ruminal de las distintas combinaciones de pastura y concentrados. También es posible contribuir a la generación de datos a nivel nacional sobre la posibilidad de incluir suplementos de origen cítrico para que puedan ser tenidos en cuenta en la formulación de las dietas.

## **5. HIPÓTESIS**

- La inclusión de concentrados a una pastura templada de alta calidad en niveles bajo y medio producirán un aumento del volumen de gas y de la tasa de producción de gas, mientras que el tiempo de latencia disminuirá.
- Los altos niveles de inclusión de concentrados disminuirán el volumen de producción de gas con respecto a porcentajes de inclusión medios o bajos.
- Con la inclusión de pulpa de citrus, un concentrado energético fibroso, suceden los mismos fenómenos que con la inclusión de concentrados energéticos almidonáceos pero en menor magnitud.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1. OBJETIVO GENERAL**

El objetivo general del presente trabajo fue estimar la fermentescibilidad ruminal *in vitro* de muestras compuestas por diferentes proporciones de una pastura templada de alta calidad, maíz, cebada o pulpa de citrus.

### **6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar los parámetros de la producción de gas *in vitro* de muestras compuestas por diferentes proporciones de pastura templada de alta calidad y maíz, cebada o pulpa de citrus.
- Evaluar las modificaciones de la fermentescibilidad *in vitro* al incrementar el nivel de los distintos concentrados.
- Comparar los efectos del incremento en el nivel de inclusión de los diferentes concentrados sobre la fermentescibilidad *in vitro*.

## **7. MATERIALES Y MÉTODOS**

El trabajo experimental se desarrolló durante los meses de agosto y setiembre del año 2008 en la Unidad de Digestión y Metabolismo Ruminal del Departamento de Nutrición Animal en el Campo Experimental N° 2 de la Facultad de Veterinaria, Universidad de la República (UdelaR), San José, Uruguay (34° S, 35° O).

Los análisis de composición química de los alimentos se realizaron en el laboratorio de análisis químicos del Departamento de Nutrición Animal de la Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

## 7.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

Para la producción de gas *in vitro* se utilizaron muestras de 1 forraje (pastura de alta calidad) y 3 concentrados maíz, cebada y pulpa de citrus. Se conformaron muestras compuestas por el forraje y cada uno de los 3 suplementos en 9 proporciones distintas como se observa en el cuadro I. Se evaluaron de esta forma cada uno de los alimentos y combinaciones de 0 a 100% de inclusión (con incrementos de 10 en 10) de cada concentrado sobre la pastura templada de alta calidad (n =31).

**Cuadro I. Composición de las muestras según proporción de forraje (pastura templada de alta calidad) y 3 concentrados maíz, cebada y pulpa de citrus.**

N <sup>oa</sup>	% F <sup>b</sup>	% PC <sup>c</sup>	N <sup>oa</sup>	% F <sup>b</sup>	% M <sup>d</sup>	N <sup>oa</sup>	% F <sup>b</sup>	% C <sup>e</sup>
1	100	0	12	90	10	22	90	10
2	90	10	13	80	20	23	80	20
3	80	20	14	70	30	24	70	30
4	70	30	15	60	40	25	60	40
5	60	40	16	50	50	26	50	50
6	50	50	17	40	60	27	40	60
7	40	60	18	30	70	28	30	70
8	30	70	19	20	80	29	20	80
9	20	80	20	10	90	30	10	90
10	10	90	21	0	100	31	0	100
11	0	100						

<sup>a</sup> N<sup>o</sup>: número de muestra; <sup>b</sup>% F = porcentaje de Forraje; <sup>c</sup>% PC = porcentaje de pulpa de citrus ; <sup>d</sup>% M = porcentaje de Maíz; <sup>e</sup>% C = porcentaje de Cebada

En el cuadro II se presenta la composición química de los alimentos, la composición botánica y disponibilidad de la pastura utilizada durante el ensayo.

**Cuadro II. Composición química de los alimentos, composición botánica y disponibilidad de la pastura.**

Composición química	Pastura	Pulpa de citrus	Maíz	Cebada
MS (%)	13,67	14,64	85,85	88,83
MO (% MS)	89,46	96,48	98,56	97,31
PB (% MS)	18,70	6,86	9,90	11,21
FND (% MS)	37,51	20,66	7,64	14,99
FAD (% MS)	19,91	15,45	1,71	4,95

### Composición botánica y disponibilidad de la pastura

Leguminosas (% MS)	56,13
Gramíneas (% MS)	39,04
Restos secos (% MS)	2,46
Malezas (% MS)	2,38
Disponibilidad (Kg MS/ha)	4180,3

De todas las mezclas se determinó la fermentescibilidad *in vitro* mediante la técnica de producción de gas *in vitro*, los datos de producción de gas se ajustaron a un modelo exponencial simple.

## 7.2. DETERMINACIONES Y TÉCNICAS

### 7.2.1. Producción de gas *in vitro*

Para determinar la producción de gas *in vitro* se utilizó el procedimiento descrito por Theodorou y col. (1994) modificado por Mauricio y col. (1999). Se utilizaron frascos de fermentación de vidrio de 125 ml de capacidad, sellados con tapón de goma y precinto de aluminio. Para realizar la incubación de los frascos se utilizó un baño maría (39° C) de acero inoxidable con tapa. Las mediciones de presión se realizaron con un manómetro digital (Cole Parmer Instrument Co.), al que se adaptó una jeringa con aguja hipodérmica 21G.

Se utilizó como medio de incubación el propuesto por Williams y col. (2005) que incluye con una solución basal libre de N, una solución buffer y una solución reductora (Cuadro III).

Se colocaron 0,5 g de cada uno de los 31 sustratos en los frascos de fermentación por triplicado. A cada frasco se le adicionó 38 ml de solución basal libre de N, 2 ml de solución buffer y 0.5 ml de solución reductora. A tres frascos que representaron los blancos solo se les agregó el medio de incubación y líquido ruminal. Se eliminó el aire del interior de los frascos mediante una corriente de CO<sub>2</sub> e inmediatamente se selló con tapones de goma. Los frascos sellados con el sustrato y el medio permanecieron a 4° C por una noche para que el sustrato se hidratara con el medio de incubación. A la mañana siguiente, media hora antes de la inyección del inóculo (líquido ruminal fresco) los frascos fueron colocados en el baño María a 39° C, en el que permanecieron hasta el final del periodo de incubación.

El líquido ruminal fue extraído de una vaca adulta raza Holstein, en lactación, provista de cánula ruminal, alimentada con una dieta forrajera. La dieta que el animal donante estaba consumiendo en nuestro trabajo era pastura templada de alta calidad mediante pastoreo diario directo de 4hs en la mañana y 4 hs en la tarde y heno de pastura mixta, no suplementada con concentrados. Para obtener el inóculo se extrajo contenido ruminal de forma manual a través de la cánula y se filtró por cuatro capas de paño de quesería, en un recipiente térmico precalentado a 39,5° C. Inmediatamente el líquido fue transportado al laboratorio y sometido a gaseado permanente con CO<sub>2</sub> mientras fue inoculado en cada frasco de fermentación (10 ml/ frasco). Seguidamente luego de la inoculación fueron introducidos al baño María donde permanecieron durante toda la incubación.

La presión de gas producido fue registrado a las 2,4,6,8,10,12,18,24,48,72 y 96 h de incubación con un manómetro digital. Luego de cada medición se procedió a realizar el *venting* para que no se acumulara presión utilizando una aguja hipodérmica 21G y posteriormente todos los frascos de fermentación fueron sometidos a un suave agitado manual. Al gas producido por cada frasco se le restó el gas producido por los frascos que representaron los blancos.



