

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**“MEZCLAS DE ENSILAJE DE PASTURA CON DIFERENTES NIVELES DE
CASCARILLA DE SOJA, MAÍZ O CEBADA: EVALUACIÓN MEDIANTE
PRODUCCIÓN DE GAS *IN VITRO*”**

por

Agustín ZUNINI CASTRO

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

MODALIDAD Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2013**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Presidente de Mesa:

Ing. Agr. Alejandro Mendoza

Segundo Miembro (Tutor):

Dr. Alejandro Britos

Tercer Miembro:

Ing. Agr. María de Jesús Marichal

Co-Tutor:

Dra. Cecilia Cajarville

Fecha:

11 de julio de 2013

Autor:

Agustín Zunini Castro

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alejandro Britos y la Dra. Cecilia Cajarville por la orientación en este trabajo.

Al resto de integrantes del Depto. de Nutrición Animal y del Depto. de Bovinos.

A mis padres y mis hermanos por su apoyo y aguante constante todos estos años.

A Margarita que me ayudó mucho en esta última etapa.

A los amigos que tuve la suerte de conocer y hacer durante toda la carrera y a los amigos compañeros de tesis.

A los familiares y amigos de toda la vida que están al lado siempre.

A los funcionarios del Campo Experimental N° 2 de Facultad de Veterinaria y los funcionarios de Bedelía y Biblioteca.

A PEDECIBA (Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas)-Biología y el Fondo Clemente Estable de ANII (Agencia Nacional de Investigación e Innovación) por la financiación del proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS	5
LISTA DE ABREVIATURAS	6
RESUMEN.....	7
SUMMARY	8
INTRODUCCIÓN.....	9
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	10
Digestión ruminal.....	10
Ensilaje de pastura de alta calidad	12
Suplementación.....	13
Producción de gas <i>in vitro</i>	15
HIPÓTESIS	19
OBJETIVOS	19
MATERIALES Y MÉTODOS	19
Diseño experimental.....	20
Técnica de producción de gas <i>in vitro</i>	21
Análisis químicos.....	22
Análisis estadísticos	22
RESULTADOS	24
DISCUSIÓN.....	29
CONCLUSIONES.....	31
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro I. Composición de las muestras según proporción de forraje (ensilaje de pastura de alta calidad) y 3 concentrados cascarilla de soja, grano de maíz o grano de cebada.....	20
Cuadro II. Composición química de los alimentos.....	20
Cuadro III. Composición de las soluciones utilizadas en el medio de incubación para la producción de gas <i>in vitro</i> (Williams y col., 2005).....	21
Cuadro IV. Efectos del incremento del nivel de inclusión de cascarilla de soja, grano de maíz o grano de cebada a un ensilaje de pastura de alta calidad sobre los parámetros de producción de gas <i>in vitro</i>	25
Figura 1. Volumen total de gas producido (mL/g MS incubada) en función del tiempo (h) obtenido por el modelo exponencial simple con latencia.....	17
Figura 2. Producción potencial de gas (a) en función del porcentaje de inclusión de cascarilla de soja, grano de maíz y grano de cebada.....	26
Figura 3. Tasa fraccional de producción de gas (kd) en función del porcentaje de inclusión de cascarilla de soja, grano de maíz y grano de cebada.....	27
Figura 4. Tiempo de retardo en producción de gas (L) en función del porcentaje de inclusión de cascarilla de soja, grano de maíz y grano de cebada.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS

- a:** producción potencial de gas
- AA:** aminoácidos
- AGV:** ácidos grasos volátiles
- C:** cebada
- CS:** cascarilla de soja
- F:** forraje
- FDA:** fibra detergente ácido
- FDN:** fibra detergente neutro
- 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
- NDSC:** carbohidratos solubles en detergente neutro
- NDSF:** fibra soluble en detergente neutro
- N-NH₃:** nitrógeno amoniacal
- P:** nivel de significancia observado
- PB:** proteína bruta
- R²:** coeficiente de determinación
- t:** tiempo de incubación
- V:** volumen total de gas producido

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue estimar la fermentescibilidad ruminal *in vitro* de muestras compuestas por diferentes proporciones de ensilaje de pastura de alta calidad y cascarilla de soja, maíz o cebada. Las muestras fueron compuestas por el ensilaje y cada uno de los 3 concentrados en 9 proporciones distintas desde 0 a 100% en incrementos de a 10% de concentrado (n=31). La fermentescibilidad se estimó mediante la técnica de producción de gas *in vitro*, utilizando cada muestra compuesta como sustrato. Se incubaron 0,5 g de cada sustrato en frascos de fermentación de 125 mL a 39° C, por triplicado. A cada frasco se le adicionó 40,5 mL de medio de incubación y 10 mL de líquido ruminal. La presión del gas producido fue registrada 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 con tiempo de latencia. Se realizaron regresiones lineales y cuadráticas de los parámetros de producción de gas *in vitro* según el nivel de inclusión de cada concentrado utilizando PROC REG de SAS® y se compararon las pendientes de las regresiones lineales de cada concentrado usando variables ficticias dicotómicas. El aumento lineal del volumen de gas presentó diferentes pendientes según el concentrado energético incluido ($P=0,007$). Los aumentos de los volúmenes de gas a medida que se incrementaban las proporciones de cascarilla de soja y de maíz fueron mayores que el ocasionado por el aumento de los niveles de cebada. Inesperadamente, las tasas de producción de gas disminuyeron a medida que aumentó el nivel de inclusión de concentrados. La disminución de la tasa no fue de igual magnitud para cada concentrado ($P<0,001$), presentando el maíz la disminución más importante. El tiempo de latencia de la producción de gas se incrementó con el aumento de las proporciones de los cereales, sin embargo no fue afectado por la inclusión de cascarilla de soja. La inclusión de diferentes concentrados energéticos a un forraje de alta calidad provoca comportamientos similares de la fermentación *in vitro*, aunque con magnitudes diferentes. A pesar de que la cascarilla de soja no afectó la adherencia microbiana, podría causar efectos similares a los cereales en el rumen.

SUMMARY

The aim of this work was to estimate the *in vitro* ruminal fermentability of samples composed of different proportions of high quality pasture silage and soyhulls, corn or barley. Samples were composed of silage and each one of the 3 supplements in 9 different proportions from 0 to 100% in increments of a 10% of concentrates (n=31). Fermentability was estimated with the *in vitro* gas production technique using each composite sample as substrate. Each substrate (0.5 g) was incubated in fermentation flasks of 125 mL at 39° C, in triplicates. 40.5 mL of incubation medium and 10 mL of ruminal fluid were added to each flask. 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 with lag time. Linear and quadratic regression analyses of *in vitro* gas production parameters were performed according to the level of inclusion of each concentrate using PROC REG of SAS® and the slopes of the linear regressions of each concentrate were compared using dummy dichotomous variables. The linear increase of the volume of gas showed different slopes according to the concentrate included ($P=0.007$). The raises of gas volumes as the proportion of soyhulls and corn were increased, were higher than that caused by increasing the levels of barley. Unexpectedly, the gas production rates decreased while the inclusion levels of concentrates increased. The decrease of the rate was not equal in magnitude for each concentrate ($P < 0.001$), showing the inclusion of corn the largest decrease. Gas production lag time increased with the increasing proportions of cereals, however it was not affected by the inclusion of soybean hulls. Inclusion of different concentrates to a high quality forage causes similar behaviors on *in vitro* fermentation, although with different magnitudes. Despite soyhulls did not affect microbial adhesion, it may cause similar effects to those caused by cereals in the rumen.