**Cuadro III. Composición de las soluciones utilizadas en el medio de incubación para la producción de gas *in vitro* (Williams y col, 2005)**

**a) Solución basal libre de N (g/l de agua destilada)**

KCl	0,60
NaCl	0,60
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,20
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,50
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,46
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,55

**Solución minerales traza (g/l de HCl 0,02 molar) 10 ml por litro de Solución basal**

MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,03
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,02
ZnCl <sub>2</sub>	0,03
CuCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,03
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,05
SeO <sub>2</sub>	5,00
NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,25
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,25
NaVO <sub>3</sub>	0,03
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,25

**Solución hemina (g/l de agua destilada) 10 ml por litro de Solución Basal**

Hemina	0,10
--------	------

**b) Solución reductora (g/l de agua destilada)**

Na <sub>2</sub> S <sub>9</sub> H <sub>2</sub> O	20,50
---	-------

**c) Solución Buffer (g/l de agua destilada)**

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	82,00
---------------------------------	-------

Los datos de presión fueron transformados en volumen mediante una ecuación de predicción obtenida en un experimento previo realizado en condiciones similares (Britos y col., 2008).

$$V \text{ (ml)} = 4.40 P \text{ (psi)} + 0.09 P^2 \text{ (psi)}$$

V = Volumen (ml) observado

P = Presión en el interior de los frascos de fermentación (psi)

Los resultados de producción de gas se ajustaron al modelo exponencial simple:

$$V = a (1 - e^{-kd \times (t - L)})$$

**V** = volumen de gas producido a tiempo  $t$  (ml/g MSi)

**a** = producción potencial de gas (ml/g MSi)

**kd** = tasa fraccional de producción de gas ( $h^{-1}$ )

**L** = tiempo de retardo en la producción de gas (h)

**t** = tiempo (h)

### 7.3. ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA:

Tanto la pastura como los suplementos fueron analizados en sus contenidos de MS, MO y PB según AOAC (1984), y se determinó el contenido de FND y FAD según Robertson y Van Soest (1981). Todas las muestras se analizaron por duplicado, aceptando coeficientes de variación intra análisis menores al 5%.

### 7.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS:

La producción de gas se ajustó al modelo mencionado mediante un procedimiento de regresión no lineal mediante PROC NLIN de SAS<sup>®</sup>. Una vez obtenidos los parámetros de la ecuación, se realizaron análisis de regresión de los parámetros de la producción de gas *in vitro* en función de los niveles de inclusión de cada concentrado, ajustándolos a ecuaciones lineales o cuadráticas y se compararon las ecuaciones lineales obtenidas mediante la creación de una variable ficticia “dummy”; que combinó concentrado por nivel. Ambos procedimientos fueron llevados a cabo mediante PROC REG de SAS<sup>®</sup>.

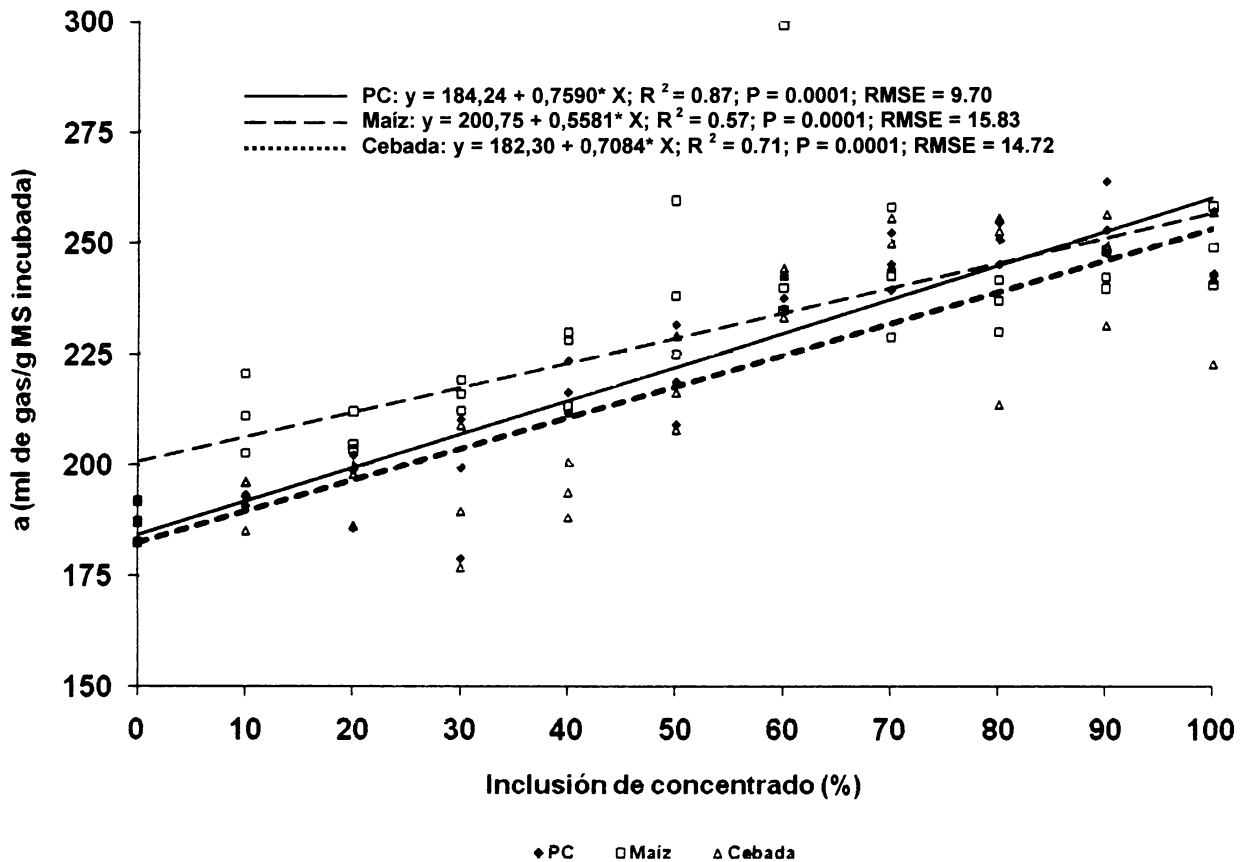
## 8. RESULTADOS

**Cuadro IV. Medias de los Parámetros de producción de gas *in vitro* obtenidos por el modelo exponencial simple con latencia de cada concentrado en diferentes niveles de inclusión.**

Par	Con	Nivel de Concentrado (%)											P Lineal	R <sup>2</sup>	P Cuadrático	R <sup>2</sup>
		0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100				
<b>a</b> (ml/gMSi)	PC		192,2	195,5	196,1	217,2	219,8	238,4	245,5	250	254,6	247,5	<0,001	0,87	<0,001	0,87
	Maíz	187,1	211,5	206,8	215,8	223,8	240,8	257,9	243,1	236,1	243,3	249,1	<0,001	0,57	<0,001	0,66
	Cebada		192,5	194,7	191,8	194,2	217,8	240,1	250,0	240,5	245,7	240,4	<0,001	0,71	<0,001	0,71
<b>kd</b> (h <sup>-1</sup> )	PC		0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,11	0,11	0,11	0,11	0,10	0,005	0,60	<0,001	0,66
	Maíz	0,12	0,13	0,12	0,11	0,10	0,10	0,09	0,09	0,08	0,08	0,08	<0,001	0,90	<0,001	0,90
	Cebada		0,12	0,12	0,11	0,11	0,10	0,17	0,11	0,11	0,11	0,11	<0,001	0,35	<0,001	0,52
<b>L</b> (h)	PC		0,10	0,29	0,47	0,31	0,47	0,17	0,34	0,02	0,21	0,02	0,380	0,02	0,002	0,34
	Maíz	0,08	0,70	0,57	0,54	0,65	1,10	0,76	0,87	0,98	1,41	1,53	<0,001	0,62	<0,001	0,62
	Cebada		0,54	0,89	0,94	1,17	1,20	1,03	1,02	1,29	1,51	1,61	<0,001	0,72	<0,001	0,76