INTRODUCCIÓN

Uruguay cuenta con una superficie terrestre total de 17,6 millones de ha, de las cuales 16,4 millones (93,2%) se dedican a la producción agropecuaria. Las existencias ganaderas se dividen en 11,1 millones de vacunos y 7,5 millones de ovinos. El 14,1% del total de la superficie destinada a pastoreo son mejoramientos forrajeros, representando 2.314.000 de ha, incluyendo praderas artificiales, campo mejorado, campo natural fertilizado y cultivos forrajeros anuales (DIEA, 2012).

Los sistemas de producción animal, por lo tanto, son básicamente pastoriles con una dependencia estratégica de la suplementación con concentrados (Rearte y Santini, 1989). El objetivo final que se persigue al suplementar es aumentar la eficiencia de producción por unidad de superficie y por animal (Kellaway y Harrington, 2004). Incorporar suplementos a dietas forrajeras puede superar los cambios en cantidad y calidad de las pasturas, y aumentar así la ingestión total de materia seca (MS), energía y proteína (Bargo y col., 2001). Además, la inclusión de granos generalmente favorece la utilización de los nutrientes absorbidos para la síntesis de tejidos o productos finales (Dixon y Stockdale, 1999).

Como suplementos también pueden utilizarse subproductos de la cosecha y de las industrias procesadoras de alimentos, que según Bampidis y Robinson (2006) es una práctica tan antigua como la domesticación de los animales por los humanos. La cascarilla de soja (CS) es un subproducto del procesamiento industrial del grano de soja para la producción de aceite. En Uruguay en el año agrícola 2010/11 la superficie efectiva sembrada de soja representó unas 862.100 ha (69,2% del total destinado a la agricultura) que produjeron 1.541.000 toneladas (DIEA, 2012), evidenciando la importancia de este cultivo. La CS se ha catalogado como un concentrado energético fibroso que podría tener efectos beneficiosos sobre el ambiente ruminal (Ipharraguerre y Clark, 2003) y sobre la ingestión de forraje (Bargo y col., 2003). Además, se ha observado que puede sustituir al grano de maíz para hasta el 30% de la MS en dietas altas en granos sin que ello afecte la fermentación o la digestión en el tracto gastrointestinal (Ipharraguerre y Clark, 2003).

En nuestros sistemas productivos el uso de concentrados como suplementos de forrajes se ha generalizado e impuesto hasta en los sistemas más extensivos. Debido a ello, es necesario generar información sobre los efectos de la interacción entre diferentes tipos y niveles de concentrados y forrajes de alta calidad sobre la fermentación ruminal. Sandoval-Castro y col. (2002) indican que se necesitan más estudios para determinar con exactitud la metodología más apropiada para evaluar mezclas de alimentos, ya sea *in vivo* o *in vitro*. Las técnicas de fermentación *in vitro* son más rápidas, más baratas y utilizan menor número de animales que las técnicas *in vivo*. La producción de gas *in vitro* determina la magnitud y la cinética de fermentación de alimentos estimando el volumen de gas producido durante el proceso fermentativo (Theodorou y col., 1994). Es así, que estudiando mezclas de concentrados y forraje mediante esta técnica se contribuiría al conocimiento de los efectos de la suplementación a nivel ruminal.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Digestión ruminal

La digestión de los alimentos consumidos por los rumiantes, es el resultado neto de una secuencia de procesos que ocurren en diferentes segmentos del tracto gastrointestinal. Esta secuencia incluye: una fermentación de los componentes de la dieta por microorganismos (m.o.) en el retículo-rumen, una hidrólisis ácida y degradación enzimática en abomaso e intestino delgado, y una segunda fermentación en el ciego e intestino grueso (Merchen y col., 1997). La simbiosis establecida entre los m.o. ruminales y el rumiante es una estrategia digestiva para obtener energía de alimentos fibrosos, más eficiente que en la mayoría de los herbívoros (Van Soest, 1994). De esta manera, el grado y el tipo de transformaciones de los alimentos en el rumen determinan el rendimiento productivo del animal (Mackie y White, 1990).

El retículo-rumen reúne ciertas características que proporcionan un sistema de cultivo continuo para la microbiota y favorables para la fermentación. Se destaca entre ellas la capacidad de mantener un pH que oscila entre 6,2 y 7,0; mantener una temperatura estable entre 38 y 42° C, debido al metabolismo corporal y al calor generado por la propia fermentación ruminal; y mantener la humedad del medio 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 y col., 2006). De todos los factores, el pH es el más susceptible a variación (Calsamiglia y Ferret, 2002; Kamra, 2005). Está influenciado por la ingestión de carbohidratos fermentescibles, la secreción de saliva que aporta fosfatos y bicarbonatos que actúan como tampones y la absorción y utilización de los ácidos producidos por la fermentación ruminal (Zebeli y col., 2010).

Los m.o. ruminales utilizan los alimentos ingeridos por el animal hospedador como sustrato para poder multiplicarse y llevar a cabo la fermentación. Toman los componentes que no pueden digerirse por enzimas propias del rumiante, como los polisacáridos estructurales (celulosa), y aportan productos de la fermentación que tienen mayor valor nutritivo para el rumiante, como los ácidos grasos volátiles (AGV) y la proteína microbiana (Calsamiglia y Ferret, 2002). También generan productos finales como CO₂, CH₄, NH₃ y a veces ácido láctico.

La población microbiana 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 forrajeras, 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 tienen bajos requerimientos de mantenimiento, crecimiento lento, y utilizan NH₃ como principal fuente de nitrógeno (N), mientras que las bacterias amilolíticas, tienen mayores requerimientos de mantenimiento, rápido crecimiento, utilizan NH₃, péptidos, y aminoácidos (AA) como fuentes de N (Bach y col., 2005).

Los carbohidratos, proteínas y lípidos ingresan con los alimentos y deben ser divididos hasta formas monómeras para su fermentación o absorción (Owens y Goetsch, 1988). Según el sistema de detergentes propuesto por Robertson y Van Soest (1981), los carbohidratos pueden clasificarse en solubles en detergente neutro (NDSC) y en fibra detergente neutro (FDN). Dentro del grupo de los solubles se encuentran el almidón, las pectinas, azúcares y carbohidratos solubles y dentro de la FDN está la celulosa, hemicelulosa y lignina (polisacáridos estructurales). Con detergente ácido se solubiliza la hemicelulosa, pero la celulosa y la lignina son insolubles y conforman la fracción denominada FDA. La fracción NDSC se caracteriza por ser una fuente de energía rápidamente disponible que favorece el crecimiento microbiano ruminal (Van Soest, 1994; Ariza y col, 2001). Incluye ácidos orgánicos, azúcares simples, oligosacáridos, almidones, fructanos, materias pécticas, y los (1-3) (1-4) - β -glucanos (Van Soest y col., 1991). A pesar de que las pectinas y los (1-3) (1-4) - β -glucanos son carbohidratos estructurales, son solubles en detergente neutro.

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. Por otra parte, en la medida que disminuye el tamaño de las partículas de alimento se produce una modificación similar en la relación acético/propiónico, aunque aumenta la proporción de butírico (Maynard y col., 1981).

La forma física de los alimentos es un aspecto muy importante a tener en cuenta en el sentido de estimular la rumia. El forraje con elevado tamaño de partícula estimula mucho la rumia mientras que los concentrados prácticamente no lo hacen. Durante la misma se secreta gran cantidad de saliva que llega al rumen con la deglución del bolo alimenticio o de la rumia (Church, 1993). La formulación de dietas en los rumiantes debe buscar el equilibrio entre los niveles de carbohidratos fibrosos y no fibrosos con el objetivo de optimizar la ingestión de energía sin provocar alteraciones patológicas en el rumen (Calsamiglia y Ferret, 2002).