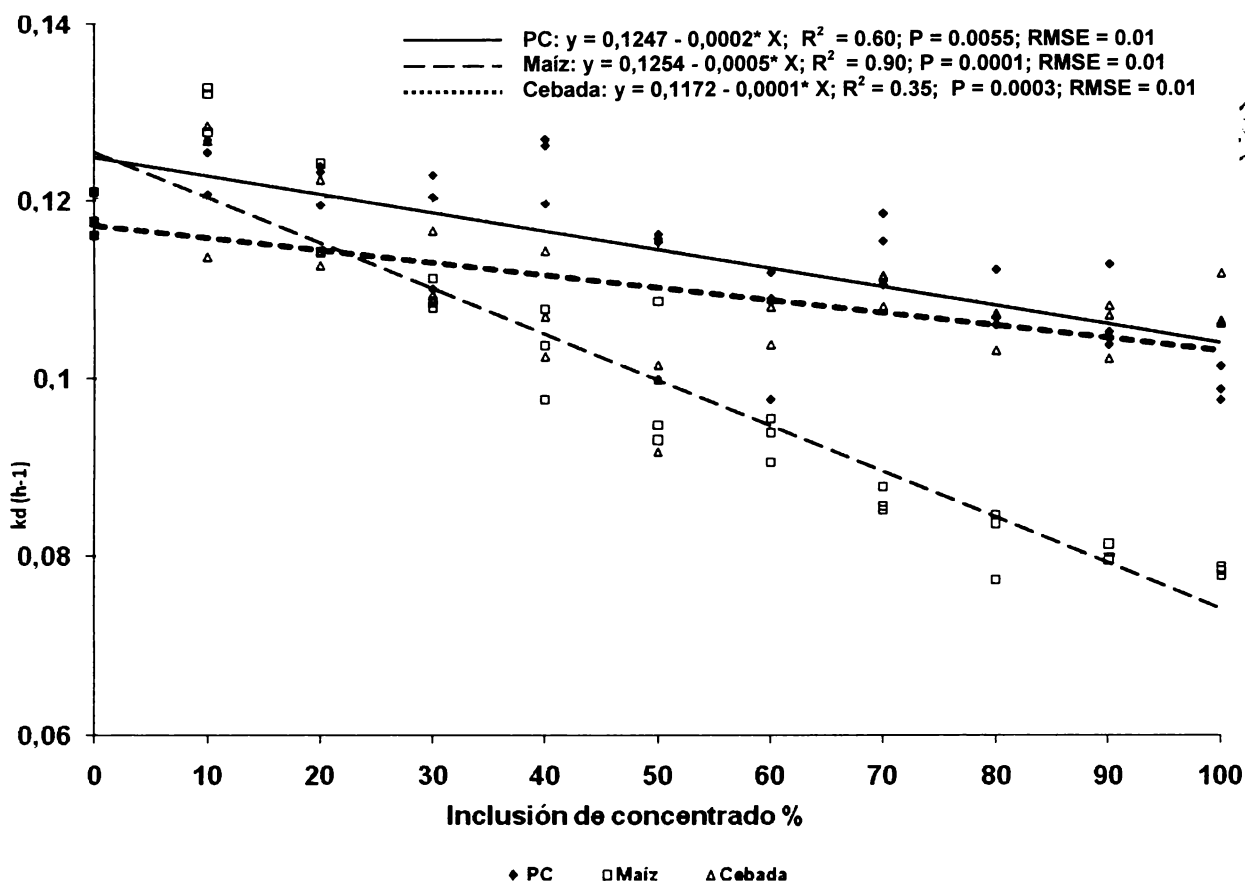
Par: Parámetro; Con: Concentrado; a: Producción potencial de gas (ml de gas / g MS incubada); kd : tasa fraccional de producción de gas (h<sup>-1</sup>); L: tiempo de retardo en la producción de gas (h); Nivel de Concentrado: porcentaje de inclusión de suplemento.

En el cuadro IV se presentan las medias de los parámetros de la producción potencial de gas (a), la tasa fraccional de producción de gas (kd) y el tiempo de latencia de la producción de gas (L) según el nivel de inclusión de cada uno de los concentrados. La producción potencial de gas y la tasa fraccional de producción de gas presentaron efecto lineal ( $p < 0.01$ ) y efecto cuadrático ( $p < 0.01$ ) para los tres concentrados. Para el tiempo L presentó efecto lineal ( $p < 0.01$ ) y cuadrático ( $p < 0.01$ ) para el maíz y la cebada, para la pulpa de citrus sólo tuvo efecto cuadrático ( $p = 0.002$ ).



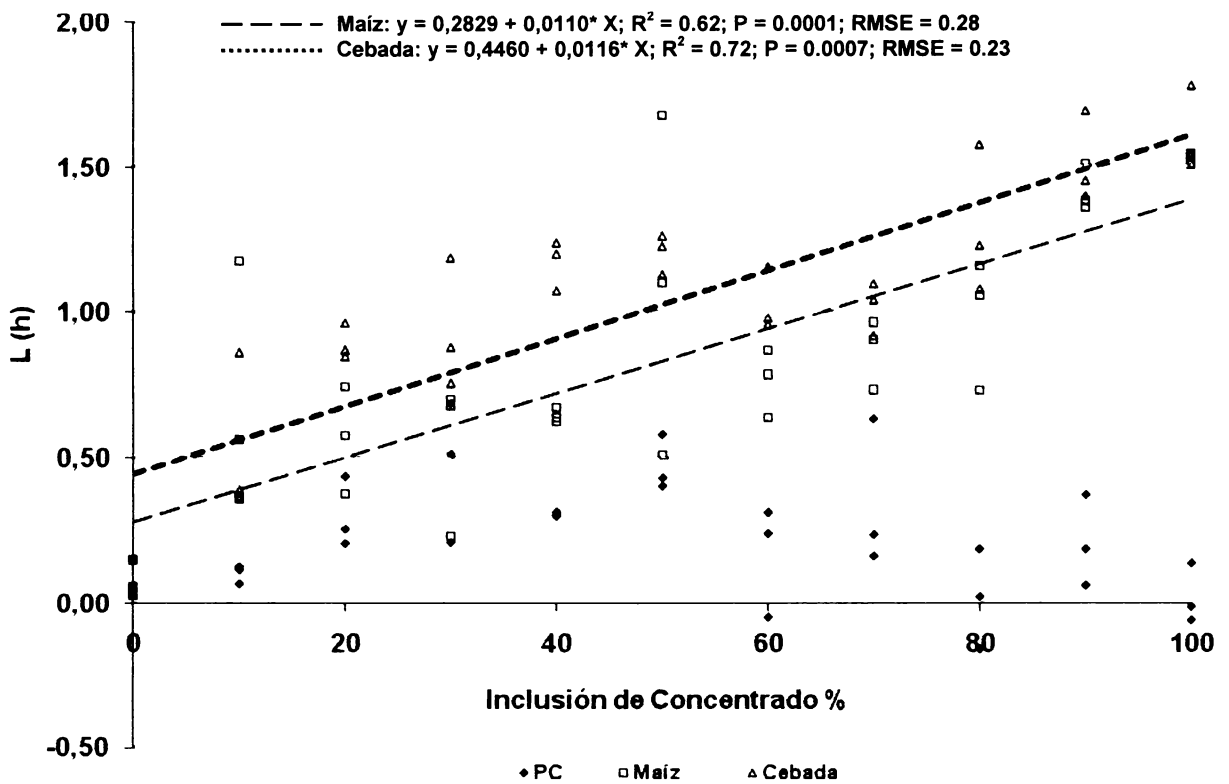
**Figura 2. Producción potencial de gas (a) en función del porcentaje de inclusión de cada concentrado.**

En la figura 2 se presentan las ecuaciones de regresión lineales de la producción potencial de gas en función del porcentaje de inclusión de cada concentrado. Se produjo un aumento lineal a medida que aumentó el nivel de inclusión de suplemento. Este aumento se produjo en los tres alimentos de igual forma, presentando los tres suplementos el mismo comportamiento. No se detectaron diferencias significativas entre los coeficientes de regresión de cada concentrado (EEM = 13.68;  $p = 0.151$ ).