La degradación de las proteínas del alimento es un proceso enzimático realizado por proteasas de origen microbiano hasta convertirlas en péptidos, AA, NH_3 y también ácidos orgánicos y CO_2 (Bach y col., 2005). El NH_3 también se origina de N no proteico como la urea, ya sea de la dieta o endógena (Russell y Hespell, 1981). El NH_3 producido se libera al líquido ruminal y es utilizado por los m.o. celulolíticos para sintetizar proteína microbiana como única fuente de N. La microbiota amilolítica toma N a partir de AA, péptidos y el resto de NH_3 (McDonald y col., 2006).

Una de las principales determinantes para la síntesis de proteína microbiana es la disponibilidad en el rumen de sustratos energéticos, por esta razón, 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 NH_3 que no es transformado en proteína microbiana es absorbido al torrente sanguíneo, transportado por vena porta

al hígado, convertido en urea y luego excretado por la orina (Van Vuuren y col., 1993b).

La proteína microbiana es una fuente importante de AA para el animal hospedador (Strobel y Russell, 1986), ya que las bacterias ruminales pueden sintetizar todos los AA esenciales y no esenciales. De este modo, el rumiante obtiene estos últimos independientemente de su presencia en el alimento (McDonald y col., 2006). Sin embargo la síntesis de AA por los m.o. no es suficiente para cubrir las necesidades de AA para altas producciones. Los niveles de producción pueden ser aumentados proporcionando AA esenciales adicionales en una región post ruminal (Owens y Goetsch, 1988).

Para la degradación ruminal de carbohidratos estructurales y la síntesis de proteína microbiana, se ha sugerido que las condiciones ruminales óptimas están caracterizadas por un pH cercano a la neutralidad (6,7-6,8), una concentración de 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).

Ensilaje de pastura de alta calidad

Las pasturas constituyen la fuente de alimentación más económica para los rumiantes (Gómez, 1997), por lo tanto, en los sistemas de producción ganadera donde representan el principal componente de la dieta, la calidad de las mismas es probablemente el factor más importante en la productividad final (Van Soest, 1994). La productividad en rumiantes está determinada por el consumo de MS, 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).

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 proteína bruta (PB). A medida que las plantas maduran, desciende su digestibilidad debido a la reducción de los carbohidratos fácilmente fermentescibles (contenido celular) y un incremento de los estructurales (celulosa y hemicelulosa) y de lignina (McDonald y col., 2006). Además, la digestión de la fibra en el rumen dependerá de la tasa de digestión, afectada por la actividad bacteriana y por el tiempo de retención en ese compartimento (Rearte y Pieroni, 2001).

Las pasturas de clima templado suelen tener altos niveles de PB 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, 1988a; Rearte y Santini, 1989; Elizalde, 2003; Repetto y col., 2005) provocando una rápida liberación de N-NH_3 en el rumen.

Durante las épocas de crecimiento activo de las pasturas puede darse un excedente de forraje que sobrepase los requerimientos nutricionales del componente animal del sistema productivo. Para almacenar dicho excedente, existen procesos de conservación de pasturas que permiten almacenarlas y posteriormente distribuir las como alimento de buena calidad a los animales. Uno de estos procesos es el

ensilaje y el producto obtenido se denomina ensilado. La primera etapa del ensilaje consiste en la cosecha y picado del forraje, el llenado del silo, la compactación y el sellado hermético para lograr condiciones anaerobias favorables para la proliferación de lactobacilos. En la segunda etapa las bacterias ácido lácticas fermentan los azúcares presentes en los forrajes (principalmente glucosa y fructosa), hasta la formación de una mezcla de ácidos, entre los que predomina el láctico. Así se reduce el pH hasta niveles que inhiben o evitan la actividad de m.o. indeseables (3,7-4,2), como los clostridios y enterobacterias (McDonald y col., 2006). Luego de estas etapas se detienen los procesos fermentativos y se llega a la estabilidad del material ensilado.

Los ensilados de pastura tienen una gran variación en cuanto a su composición química, física y valor nutritivo (Restaino y col., 2009). Esto puede explicarse por dos factores, uno de ellos es la calidad del forraje original y el otro el proceso de ensilaje. La calidad del forraje varía considerablemente según diversos factores como: edad, clima, composición botánica y manejo del pastoreo. El momento de corte de la pastura, por lo tanto, condiciona la calidad final que tendrá el ensilado. Con respecto al proceso de ensilaje, este debe lograr las condiciones (compactación, hermeticidad) para que los procesos citados anteriormente sucedan adecuadamente. A pesar que la pastura original sea de alta calidad y el proceso de ensilaje sea correcto, los ensilados presentan menor valor nutritivo que el forraje fresco. Según Zea y Díaz (1996) el suministro de energía que hacen los ensilajes para los m.o. ruminales es menor que el de henos y otros forrajes frescos. Además se ha observado que las materias nitrogenadas de las pasturas son afectadas por el proceso de ensilaje, incrementándose tanto la fracción de rápida degradación como la no degradable (Repetto y col., 2005).

Suplementación

El objetivo principal que buscan los sistemas de producción de rumiantes al incorporar suplementos en la dieta, es optimizar el rendimiento por animal y por unidad de superficie (Kellaway y Harrington, 2004). La suplementación 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). 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).

Como las pasturas templadas aportan grandes cantidades de proteína, la energía suele ser el principal nutriente limitante. Por este motivo, los concentrados energéticos son habitualmente incluidos en las estrategias de alimentación (Bargo y col., 2002). Como suplementos energéticos pueden utilizarse granos de cereales, estos 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 FDN (8-9%).

La FDN está compuesta por celulosa y pentosanas, con un bajo contenido en lignina. El aporte de PB es bajo (10%). 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 FDN. El contenido en PB es de 11-12% (Repetto y col., 2003; Offner y col., 2003).

Al suplementar dietas forrajeras se afecta la fermentación dentro del rumen y se dan importantes cambios en el ambiente ruminal y en la actividad de los m.o. (Dixon y Stockdale, 1999). Existe una relación negativa entre la cantidad de almidón ruminal degradado y pH ruminal (Sauvant, 1999). El bajo pH afecta la degradación ruminal de la fibra y de la proteína, la eficiencia de síntesis de la proteína microbiana y los productos finales de la fermentación (Rotger y col., 2006; Naragaja y Titgemeyer, 2007). También se ha reportado que el uso de concentrados fibrosos (pulpa de citrus y cascarilla de soja) en lugar de concentrados con alto contenido de almidón no disminuye tanto el pH ruminal (Ipharraguerre y Clark, 2003; Bampidis y Robinson, 2006).