**Figura 3. Tasa fraccional de producción de gas en función de la inclusión de cada suplemento.**

En la figura 3 se presentan la ecuaciones de regresión lineales de la tasa fraccional de producción de gas ( $k_d$ ) en función del porcentaje de inclusión de suplemento. Se observa que a medida que aumenta el nivel de inclusión de concentrado, la tasa fraccional de producción de gas disminuye. Sin embargo, la disminución no es de la misma magnitud para la inclusión de los distintos concentrados, observándose diferencias significativas entre los coeficientes de regresión ( $EEM = 0.006$ ;  $p < 0.001$ ). El aumento en el nivel de inclusión de maíz presentó una mayor pendiente.



**Figura 4. Tiempo de retardo en producción de gas en función de la inclusión de cada suplemento.**

En la figura 4 se presentan las ecuaciones de regresión lineal para los tiempos de retardo en la producción gas (L) en función del porcentaje de inclusión de maíz o cebada solamente, dado que el aumento en el nivel de inclusión de pulpa de citrus no presentó un comportamiento lineal. Se observa que a medida que aumentó el nivel de inclusión de maíz o cebada aumentó el tiempo de retardo en la producción de gas, sin diferencias significativas entre ambos alimentos (EEM = 0.26;  $p = 0.40$ ).

## 9. DISCUSIÓN

Existe escasa bibliografía sobre producción de gas *in vitro* en relación a la suplementación con diferentes niveles de concentrado tanto sobre pastura templada de alta calidad, así como también sobre diferentes fuentes de forraje. Esto puede deberse parcialmente a que según Sandoval-Castro y col. (2002) existe escasa información sobre las metodologías adecuadas para evaluar las mezclas de alimentos, ya sea *in vivo* o *in vitro*. Es importante destacar que los resultados presentados en este trabajo aportan información sobre la evaluación de la fermentescibilidad *in vitro* de mezclas de alimentos.

### 9.1. PRODUCCIÓN POTENCIAL DE GAS POR GRAMO DE MATERIA SECA INCUBADA (a).

Liu y col. (2002) en un trabajo donde se evalúan diferentes mezclas de alimentos mediante la técnica de producción de gas *in vitro*, reportan diferencias en la producción potencial de gas por gramo de materia seca entre las mezclas de alimentos y la cantidad de gas producido por las muestras compuestas por alimentos en forma individual, lo cual es coincidente con los resultados presentados en este trabajo.

En el presente trabajo se observó que la producción potencial de gas (a) tuvo un aumento lineal a medida que aumentó el nivel de inclusión de concentrado. Esto coincide con lo reportado por Sandoval-Castro y col. (2002) quienes en un estudio donde se evaluó la inclusión de mezclas de concentrado comercial sobre forrajes de baja calidad mediante la técnica de producción de gas *in vitro*, reportan un efecto positivo en la producción de gas *in vitro* en las mezclas de forrajes de *Lysiloma lastisiliquum* y *Leucaena leucocephala* con concentrado comercial, pero no en las mezclas de *Pennisetum purpureum* con concentrado comercial. Asimismo indican que existen diferencias en la producción potencial de gas entre el concentrado comercial y los forrajes (concentrado comercial = 250.8 ml gas; Forrajes: *L. lastisiliquum* = 189.5 ml gas, *L. leucocephala* = 216.6 gas, *P. purpureum* = 70.1 ml gas). A pesar de la coincidencia en los resultados de ambos trabajos, las diferencias entre el estudio realizado por Sandoval-Castro y col. (2002) y el presente trabajo radican en el tipo de pastura utilizada (pastura de baja calidad versus pastura de alta calidad) y la utilización de un solo concentrado y de tipo comercial en comparación con los tres concentrados utilizados en este trabajo (dos concentrados almidonáceos y un concentrado fibroso con alto contenido en pectina).

El aumento lineal a medida que aumenta el nivel de inclusión de suplemento se produjo en los tres alimentos de igual forma, presentando los tres suplementos el mismo comportamiento. Esto difiere con lo reportado por Barrios-Urdaneta y col. (1997), quienes realizaron un estudio de fermentación *in vitro* de forrajes de baja calidad suplementados con distintos tipos y niveles de carbohidratos, en el cual se utilizó paja de cebada tratada con amoníaco (3%) como forraje de baja calidad, y como suplementos almidón soluble, celulosa y pectina, incluidos a niveles de 0, 15, 30, 45 y 60 % (p/p) respecto a la paja. Los autores afirman que se registró un descenso lineal significativo en la producción potencial de gas de la paja, al aumentar el nivel de suplementación con almidón o celulosa, mientras que no se observó un efecto del nivel de suplementación con pectina sobre la producción de gas debida a la fermentación de la paja. Los autores afirman que la fermentación de la paja fue superior cuando fue

suplementada con pectina que con almidón o celulosa y concluyen que la misma promueve un mejor aprovechamiento de la paja de cebada tratada con amoníaco en el rumen, respecto a los valores registrados con almidón o celulosa como suplementos en el medio.

En el presente trabajo se utilizó pastura templada de alta calidad suplementada con diferentes niveles de dos concentrados almidonáceos, una de rápida como la cebada o uno de lenta degradación como el maíz o un concentrado fibroso con alto contenido en pectina como la pulpa de citrus. La comparación entre los concentrados indica que no hay diferencias significativas entre ellos en la producción potencial de gas. Delahoy y col. (2003) en un estudio *in vivo* en vacas lecheras en pastoreo, sugieren que la suplementación con concentrados a base de almidón puede ser más beneficiosa con pastos de calidad media, mientras que la suplementación con concentrados a base de fibra como la pulpa de citrus, puede ser más beneficiosa con pasturas de alta calidad. La producción potencial de gas *in vitro* no confirma lo reportado por Delahoy y col. (2003) ya que no existen diferencias significativas entre la producción potencial de gas entre los tres tipos de concentrados sobre la misma calidad de pastura y la inclusión de pulpa de citrus no mostró diferencias con los otros dos concentrados almidonáceos utilizados.

Ariza y col. (2001), en un estudio donde se compara maíz y pulpa de citrus a través de la fermentación microbiana *in vitro* en una dieta base de heno de alfalfa y ensilaje de maíz, indican que la digestión de la MO, MS, FDN y FDA no se vieron afectados por las diferentes fuentes de carbohidratos. Afirman que la eficiencia de la síntesis de proteína microbiana fue mayor en la dieta de pulpa de cítricos que en la de maíz. Barrios-Urdaneta y col. (2003) reportan que la pulpa de cítricos, suplementada a ovinos consumiendo paja de cebada, evita el efecto negativo sobre la digestibilidad del forraje causada por altos niveles de almidón de la dieta, y por lo tanto sobre la actividad celulolítica. Si bien la literatura sugiere diferencias o efectos positivos en la suplementación con pulpa de citrus en comparación con la suplementación con concentrados almidonáceos sobre la digestión ruminal, no se encontraron diferencias en la producción potencial de gas en el presente trabajo que confirmen esos conceptos. Es importante destacar que la mayoría de los textos citados en la bibliografía son ensayos sobre una base de forrajes de baja calidad lo cual es una diferencia importante en los resultados presentados en este trabajo.

Si bien en el presente trabajo no se determinó la composición del gas producido es importante destacar que la técnica de producción de gas *in vitro* se basa en la medida de los productos finales de la fermentación: CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> y AGV en forma de gas. El CO<sub>2</sub> proviene de 2 vías: una vía directa producto de la fermentación de la glucosa por las diversas vías produciendo ácidos grasos volátiles, ATP y CO<sub>2</sub> y una vía indirecta producto de la reacción de los AGV con el bicarbonato (Schofield, 2000). Es importante mencionar que la producción potencial de gas (a) podría aumentar debido a la producción de AGV y CO<sub>2</sub> al aumentar los niveles de concentrados.