Bargo y col. (2003) sugieren que la interacción entre la cantidad y el tipo de concentrado suplementado y la cantidad y calidad de la pastura ofrecida podrían tener un papel clave. La suplementación de forrajes de alta calidad provoca una fermentación ruminal de diferentes características que cuando se suplementan forrajes de baja calidad, por lo tanto la repercusión sobre la digestibilidad es diferente. En ese sentido, Elizalde y col. (1999) observaron que la digestión ruminal de la fibra no es afectada a pesar de la disminución lineal del pH en novillos alimentados con alfalfa fresca en estado vegetativo y suplementados con tres niveles de maíz. También Cajarville y col. (2006) observaron menores valores de pH sin disminución de la degradación de las fracciones fibrosas, suplementando una pastura de alta calidad con maíz o trigo. de Veth y Kolver (2001) observaron en un sistema *in vitro* de cultivo continuo que una pastura de alta calidad (con predominancia de ryegrass) presentó una digestibilidad de la MS óptima a pH 6,35 y que la disminución más importante de la digestibilidad se presentó con valores de pH por debajo de 5,8. Además, con el uso de la suplementación no se han encontrado diferencias sobre la eficiencia de síntesis de proteína microbiana, estimada como la cantidad de N microbiano producido por día en función de la cantidad de materia orgánica (MO) fermentada en el rumen. En ese sentido, Sairanen y col. (2005) indican que la fermentación de pasturas de alta calidad provee suficiente energía para la síntesis de proteína microbiana y que la suplementación no mejoraría la eficiencia de síntesis.

Muchos estudios han demostrado el valor nutritivo, que tienen para los rumiantes, los subproductos de la agroindustria (Grasser y col., 1995; Bampidis y Robinson, 2006). Por lo tanto, podrían reemplazar a los cereales en las dietas de rumiantes, disminuyendo así la competencia entre la nutrición humana y animal por los cereales (Boucque y Fiems, 1988). Además, los subproductos representan una alternativa más económica para la alimentación del ganado, ventaja importante para disminuir los costos en las explotaciones agropecuarias y aumentar la rentabilidad del sistema (Grasser y col., 1995).

La cascarilla de soja (CS) es un subproducto del procesamiento industrial del grano de soja para la producción de aceite. La incorporación a la dieta de CS puede contribuir a la ingesta elevada de energía evitando al mismo tiempo una disrupción

de la funcionalidad del rumen. Se ha observado que puede suplantar al grano de maíz para hasta el 30% de la MS en dietas altas en granos sin que ello afecte la fermentación o la digestión en el tracto gastrointestinal (Ipharraguerre y Clark, 2003). Está compuesta principalmente de cáscara del poroto de soja, pequeños trozos de grano y puede haber algún grano de pequeño tamaño. Su presentación puede ser desagregado o peleteado (4 mm), con tamaño de partículas de 3 a 4 mm y menores y con abundante polvo resultado de la molienda de la soja (Acosta, 2009). Tiene un alto contenido de FDN (66%) y un aporte de PB de 11,8%. La fracción FDN es poco lignificada. El contenido de lignina oscila entre el 1,4% al 3,9% (Ipharraguerre y Clark, 2003).

La degradabilidad potencial de la CS es alta, pero su velocidad de degradación es lenta. Salado y col., (2005) informaron que la degradabilidad potencial de la fibra de CS tiene un valor cercano al 90%, 44 puntos porcentuales por encima del correspondiente valor del afrechillo de trigo. Sin embargo, la velocidad de degradación de la fibra de CS en el rumen es lenta (3,9 %/h), debido a las características estructurales de su pared celular (epidermis de células en empalizada). Esto tiene implicancias prácticas ya que el grado de digestión de la fibra resulta altamente dependiente del tiempo de permanencia del alimento en el rumen o de su velocidad de pasaje “kp”.

La sustitución de grano de trigo por cantidades crecientes de CS provocó un aumento lineal en las digestibilidades de la FDN y de la FDA en vacas Jersey en lactación alimentadas con una ración totalmente mezclada (Aikman y col., 2006). En ese sentido, Ipharraguerre y Clark (2003) indican que el aumento de la digestibilidad de la fibra puede estar asociado con la naturaleza degradable de la FDN de la CS y/o con la reducción de los efectos asociativos negativos del almidón sobre la digestión de la fibra; además postulan que este efecto positivo parecería ser independiente del pH ruminal. Ipharraguerre y col. (2002) obtuvieron un incremento lineal de la concentración de AGV totales y de la proporción de ácido acético utilizando dietas con proporción creciente de CS en detrimento del grano de maíz.

La utilización de CS como suplemento aumentó el flujo de N microbiano al duodeno al suplementar novillos alimentados con festuca, pero no la eficiencia de síntesis (Richards y col., 2006). Sin embargo, Ipharraguerre y col. (2002) no observaron diferencias en la cantidad de proteína microbiana producida por día ni en la eficiencia de síntesis al sustituir maíz por CS.

Producción de gas *in vitro*

Las características de fermentación de los alimentos en el rumen pueden ser evaluadas por métodos *in vivo* o *in vitro* (Van Soest, 1994). Para poder estimar el impacto que tiene la suplementación sobre el ambiente ruminal, es muy importante contar con métodos precisos, prácticos y rápidos para la evaluación de la calidad nutricional de los suplementos (Giraldo y col., 2006; Posada y col., 2006). Además, los nuevos programas de evaluación de dietas como el NRC (2001) y Cornell Net Carbohydrate and Protein System (1992) requieren información detallada de la cinética de digestión de las diferentes fracciones del alimento (Posada y col., 2006). Según Broderick (1994; citado por Giraldo y col., 2006), las determinaciones *in vivo* son consideradas generalmente las más exactas y adecuadas para determinar el valor nutricional de los alimentos en rumiantes, pero su implementación y puesta en

marcha, es un proceso laborioso y costoso, que requiere el empleo de grandes cantidades de alimento, la utilización de animales y la disposición de instalaciones para su cuidado.

La técnica de producción de gases es un método *in vitro* que permite determinar la extensión y la cinética de degradación de alimentos a través del volumen de gas producido durante el proceso fermentativo (Theodorou y col., 1994). Adicionalmente y no por eso menores, esta técnica brinda soluciones operativas como el bienestar animal, tamaño de la muestra y el costo (Williams, 2000). Se basa en el supuesto de que el gas producido en cultivos inoculados con m.o. mixtos del intestino grueso o contenido ruminal o heces está directamente relacionado con la cantidad de sustrato fermentado (López y col., 2007). 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).

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 en 1953 y Hungate en 1966 (Rymer y col., 2005). Theodorou y col. (1994) proponen y desarrollan la técnica de medición manual de la presión usando un transductor de presión y 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 en el interior del frasco.

Como desventaja se menciona la falta de uniformidad en las metodologías, lo que dificulta la comparación de resultados entre grupos de investigación (Williams, 2000).

El ajuste de los perfiles acumulados de gas a una apropiada ecuación permite resumir la información sobre la cinética (Williams, 2000). Así, la descripción matemática de las curvas de producción de gas permite la comparación de los sustratos, la evaluación de diferentes ambientes de fermentación y proporciona información sobre la composición del sustrato y las tasas de fermentación de los constituyentes solubles y estructurales (Groot y col., 1996; Noguera y col., 2004).

El análisis de los datos obtenidos a partir de la técnica de producción de gas *in vitro* 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. Los mejores modelos son aquellos que presentan el balance más adecuado 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 (Posada y Noguera, 2007).

Uno de los modelos más utilizados es el exponencial simple con tiempo de latencia (Figura 1), 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 m.o. ruminales. Cuando el sustrato es saturado con m.o. 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).