## 9.2. TASA FRACCIONAL DE PRODUCCIÓN DE GAS (kd)

Se observó que los tres suplementos disminuyeron su tasa fraccional de producción de gas (kd) a medida que aumentó el nivel de inclusión de suplemento y que la tasa fraccional del nivel 0 de suplementación es mayor que la tasa fraccional de los niveles 100 de suplemento. Esto coincide con lo reportado por Arroquy y col. (2005), quienes en un estudio evaluando los efectos de carbohidratos sobre la digestión de la fibra de baja calidad *in vitro* afirman que la tasa de digestión fue deprimida cuando una fuente de carbohidrato (glucosa, maltosa, almidón de maíz y almidón soluble) fue incluida. Asimismo, Grant y Mertens (1992) reportan que la adición de maíz a una dieta de heno de alfalfa (forraje de alta calidad) disminuye el kd, sin embargo afirman que no hubo efectos sobre el kd cuando se agregó maíz a heno de *Cynodon dactylon* (pastura de baja calidad). Los resultados de este trabajo también coinciden con lo reportado por Bargo y col. (2003) quienes en una revisión bibliográfica evaluando los efectos de la suplementación en vacas lecheras consumiendo pastura, afirman que la suplementación no afectó la digestión de pastura *in situ*, excepto por la reducción en la tasa de degradación cuando los animales fueron suplementados con altas cantidades de concentrado.

En el presente trabajo el aumento en la inclusión de los tres concentrados (maíz, cebada y pulpa de citrus) sobre una pastura templada de alta calidad disminuyó el kd o tasa fraccional de producción de gas. Offner y col. (2003) clasifican a los cereales en rápida (trigo y cebada) y lentamente degradables (maíz y sorgo). La rápida tasa de degradación del almidón puede afectar la fermentación ruminal (Ørskov, 1986). Esto podría ser una de las causas de la disminución de la tasa fraccional de producción de gas a mayor nivel de inclusión de concentrado.

Del mismo modo en este estudio se observa que los tres suplementos no presentaron la misma disminución de tasa fraccional de producción de gas. El maíz presentó una pendiente mayor, a mayor nivel de inclusión de sustrato. Esto difiere con lo reportado por Arroquy y col. (2005), quienes afirman que las diferentes fuentes de carbohidratos evaluados no exhibieron diferencias en sus efectos *in vitro* en la tasa de digestión. También difiere con lo reportado por Rosendo y col. (2003), quienes en un estudio compararon los efectos del almidón, fructosanos y pectinas, en la cinética de digestión de la fibra neutro-detergente (FND) de forraje y en la síntesis de proteína microbiana a través de la técnica de digestión ruminal *in vitro*. En dicho estudio se incubó fibra neutro-detergente (FND) extraída de alfalfa, *Cynodon dactylon* y *Phleum pratense* bien sola o mezclada con inulina, pectina de cítricos o almidón de maíz. La proporción de FND: Carbohidrato en las muestras de las diferentes mezclas fue 60:40 en dicho estudio los autores afirman que la digestión *in vitro* de la FND de alfalfa con pectina presentó un kd que tendió a ser menor que el kd de la mezcla con almidón.

Como se mencionó anteriormente, la rápida tasa de degradación del almidón puede afectar la fermentación ruminal (Ørskov, 1986). Esto podría ser la causa por lo que los tres suplementos no presentaron la misma disminución de tasa fraccional de producción de gas y por lo cual el maíz presentó una pendiente mayor, a mayor nivel de inclusión de concentrado. Lanzas y col. (2007) en un trabajo donde se evaluó la cinética de digestión de los granos de cereales a través de la técnica de producción de gas *in vitro*, clasifican a los granos en orden decreciente (trigo, cebada, maíz y sorgo) según los resultados de la tasa fraccional de producción de gas. Esto coincide con los

resultados presentados en este trabajo donde el nivel 100% de cebada tuvo un mayor kd que el nivel 100% de maíz.

Según Rymer y col. (2005) el inóculo es la principal fuente de variación en la producción de gas. Según Williams, (2000) todas las descripciones de producción de gas deberán describir las condiciones del animal donador. La dieta que el animal donante estaba consumiendo en nuestro trabajo era pastura templada de alta calidad mediante pastoreo diario directo de 4h en la mañana y 4 h en la tarde y heno de pastura mixta, no suplementada con concentrados. La dieta forrajera hace que la microbiota ruminal predominante fuera celulolítica, lo que pudo haber influido en los resultados del kd (tasa fraccional de producción de gas).

Los cambios en la dieta producen cambios en las características de la microbiota ruminal. Ferraro y col. (2009) afirman que la adaptación de la microbiota ruminal a cambios en la dieta puede cambiar la cinética de fermentación, en particular la tasa de producción de gas. Esta dificultad en la adaptación de la microbiota ruminal al sustrato pudo haber sido más acusada en los mayores niveles de suplementación con concentrados. La diferencia en la disminución de tasa fraccional de producción de gas al aumentar el nivel de concentrado según el suplemento utilizado podría haber estado influenciado por la composición de la dieta del animal donante sobre el inóculo. Sin embargo Bueno y col. (2005) en un estudio utilizando diferentes sustratos y diferentes inóculos, indican que la tasa de producción de gas no se vio afectada por la proporción de fase sólida en el inóculo ruminal. No obstante, en un estudio realizado por Britos y col. (2009) donde se utilizaron como inóculos líquido ruminal proveniente de vaquillonas alimentadas con forraje y diferentes fuentes de carbohidratos, observaron que los parámetros de producción de gas *in vitro* se vieron afectados por los diferentes inóculos según los tratamientos alimenticios.

### 9.3. TIEMPO DE RETARDO EN LA PRODUCCIÓN DE GAS (L)

Durante la fase inicial, se lleva a cabo por los m.o. ruminales la colonización del sustrato insoluble (Cheng y col. 1980). La colonización microbiana del sustrato es clave en el proceso de degradación ruminal de los alimentos (McAllister y col. 1994). Durante el proceso de incubación existe un periodo donde ninguna o una reducida degradación del alimento ocurre, que es conocido como tiempo de colonización o tiempo "lag" (Noguera y Posada, 2007). Son diversos los factores que afectan al proceso de adhesión bacteriana, entre ellos se destacan: los factores relacionados a la naturaleza de los m.o., los factores relacionados con el sustrato, y los factores ambientales (Miron y col. 2001). Los cambios en la alimentación pueden afectar la adhesión y colonización bacteriana y la formación del biofilm microbiano (McAllister y col. 1994).

Para el caso del maíz y cebada, se observó que a medida que aumentó el nivel de inclusión de suplemento, aumentó el tiempo de retardo en la producción de gas, no existiendo diferencias significativas entre ambos alimentos. Esto coincide con lo reportado por Grant y Mertens (1992) quienes afirman que la adición de maíz aumentó el L del heno de *Phleum pratense*. Sin embargo Rosendo y col. (2003), afirman que los carbohidratos añadidos a la FND no afectaron el L de manera significativa, coincidiendo con lo reportado por Grant y Mertens, (1992) quienes indican que la adición de maíz no tuvo efecto sobre el L del heno de alfalfa.

Como se mencionó anteriormente, el inóculo es la principal fuente de variación en la producción de gas (Rymer y col. 2005). La dieta forrajera que estaba consumiendo el animal donante hace que la microbiota ruminal predominante fuera celulolítica, lo que también pudo haber influido en los resultados del L. a su vez los cambios en la dieta producen cambios en las características de la microbiota ruminal. Como se mencionó para kd, Ferraro y col. (2009) afirman que la adaptación de la microbiota ruminal a cambios en la dieta también puede afectar el tiempo de latencia. Esta dificultad en la adaptación de la microbiota ruminal al sustrato pudo haber sido la causa de que a mayor nivel de inclusión de concentrado hubiera mayor tiempo de latencia

Finalmente los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que la pulpa de citrus puede ser utilizada como suplemento sobre pasturas templadas de alta calidad en la alimentación de rumiantes, ya que no se observaron diferencias en los parámetros de fermentación ruminal *in vitro* entre la pulpa de citrus (concentrado fibroso) y el maíz y la cebada (concentrados almidonáceos), coincidiendo con la literatura presentada en la revisión bibliográfica del presente trabajo, donde la mayoría de los autores destacan el potencial uso de este concentrado como suplemento en la dieta de los rumiantes. Así mismo destacar que es esperable que *in vivo* se obtengan resultados similares a los obtenidos en este trabajo en forma *in vitro*.

## **10. CONCLUSIONES**

La inclusión de concentrados a una pastura templada de alta calidad produjo un aumento de la producción potencial de gas a mayor porcentaje de inclusión de concentrado pero no hubo diferencias entre los diferentes concentrados.

La inclusión de concentrados a una pastura templada de alta calidad disminuyó la tasa de producción de gas a medida que aumentó el nivel de inclusión de concentrado.

La inclusión de un concentrado energético fibroso como la pulpa de citrus produjo fenómenos similares, y en similar magnitud que la inclusión de concentrados energéticos almidonáceos.

### **Implicancia:**

La suplementación sobre pasturas templadas de alta calidad de un concentrado energético fibroso no tiene efectos tan importantes en la fermentación ruminal *in vitro* a diferencia de lo que indica la mayoría de la bibliografía en lo referente a la suplementación sobre pasturas de baja calidad.

## **11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Association of Official Analytical Chemists, (1990) *Official Methods of Analysis*. 15a.ed. Washington D.C. 1123p
2. Ariza, P., Bach, A., Stern M.D., Hall, M.B (2001). Effects of carbohydrates from citrus pulp and hominy feed on microbial fermentation in continuous culture. *J Anim Sci*. 79:2713-2718.
3. Arroquy, J.I., Cochran R.C., Nagaraja, T.G., Titgemeyer, E.C., Jonson, D.E. (2005). Effect of types of non-fiber carbohydrate on in vitro forage fiber digestion of low-quality grass hay. *Anim Feed Sci. Technol*. 120: 93–106.
4. Bach, A., Calsamiglia, S., Stern, M.D. (2005). Nitrogen metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci*. 88: 9–21.
5. Bampidis, B.A., Robinson, P.H. (2006). Citrus by-products as ruminant feeds: a review. *Anim. Feed Sci. Technol*.128:175-217.
6. Bargo, F., Muller, L.D., Varga G.A., Delahoy, J.E., Cassidy, T.W. (2002). Ruminant digestion and fermentation of high-producing dairy cows with three different feeding systems combining pasture and total mixed rations. *J. Dairy Sci*. 85:2964–2973.
7. Bargo, F. Muller, L. D., Kolver, E. S., Delahoy J. E. (2003) Invited Review: Production and digestion of supplemented dairy cows on pasture *J. Dairy Sci*. 86:1–42
8. Barrios-Urdaneta, A., Fondevila, M., Castrillo, C. (2003) Effect of supplementation with different proportions of barley grain or citrus pulp on the digestive utilisation of ammonia-treated straw by sheep. *Anim. Sci*. 76: 309-317.
9. Barrios-urdaneta, A., Fondevila, M., González-Ronquillo, M., Castrillo, C. (1997). Fermentación in vitro de forrajes lignocelulósicos suplementados con distintos tipos y niveles de carbohidratos. *Arch. Latinoam. Prod. Anim*. 5(supl. 1): 199-201.
10. Beever, D.E., Mould, F.L. (2000). Forage evaluation for efficient ruminant livestock production. En: Givens D.I., Owen E., Omed H.M., Axford R.F.E. *Forage Evaluation in Ruminant Nutrition*. Wallingford (UK). CAB International. 475 p.
11. Boucque, C.H.V., Fiems, L.O. (1988). Vegetable by-products of agro-industrial origin. *Livest. Prod. Sci*. 19: 97-135.
12. Britos, A. Curbelo, A. Pomiés, N. Caramelli, A. Antunez, M Cajarville, C. (2008) Implementación de la técnica de producción de gas in vitro semiautomatizada en Uruguay: predicción del volumen de gas. XXXVI Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, Uruguay., p. 273- 275.

13. Britos, A. Mendoza, A. Claramunt, M. Karlen, M. Kelly, G. Magallanes, L. Ramírez, S. Zunini, A. Repetto, J. L. Cajarville, C. (2009) Effect of carbohydrate source on rumen fluid pH and in vitro gas production (GP) in heifers fed pasture silage. *J. Anim. Sci.* Vol. 87, E-Suppl. 2. *J. Dairy Sci.* Vol. 92, E-Suppl. 1. 152.
14. Bueno, I.C.S., Cabral Filho, S.L.S., Gobbo, S.P., Louvandini, H., Vitti, D.M.S.S., Abdalla, A.L. (2005) Influence of inoculum source in a gas production method. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123–124:95–105.
15. Calsamiglia, S., Ferret, A. (2002) Fisiología ruminal relacionada con la patología digestiva: acidosis y meteorismo. XVIII Curso de especialización FEDNA (Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal). *Avances en Nutrición y Alimentación Animal*. Eds.: P.G Rebollar, C. de Blas y G.G. Mateos. Barcelona, España. p. 97. Disponible en: <http://www.etsia.upm.es/fedna/publi.htm>  
Fecha de Consulta: 15 de Julio de 2010.
16. Cheng, K.J., Fay, J. P., Howarth, R. E., Costerton, J. W., (1980) Sequence of events in the digestion of fresh legume leaves by rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 40 (3):613-625.
17. Delahoy, J.E., Muller, L.D., Bargo, F., Cassidy, T.W., Holden L.A., (2003). Supplemental carbohydrate sources for lactating dairy cows on pasture. *J. Dairy Sci.* 86:906–915.
18. de Veth, M.J., Kolver, E.S. (2001a) Digestion of ryegrass pasture in response to change in pH in continuous culture. *J. Dairy Sci.* 84:1449-1457.
19. de Veth, M.J., Kolver, E.S. (2001b) Diurnal Variation in pH Reduces Digestion and Synthesis of Microbial Protein when Pasture is Fermented in Continuous Culture. *J. Dairy Sci.* 84:2066–2072.
20. DIEA (2009). Uruguay; Ministerio de Ganadería Agricultura y pesca. Estadísticas agropecuarias. Montevideo, Uruguay, Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy>  
Fecha de Consulta: 15 de julio de 2010.
21. Elizalde, J.C. (2003) Alternativas de manejo para engorde de vacunos en sistemas pastoriles. XXXI Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay. p 45-55.
22. Elizalde, J.C., Merchen, N.R., Faulkner, D.B. (1999a). Fractionation of fiber and crude protein in fresh forages during the spring growth. *J Anim Sci.* 77:476-484.
23. Elizalde, J.C., Merchen N. R., Faulkner, D. B. (1999b). Supplemental cracked corn for steers fed fresh alfalfa: I. Effects on digestion of organic matter, fiber, and starch. *J Anim Sci* 1999. 77:457-466.
24. Elizalde J.C., Santini, F.J (1992). Factores nutricionales que limitan las ganancias de peso en bovinos durante el período otoño-invierno. *Bol Téc*, Vol. 104. EEA INTA. Balcarce, Argentina. 27 p.