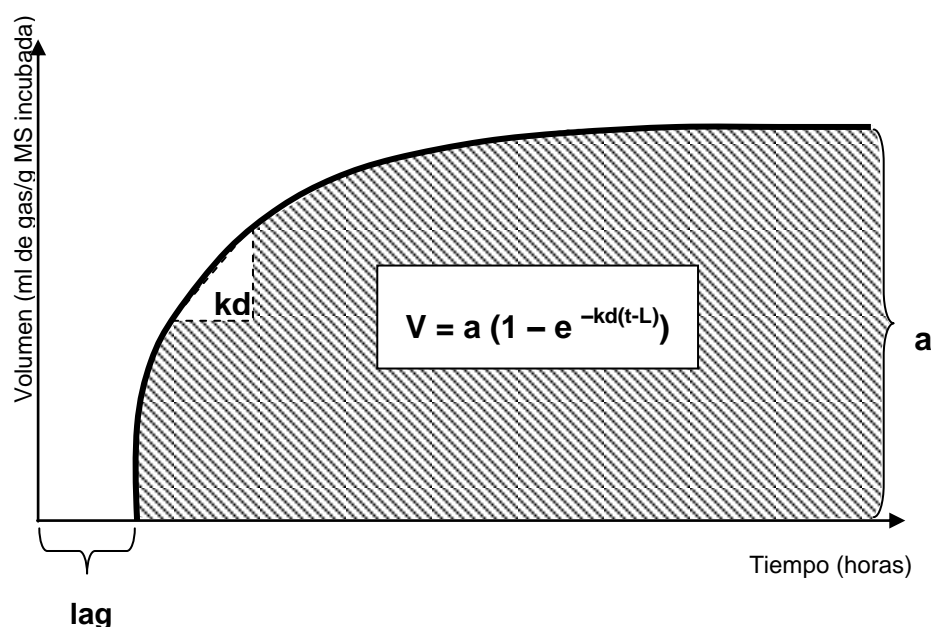


Figura 1. Volumen total de gas producido (mL/g MS incubada) en función del tiempo (h) obtenido por el modelo exponencial simple con latencia. a: producción potencial de gas (mL/g MSi); lag: tiempo de retardo en la producción de gas (h); kd: tasa de producción de gas (%/h); t: tiempo de incubación (h).

La técnica de producción de gas *in vitro* ha demostrado ser útil para la evaluación de mezcla de alimentos. Liu y col. (2002) incubaron primero dietas por separado y posteriormente en combinación, monitoreando la producción de gas e investigando efectos asociativos entre alimentos. Robinson y col., (2009) sostienen en ese sentido 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.

Si bien hay disponible una amplia bibliografía sobre los efectos de la suplementación a nivel ruminal, existen carencias de información en determinadas áreas. Por un lado, la información sobre suplementación de forrajes de alta calidad es escasa y a menudo no es concordante. Por otro lado, como ya se ha mencionado en el apartado anterior, hay pocos trabajos que estudien a la vez la cantidad y el tipo de concentrado energético, a pesar de que se ha indicado que son los factores más

importantes relacionados al suplemento que afectan variables productivas (Bargo y col., 2003). Es así que este trabajo intenta evaluar la fermentación ruminal, mediante una aproximación *in vitro*, de asociaciones de forraje de alta calidad con diferentes tipos y niveles de concentrados energéticos. De esta manera se pretende contribuir a la generación de información a nivel nacional sobre suplementación en rumiantes y así racionalizar el uso de los recursos alimenticios.

HIPÓTESIS

- La inclusión de concentrados energéticos a una dieta con ensilaje de pastura 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 energéticos disminuirán el volumen de producción de gas con respecto a porcentajes de inclusión medios o bajos.
- Con la inclusión de cascarilla de soja, un concentrado fibroso, suceden los mismos fenómenos que con la inclusión de concentrados energéticos almidonáceos pero en menor magnitud.

OBJETIVOS

Objetivo general

El objetivo general del presente trabajo fue comparar la fermentescibilidad ruminal *in vitro* de muestras compuestas de un ensilaje de pastura de alta calidad y proporciones crecientes de cascarilla de soja, maíz o cebada.

Objetivos específicos

- Determinar los parámetros de la producción de gas *in vitro* de muestras compuestas por diferentes proporciones de ensilaje de pastura de alta calidad y cascarilla de soja, maíz o cebada.
- 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*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo experimental se llevó a cabo en la Unidad de Digestión y Metabolismo Ruminal del Departamento de Nutrición Animal en el Campo Experimental N° 2 de la Facultad de Veterinaria-UdelaR (San José, Uruguay, 34° 41' S y 56° 32' 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-UdelaR (Montevideo, Uruguay). El manejo y cuidado de la vaca donante de líquido ruminal fue aprobado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal de la Facultad de Veterinaria-UdelaR.

Diseño experimental

Se prepararon muestras compuestas por ensilaje de pastura de alta calidad y cascarilla de soja, grano de maíz o grano de cebada. El ensilaje provino de una pastura compuesta por una mezcla con predominio de ryegrass (*L. multiflorum*) y tréboles (*T. pratense* y *T. repens*). Cada concentrado se incluyó en las mezclas en proporciones crecientes de a 10% desde 0 a 100% (n=31) (Cuadro I). Previo a la confección de las mezclas, los alimentos fueron secados a 60° C en estufa de aire forzado por 48 h y luego molidos en un molino de rotor con criba de 1 mm (Fritsch GMBH, Idar-Oberstein, Alemania).

Cuadro I. Composición de las muestras según proporción de forraje (ensilaje de pastura de alta calidad) y 3 concentrados cascarilla de soja, grano de maíz o grano de cebada.

Nº	%EP	%CS	Nº	%EP	%M	Nº	%EP	%C
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						

EP: Ensilaje de Pastura; CS: Cascarilla de Soja; M: Maíz; C: Cebada

La composición química de los componentes individuales de las mezclas se presenta en el Cuadro II. Cada mezcla fue utilizada como sustrato para estimar su fermentabilidad ruminal mediante la técnica de producción de gas *in vitro*, utilizando como inóculo líquido ruminal de una vaca Holstein en lactación (580 kg de PV), provista de cánula ruminal, que consumía únicamente el mismo ensilaje de pastura de alta calidad utilizado en las mezclas. Cada muestra fue incubada por triplicado y además tres frascos de fermentación sin sustrato fueron incluidos como blancos de inóculo para corregir fermentación propia del líquido ruminal. Los datos de producción de gas se ajustaron a un modelo exponencial simple con tiempo de latencia.

Cuadro II. Composición química de los alimentos.

Composición química	Ensilaje de Pastura	Cascarilla de soja	Grano de Maíz	Grano de Cebada
MS (%)	22,6	90,2	88,4	89,5
MO (% MS)	86,8	93,9	98,7	95,6
PB (% MS)	16,7	15,4	8,6	9,4
FDN (% MS)	44,9	57,0	12,1	22,9
FDA (% MS)	31,9	39,0	3,4	8,7

MS: Materia Seca; MO: Materia Orgánica; PB: Proteína Bruta; FDN: Fibra Detergente Neutro; FDA: Fibra Detergente Ácido

Técnica de producción de gas *in vitro*

Se utilizó el procedimiento descrito por Theodorou y col. (1994) modificado por Mauricio y col. (1999). Se colocaron 0,5 g de cada uno de los 31 sustratos en los frascos de fermentación de vidrio de 125 mL de capacidad. Como medio de incubación, 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 como propone Williams y col. (2005) (Cuadro III). A continuación fueron tapados con septos de goma butilo y permanecieron a 4° C por una noche para hidratar el sustrato. Previo a inocular con líquido ruminal fresco, se realizó la incubación de los frascos en baño maría (39° C) y allí se mantuvieron por todo el período de mediciones. Para obtener el líquido ruminal de la vaca donante, 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° C. Inmediatamente el líquido fue transportado al laboratorio y sometido a gaseado permanente con CO₂ mientras duró el proceso de inoculación. Cada frasco fue inoculado con 10 mL de fluido ruminal, se tapó con tapones de goma y se selló con precintos de aluminio. Todas las manipulaciones se realizaron bajo un flujo de CO₂ para mantener la anaerobiosis.