25. Fahey,G.C., Berger, L.L., (1988) Los Carbohidratos en la nutrición de los rumiantes. En Church, C.D. El Rumiante, fisiología digestiva y nutrición, Acribia, Zaragoza. p, 305-339.
26. FEDNA 2003.Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para la formulación de piensos compuestos (2ª ed.). C. de Blas, G.G. Mateos y P.Gª. Rebollar (eds.). Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Madrid, España. 423 pp. Disponible en:  
[http://www.etsia.upm.es/fedna/fibra/pulpa\\_citricos.htm](http://www.etsia.upm.es/fedna/fibra/pulpa_citricos.htm)  
Fecha de consulta: 15 de Setiembre de 2010.
27. FEDNA 2004.Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de forrajes y subproductos fibrosos húmedos. II. SUBPRODUCTOS HUMEDOS. S Calsamiglia, A. Bach y A. Ferret. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Madrid, España. 28 pp. Disponible en:  
[http://www.etsia.upm.es/fedna/Subp\\_humedos/pulpacitricos.htm](http://www.etsia.upm.es/fedna/Subp_humedos/pulpacitricos.htm)  
Fecha de consulta: 15 de Setiembre de 2010.
28. Fegeros, K., Zervas, G., Stamouli, S., Apostolaki, E. (1995) Nutritive value of dried citrus pulp and its effect on milk yield and milk composition of lactating ewes. J Dairy. Sci. 78: 1116-1121.
29. Ferraro, S.M., Mendoza, G.D., Miranda, L.A., Gutierrez, C.G. (2009) In vitro gas production and ruminal fermentation. Anim. Feed Sci.Technol. 154:112–118.
30. Galli J.R. (1997). Las pasturas como fuente de alimentación de rumiantes. En: Cangiano, Carlos. (Ed) Producción animal en pastoreo. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Balcarce. Buenos Aires. p 27-40.
31. Gehman, M.A., Bertrand, J.A., Jenkins, T.C., Pinkerton, B.W. (2006) The effect of carbohydrate source on nitrogen capture in dairy cows on pasture. J .Dairy Sci 89:2659 -2667.
32. Gómez, P.O. (1997) Aspectos relevantes a tener en cuenta en los sistemas de producción animal en pastoreo. En: Cangiano, Carlos. (Ed) Producción animal en pastoreo. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Balcarce. Buenos Aires. p 1-4.
33. Grant, R.J., Mertens, D.R. (1992). Influence of buffer pH and raw corn starch addition on in vitro fiber digestion kinetics. J. Dairy Sci. 75:2762-2768.
34. Grasser, L.A., Fadel, J.G., Garnett, I., De Peters, E.J. (1995).Quantity and economic importance of nine selected by-products used in california dairy rations. J .Dairy Sci 78:962-971.

35. Henrique, W., Moraes Sampaio A.A., Leme, P.R., Alleoni, G.F., Duarte Lanna D.P., Braga Malheiros, E. (2003) Digestibilidade e balanço de nitrogênio em ovinos alimentados a base de dietas com elevado teor de concentrado e níveis crescentes de polpa cítrica peletizada. *Rev.Bras.Zootec.* 32 (6): 2007-2015.
36. Henrique, W., Moraes Sampaio, A.A., Leme, P.R., Duarte Lanna, D.P., Alleoni G.F., Viana Coutinho, J.L. (2004) Desempenho e características da caracaca de tourinhos Santa Gertrudes confinados, recebendo dietas com alto concentrado e níveis crescentes de polpa cítrica peletizada. *Rev.Bras.Zootec.* 33 (2):463-470.
37. Huntington, G.B. (1997) Starch utilization by ruminants: from basics to the bunk. *J Anim Sci.* 75:852-867.
38. Kamra, D.N. (2005) Rumen microbial ecosystem. *Curr. Sci.* 89:124-135.
39. Klopfenstein, T., Owen, F.G. (1981) Value and potential use of crop residues and by-products in dairy rations. *J Dairy Sci* 64:1250-1268.
40. Kolver, E.S., Muller, L.D., Barry, M.C., Penno., J.W. (1998) Evaluation and application of the Cornell Net Carbohydrate and Protein System for dairy cows fed diets based on pasture. *J. Dairy Sci.* 81:2029–2039.
41. Lanzas, C., Fox, D.G., Pell, A.N. (2007) Digestion kinetics of dried cereal grains. *Anim. Feed Sci. Technol.* 136:265–280
42. Leiva, E., Hall, M.B., Van Horn, H.H. (2000) Performance of dairy cattle fed citrus pulp or corn products as sources of neutral detergent-soluble carbohydrates. *J Dairy Sci.* 83:2866–2875.
43. Liu, J.X., Susenbeth, A., Sudekum, K.H. (2002) In vitro gas production measurements to evaluate interactions between untreated and chemically treated rice straws, grass hay, and mulberry leaves. *J Anim Sci .* 80:517-524.
44. López, S., Carro, M.D., Gonzalez, J.S., Ovejero, F.J. (1998) Comparison of different in vitro and in situ methods to estimate the extent and rate of degradation of hays in the rumen. *Anim. Feed Sci. Technol.* 73: 99–113.
45. Lopez, S., Dhanoa, M.S., Dijkstra, J., Bannink, A., Kebreab, E., France, J. (2007) Some methodological and analytical considerations regarding application of the gas production technique *Anim. Feed Sci. Technol.* 135: 139–156.
46. Mackie, R.I., White, B.A. (1990) Recent advances in rumen microbial ecology and metabolism: potential impact on nutrient output. *J. Dairy Sci.* 73:2971-2995.
47. Magalhães, K.A., Valadares Filho, S.C., Detmann, E., Diniz, L.L., Pina, D.S., Azevedo, J.A.G., Araújo, F.L., Marcondes, M.I., Fonseca, M.A., Tedeschi, L.O. (2010) Evaluation of indirect methods to estimate the nutritional value of tropical feeds for ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol* 155:44–54.



48. Mattiauda, D., Favre, E y Chilbroste, P. (1997) Suplementación energética de vacas lecheras en pastoreo con subproductos de la industria. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 17: 68-69.
49. Mauricio, R.M., Mould, F.L., Dhanoa, M.S., Owen, E., Channa K.S., Theodorou, M.K. (1999) A semi-automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 79: 321-330.
50. Mauricio, R.M., Pereira, L.G.R., Gonçalves, L.C., Rodriguez, N.M., Martins, R.G.R., Rodriguez, J.A.S. (2003) Potencial da técnica in vitro semi-automática de produção de gases para avaliação de silagens de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). *Rev. Bras. Zootec.* 32(4): 1013-1020.
51. Martínez Pascual J., Fernández Carmona J. (1980) Composition of citrus pulp. *Anim. Feed Sci. Technol.* 5:1-10.
52. McAllister, T. A., Bae, H. D., Jones, G. A., Cheng, K. J. (1994). Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *J Anim Sci.* 72:3004-3018.
53. McCormick, M.E., Redfearn D.D., Ward J.D., Blouin D.C. (2001) Effect of protein source and soluble carbohydrate addition on rumen fermentation and lactation performance of holstein cows. *J. Dairy Sci.* 84:896–901.
54. McDonald, P., Edwards, R.A., Greenhalgh, J.F.D., Morgan, C.A.(2006) *Nutrición Animal*, 6a.ed. Zaragoza, Acribia. 587 p.
55. Merchen, N.R., Elizalde, J.C., Drackley, J.K. (1997) Current perspective on assessing site of digestion in ruminants. *J Anim Sci.* 75:2223-2234.
56. Miron, J., Ben-Ghedalia, D., Morrison, M. (2001). Adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria *J. Dairy Sci* 84:1294–1309.
57. Mould, F.L., Ørskov E.R., Mann S.O. (1984) Associative effects of mixed feeds I. Effects of type and level of supplementation and the influence of the rumen fluid pH on cellulolysis in vivo and dry matter digestion of various roughages. *Anim. Feed Sci. Technol.* 10:15-30.
58. Nápoli, G.M., Santini, F.J. (1988a) Suplementación energético-proteica de forrajes frescos en condiciones de pastoreo: I. Efecto sobre el medio ambiente ruminal y la degradabilidad proteica. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 8 (1):39.
59. Nápoli G.M., Santini F.J. (1988b) Suplementación energético-proteica de forrajes frescos en condiciones de pastoreo: II. Efecto sobre la digestión ruminal de la fibra. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 8 (1):40.