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

SOLUCIÓN BASAL LIBRE DE N (g/l de agua destilada)	
KCl	0,60
NaCl	0,60
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,20
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,50
KH ₂ PO ₄	1,46
Na ₂ HPO ₄	3,55
Solución minerales traza (g/l de HCl 0,02 molar) 10 mL por litro de Solución basal	
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,03
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,02
ZnCl ₂	0,03
CuCl ₂ ·H ₂ O	0,03
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,05
SeO ₂	5,00
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0,25
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25
NaVO ₃	0,03
H ₃ BO ₃	0,25
Solución hemina (g/l de agua destilada) 10 mL por litro de Solución Basal	
Hemina	0,10
SOLUCIÓN REDUCTORA (g/l de agua destilada)	
Na ₂ S ₉ H ₂ O	20,50
SOLUCIÓN BUFFER (g/l de agua destilada)	
Na ₂ CO ₃	82,00

Las mediciones de presión de gas se realizaron a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 48, 72 y 96 h luego de la inoculación con un manómetro digital (Cole Parmer Instrument Co., Vernon Hills, IL, USA) al que se le adaptó una jeringa con aguja hipodérmica 21G. Luego de cada medición se procedió a realizar el “venting”, para que no se acumulara presión, dejando insertada una aguja hipodérmica para permitir el escape de gas. Posteriormente todos los frascos de fermentación fueron sometidos a un suave agitado manual para mezclar el contenido. El volumen de gas fue estimado a partir de los datos de presión mediante la ecuación: $V = 4.40 P + 0.09 P^2$ (V es el volumen estimado en mL y P es la presión observada en psi) obtenida en un experimento previo realizado en condiciones similares.

Los datos de volumen de gas estimados de cada frasco de fermentación se ajustaron por regresión no lineal utilizando PROC NLIN de SAS® al siguiente modelo exponencial simple con tiempo de latencia:

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

V = volumen de gas producido a tiempo t (mL/g MS incubada)

a = producción potencial de gas (mL/g MS incubada)

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

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

t = tiempo (h)

Análisis químicos

Previo a los análisis (excepto para MS) los alimentos fueron secados en estufa a 60° C durante 48 h y luego se molieron en un molino de rotor con criba de 1 mm (Frich GMBH, Idar-Oberstein, Alemania). La MS se determinó secando el material a 105° C hasta peso constante.

Cenizas y PB se determinaron siguiendo los métodos propuestos por AOAC (1990), y la MO se calculó por diferencia (%MO = 100 - % de Cenizas). Se siguió el sistema de detergentes propuesto por Robertson y Van Soest (1981) para las determinaciones de FDN y FDA, utilizando un equipo ANKOM²²⁰ (ANKOM Technology Corp., Macedon, NY, USA) con α -amilasa termoestable. Todas las muestras se analizaron por duplicado, aceptando coeficientes de variación intra análisis menores al 5%.

Análisis estadísticos

El efecto del nivel de inclusión de cada concentrado sobre la producción potencial, la tasa fraccional y el tiempo de latencia de la producción de gas *in vitro* fue estudiado mediante regresiones lineales y cuadráticas utilizando el procedimiento PROC REG de SAS® (versión 8.02, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). La unidad experimental fue el frasco de fermentación. En los casos en que la inclusión de concentrado provocaba un efecto lineal sobre la variable, la respuesta al incremento del nivel de concentrado se comparó entre concentrados mediante la comparación de las pendientes de las curvas de regresión de acuerdo con el modelo:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x + \beta_2 z_{CdeS} + \beta_3 z_M + \beta_4 x * z_{CdeS} + \beta_5 x * z_M + \varepsilon$$

donde Y es el parámetro de producción de gas *in vitro* estudiado, x es el nivel de suplemento, z_{CdeS} es una variable ficticia dicotómica (“dummy”) con valor 1 si el concentrado presente era cascarilla de soja y valor 0 en otro caso, y z_M otra variable ficticia con valor 1 si el concentrado presente era maíz y valor 0 en otro caso. La hipótesis nula puesta a prueba fue que los coeficientes de regresión de los concentrados eran iguales. Si las pendientes eran diferentes, se compararon entre sí utilizando PROC GLM de SAS[®] (versión 8.02, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando $P < 0,05$ y se consideraron tendencias cuando $0,05 < P < 0,10$.

RESULTADOS

En el cuadro IV se presentan las medias de los parámetros de producción de gas según el nivel de inclusión de cascarilla de soja, maíz y cebada. Como consecuencia de los incrementos en los niveles de inclusión de cascarilla de soja y maíz, los volúmenes de gas (a) mostraron respuestas lineales ($P<0,001$) y cuadráticas ($P<0,001$), aumentando a tasas crecientes. Asimismo, las velocidades de producción de gas (kd) presentaron respuestas lineales ($P<0,001$) y cuadráticas ($P<0,001$), pero disminuyeron a tasas decrecientes. Mientras, el aumento del nivel de inclusión de la cebada provocó que la producción de gas (a) aumentara linealmente ($P<0,001$) y que la velocidad de producción de gas (kd) disminuyera linealmente ($P<0,001$). El tiempo de latencia de la producción de gas (L) presentó sólo respuestas lineales al aumento de la inclusión de maíz y cebada ($P<0,001$).

Cuadro IV. Efectos del incremento del nivel de inclusión de cascarilla de soja, grano de maíz o grano de cebada a un ensilaje de pastura de alta calidad sobre los parámetros de producción de gas *in vitro*.

Parámetro	Concentrado	Nivel de inclusión de concentrado (%)											Lineal			Cuadrático		
		0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	P	R ²	DER	P	R ²	DER
a (mL/g MS incubada)	Cascarilla de soja	174	189	200	213	238	235	249	276	286	293	<0,001	0,953	9,850	<0,001	0,953	10,01	
	Grano de maíz	158	171	191	195	217	223	236	251	265	267	301	<0,001	0,973	7,160	<0,001	0,973	7,223
	Grano de cebada	200	183	196	204	217	240	240	246	263	279	<0,001	0,788	7,253	0,055	0,789	18,28	
kd (h ⁻¹)	Cascarilla de soja	0,10	0,09	0,08	0,07	0,07	0,06	0,06	0,05	0,05	0,04	<0,001	0,920	0,007	<0,001	0,974	0,004	
	Grano de maíz	0,12	0,11	0,10	0,09	0,08	0,07	0,06	0,05	0,05	0,04	<0,001	0,980	0,004	<0,001	0,986	0,003	
	Grano de cebada	0,09	0,11	0,11	0,11	0,10	0,09	0,09	0,08	0,07	0,06	<0,001	0,645	0,004	0,973	0,678	0,011	
L (h)	Cascarilla de soja	1,12	1,23	1,22	1,23	1,27	1,10	1,22	1,14	1,18	1,01	0,318	0,034	0,174	0,327	0,087	0,172	
	Grano de maíz	1,18	1,36	1,35	1,51	1,42	1,49	1,51	1,64	1,79	2,07	2,44	<0,001	0,708	0,208	0,159	0,809	0,171
	Grano de cebada	0,85	1,37	1,42	1,50	1,46	1,41	1,45	1,71	1,83	2,06	<0,001	0,510	0,174	0,620	0,520	0,271	

a: Producción potencial de gas (mL de gas/g MS incubada); kd : tasa fraccional de producción de gas (h⁻¹); L: tiempo de retardo en la producción de gas (h); P: nivel de significancia observado; R²: coeficiente de determinación; DER: desviación estándar de regresión

En la Figura 2 se presentan las ecuaciones de regresión lineales de la producción potencial de gas (a) en función del porcentaje de inclusión de cada suplemento. La respuesta al incremento del nivel de inclusión de suplemento difirió significativamente según el alimento ($P=0,007$), presentando la inclusión de cascarilla de soja y de maíz mayores tasas de incremento que la inclusión de cebada ($P<0,05$).