60. Navamuel, J., Fioranelli, S., Capellari, A., Revidatti, M., Coppo N., Coppo, J. (2002) Ganancia de peso en vacas de invernada suplementadas con pulpa de citrus. Liv Res for Rural Develop. 14 (1) Disponible en: <http://www.lrrd.org/lrrd14/1/nava141.htm>  
Fecha de Consulta: 15 de Setiembre de 2010.
61. Nocek, J.E., Tamminga S. (1991) Site of digestion of starch in the gastrointestinal tract of dairy cows and its effect on milk yield and composition. J Dairy Sci 74:3598-3629.
62. Noguera, R.R., Saliba, E.O., Mauricio, R.M. (2004) Comparación de modelos matemáticos para estimar los parámetros de degradación obtenidos a través de la técnica de producción de gas. Livestock Res for Rural Develop. 16 (11) Disponible en: <http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd16/11/nogu16086.htm>  
Fecha de consulta: 15 de setiembre de 2010.
63. Noguera, R.R., Posada, S.L. (2007) Modelación de la cinética de degradación de alimentos para rumiantes. Rev Colom Cienc Pecu. 20: 174-182.
64. Offner, A., Bach, A., Sauvant, D. (2003) Quantitative review of in situ starch degradation in the rumen. Anim. Feed Sci. Technol. 106:81-93.
65. Ørskov, E.R., (1986) Starch digestion and utilization in ruminants. J. Anim. Sci. 63, 1624–1633.
66. Owens, F.N., Goetsch, A.L. (1988) Fermentación ruminal. En Church, C.D. El Rumiante, fisiología digestiva y nutrición, Acribia, Zaragoza. p.159-189.
67. Pinzon, F.J., Wing, J.M., (1975) Effects of Citrus Pulp in High Urea Rations for Steers J.Dairy Sci .59:1100-1103.
68. Posada, S.L., Noguera, R.N. (2007) Comparación de modelos matemáticos: una aplicación en la evaluación de alimentos para animales. Rev Col Cienc Pec. 20:141-148.
69. Rearte, D.H.; Pieroni, G.A. (2001) Supplementation of temperate pastures. En: international grassland congress, São Pedro. Sociedade Brasileira de Zootecnia, 679-689.
70. Rearte, D.H., Santini, F.J. (1989) Digestión ruminal y producción en animales a pastoreo. Rev. Arg. Prod. Anim. 9: 93-105.
71. Rearte, D.H. (1992) Alimentación y composición de la leche en los sistemas pastoriles. CERBAS-INTA. Balcarce. 94 p.
72. Repetto, J.L., Cajarville, C., Curbelo, A., Sapriza, D., (2003) Módulo IV: Suplementos. En: Curso a distancia sobre Nutrición de Rumiantes. Montevideo, Uruguay. p 1-155.

73. Repetto, J.L., Cajarville, C., D'alessandro, J., Curbelo, A., Soto, C., Garín, D. (2005) Effect of wilting and ensiling on ruminal degradability of temperate grass and legume mixtures. *Anim. Res.* 54:73-80.
74. Rymer, C., Huntington, J.A., Williams, B.A., Givens, D.I. (2005) In vitro cumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. *Anim. Feed Sci. Technol* 123-124: 9-30.
75. Robinson, P.H., Getachew, G., Cone, J.W. (2009) Evaluation of the extent of associative effects of two groups of four feeds using an in vitro gas production procedure *Anim. Feed Sci. Technol* 150:9–17.
76. Robertson, J.B., Van Soest, P.J. (1981). The detergent system of analysis. En: James, W.P.T., Theander, O. (editors) *The Analysis of Dietary Fibre in Food*. Marcel Dekker (NY). p 123–158.
77. Rosendo, O., Hall, M.B., Staples, C., Bates, D. (2003) The Effect of Different Neutral-Detergent-Soluble Polysaccharides in Digestive Cynetics In Vitro of Neutral Detergent Forrage Fiber and the Synthesis of Microbial Protein .*Revista Científica, FCV-LUZ.* 13 (1):18-27.
78. Rosso, O.R. (1997) Suplementación Energética en Pastoreo. En: Cangiano, C. (Ed). *Producción animal en pastoreo*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Balcarce. p 85-101.
79. Sandoval-Castro, C.A. Capetillo-Leal, C. Cetina-Góngora, R. Ramirez-Avilés, L. (2002). A mixture simplex design to study associative effects with an in vitro gas production technique. *Anim Feed Sci and Technol* 101: 191–200.
80. Santini, F. (2002). Uso del maíz en sus varios tipos en la alimentación de vacunos para carne en pastoreo y feedlot. 14 p Disponible en: [http://www.inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/ganaderia/bovinos/nutricion/SAN\\_TINI.htm](http://www.inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/ganaderia/bovinos/nutricion/SAN_TINI.htm) Fecha de Consulta: 15 de Agosto de 2010.
81. Sauvant, D. (1999) Influences of feeding level and type of starch on its digestion in cattle. *Sci. Aliments* 19:499–503.
82. Schofield, P. (2000) Gas Production Methods. En: *Farm Animal Metabolism and Nutrition*. Wallingford (UK). CAB International. p 209-232.
83. Strobel, H.J. Russell, J.B. (1986) Effect of pH and energy spilling on bacterial protein synthesis by carbohydrate limited cultures of mixed rumen bacteria. *J. Dairy Sci.* 69, 2941–2947.
84. Sunvold, G.D., Hussein H.S., Fahey Jr. G.C., Merchen N.R., Reinhart G.A. (1995) In vitro fermentation of cellulose, beet pulp, citrus pulp and citrus pectin using fecal inoculum from cats, dogs, horses, humans and pigs and ruminal fluid from cattle. *J. Anim. Sci.* 73:3639-3648.

85. Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., Mc Allan, A.B., France, J. (1994) A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48: 185-197.
86. Twigg, J. R., Van Gils., L.G.M. (1988). Practical aspects of feeding protein to dairy cows. En: *Recent Developments in Ruminant Nutrition*. 2. W. Haresign and D.J.A. Cole, ed. Butterworth, London. 196-212.
87. Van Soest, P.J. (1994) *Nutritional Ecology of the Ruminant*. 2a Ed. Cornell University Press. 476 p.
88. Van Soest, P. (1982) *Nutritional Ecology of the Ruminant*. Corvallis, O & B Books, Oregon, 374 p.
89. Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A. (1991) Symposium: Carbohydrate Methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74 3583-3597.
90. Van Vuuren, A.M., Van der Koelen, C.J., Valk, H., De Visser, H. (1993a) Effects of Partial replacement of Rygrass by low protein feeds on Rumen Fermentation and Nitrogen Loss by Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 76:2982-2993.
91. Van Vuuren, A.M., Van der Koelen, C.J., Vroons de Bruin, J. (1993b) Ryegrass versus corn starch or beet pulp fiber diet effects on digestion and intestinal amino acids in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 76:2692-2700.
92. Williams, B.A., Bosch, M.W., Boer, H., Verstegen, M.W.A., Tamminga, S. (2005) An in vitro batch culture method to assess potential fermentability of feed ingredients for monogastric diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124: 445-462.
93. Williams, B.A. (2000) Cumulative gas-production techniques for forage evaluation. En: Givens, D.I., Owen, E., Omed, H.M., Axford, R.F.E (editors). *Forage Evaluation in Ruminant Nutrition*. Wallingford (UK). CAB International. p 189-213.
94. Wing, J.M. (1974) Effect of Physical Form and Amount of Citrus Pulp on Utilization of Complete Feeds for Dairy Cattle. *J. Dairy Sci* 58:63-66.
95. Yokohama, M.T., Johnson, K.A. (1988) *Microbiología del rumen e intestino* En Church, C.D. *El Rumiente, fisiología digestiva y nutrición*, Acribia. Zaragoza. p137-158.