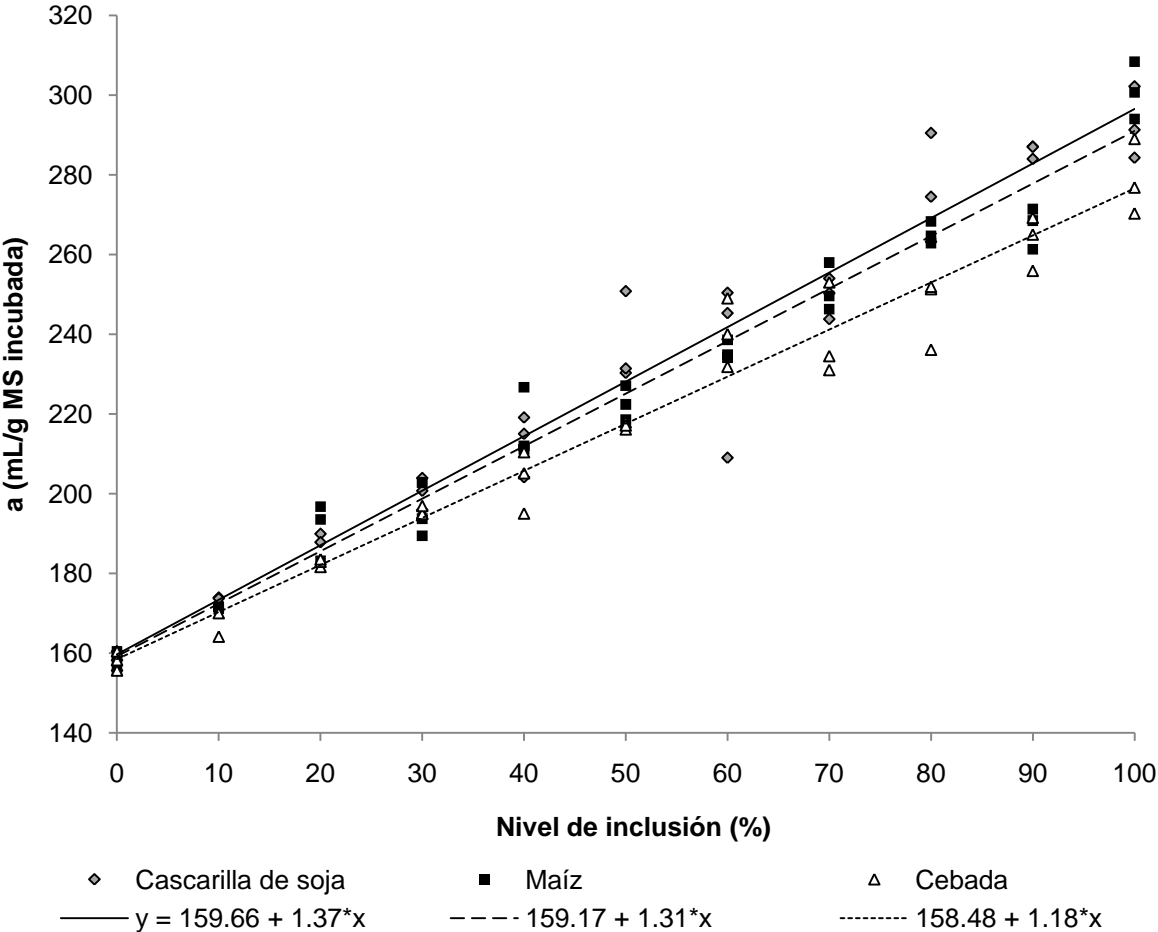


Figura 2. Producción potencial de gas (a) en función del porcentaje de inclusión de cascarilla de soja, grano de maíz y grano de cebada.

La Figura 3 presenta las ecuaciones de regresión lineales de la tasa fraccional de producción de gas (kd) en función del porcentaje de inclusión de suplemento. También fueron diferentes las pendientes de las curvas de regresión de la velocidad de producción de gas ($P < 0,001$) entre los alimentos. Cuando se utilizó maíz la disminución de la velocidad fue la más acusada, seguida por la inclusión de cascarilla de soja y la menos pronunciada fue con la inclusión de cebada ($P < 0,05$).

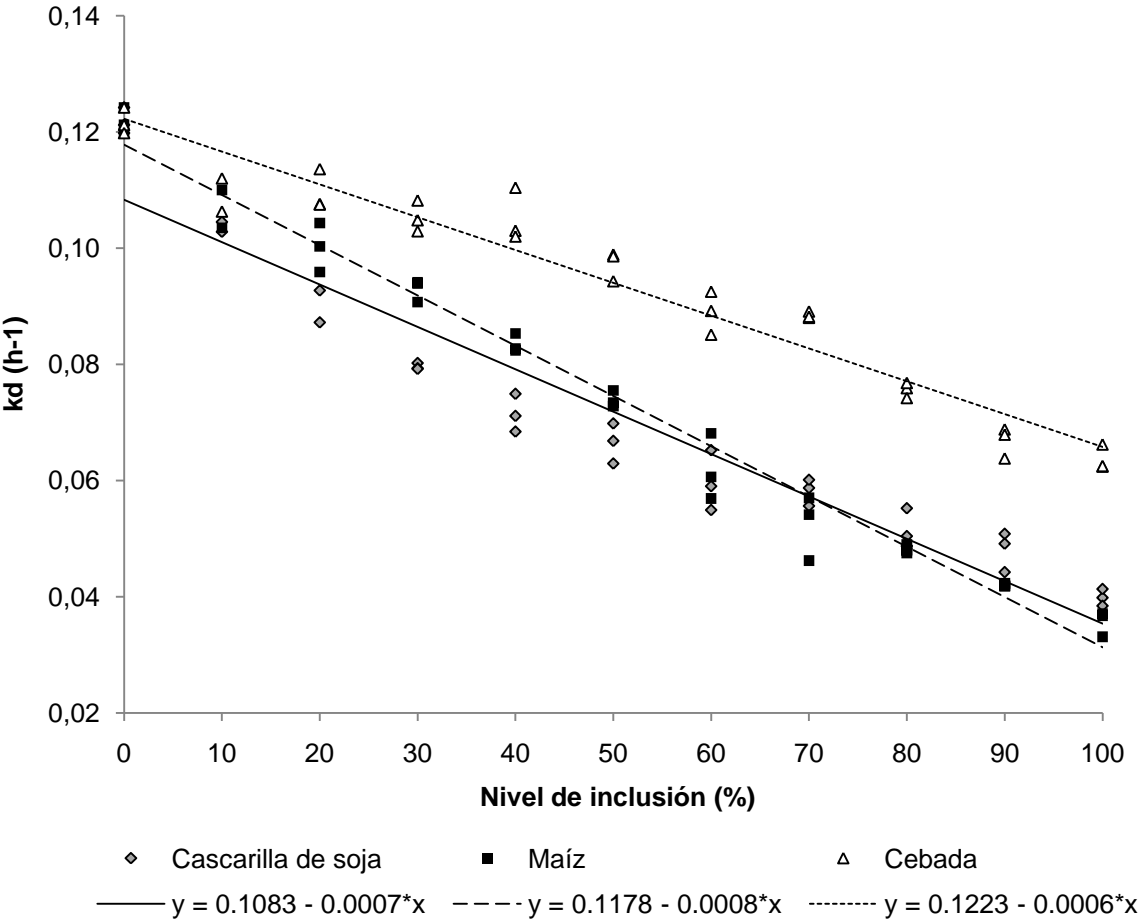


Figura 3. Tasa fraccional de producción de gas (kd) en función del porcentaje de inclusión de cascarilla de soja, grano de maíz y grano de cebada.

Las respuestas lineales del tiempo de latencia (L) al incremento del nivel de inclusión del maíz y la cebada se muestran en la Figura 4, puesto que la inclusión de cascarilla de soja no presentó respuestas lineales ni cuadráticas. La extensión del tiempo de latencia con el incremento de nivel de cebada tendió a ser menor que para el maíz ($P=0,052$).

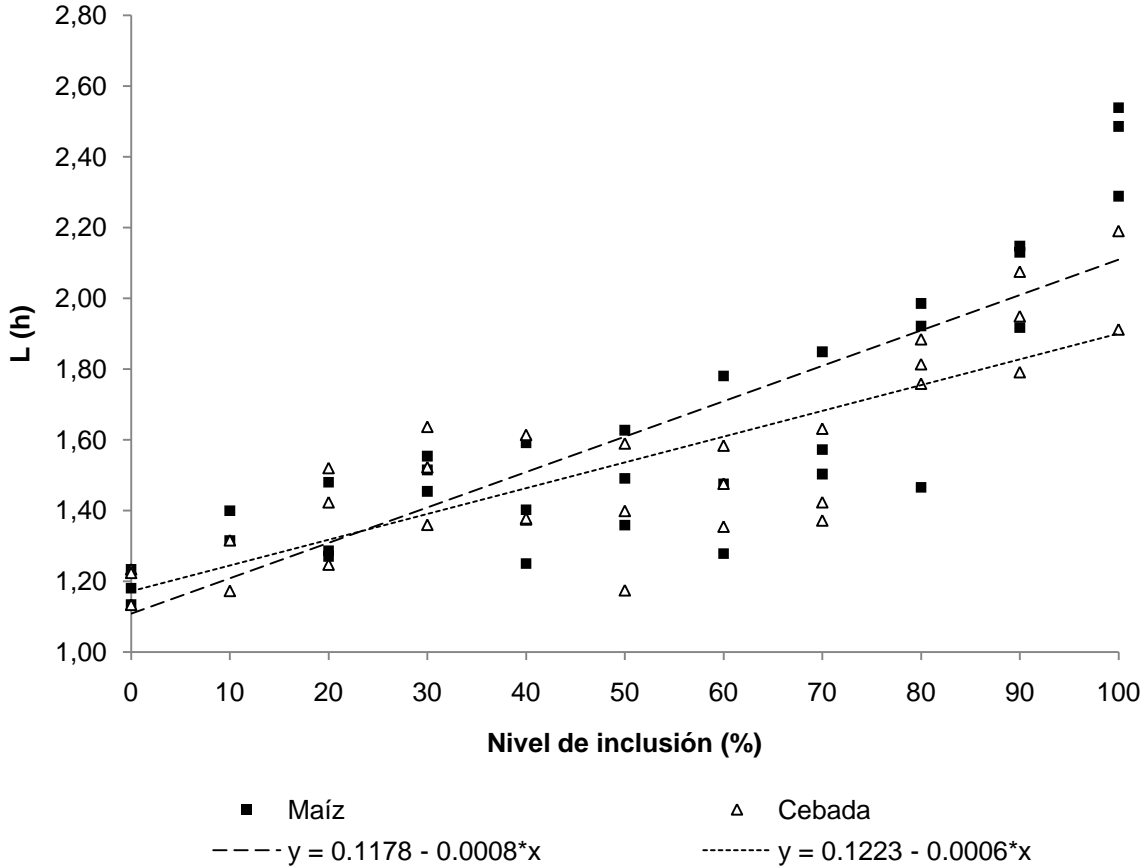


Figura 4. Tiempo de retardo en producción de gas (L) en función del porcentaje de inclusión de cascarilla de soja, grano de maíz y grano de cebada.

DISCUSIÓN

Las respuestas obtenidas al aumentar los niveles de inclusión de los tres concentrados no fueron las esperadas, más allá del aumento en el volumen de gas generado por el aumento de sustrato fermentable. Más precisamente, los resultados en la tasa de producción de gas y tiempo de latencia fueron diferentes a los proyectados.

La inclusión de cascarilla de soja produjo un incremento del volumen de gas similar al causado por el maíz, mientras que la adición de cantidades crecientes de cebada provocó un incremento menos acusado. La diferencia entre la inclusión de los dos granos de cereales coincide con lo descrito por Lanzas y col. (2007), que observaron mayor volumen de gas *in vitro* producido por el maíz que por la cebada. El pronunciado incremento de la producción de gas con el uso de cascarilla de soja puede ser debido a su alta proporción de FDN fermentable. Este hecho puede llevar a una mayor producción de CH₄ así como también a una mayor proporción relativa de ácido acético. En ese sentido, Getachew y col. (1998) indican que si la fermentación ruminal *in vitro* produce mayor proporción de ácido acético habrá concomitantemente una mayor producción de gas. Además, se ha reportado que la producción ruminal de AGV totales se incrementa a expensas del aumento de ácido acético cuando se aumentó la proporción de cascarilla de soja en una dieta totalmente mezclada para vacas en lactación (Ipharraguerre y col., 2002a).

Barrios-Urdaneta y col. (1997) reportaron un descenso lineal del volumen de gas al suplementar paja de cebada con niveles crecientes (0, 15, 30, 45 y 60 % de MS) de almidón soluble, pero la suplementación con pectina no lo afectó. Los autores sugieren que la pectina promovería un mejor aprovechamiento de la paja a nivel ruminal que el almidón. Sin embargo en nuestro trabajo utilizando forraje de alta calidad, el incremento de niveles de los tres concentrados usados aumentó el volumen de gas. Si bien es de remarcar, que el concentrado con almidón más degradable (cebada) presentó el aumento menos acusado.

Inesperadamente la velocidad de producción de gas disminuyó al aumentar el nivel de concentrados, a pesar de que estos tienen mayor proporción de compuestos más fermentescibles que el forraje. Esta reducción probablemente sea debida a que el líquido ruminal utilizado como inóculo provino de una vaca alimentada exclusivamente con ensilaje de pastura, por consiguiente con una microbiota ruminal más adaptada a la degradación de fibra que a la de otras fuentes de carbohidratos. Según Rymer y col. (2005) el inóculo es la principal fuente de variación en la producción de gas. 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. Según Williams (2000), todas las descripciones de producción de gas deberán describir detalladamente las condiciones del animal donador.

La inclusión de maíz mostró la disminución más acusada de la tasa de producción de gas, en el mismo sentido de lo reportado por Lanzas y col. (2007), que

observaron que el maíz presentó una tasa de producción de gas menor que la cebada y el trigo incubados individualmente. Este fenómeno probablemente es debido a la lenta degradación ruminal del almidón del maíz (Offner y col., 2003). 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, pero 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 afirmaron que la suplementación no afecta la digestión de pastura de vacas lecheras *in situ*, excepto por la reducción en la tasa de degradación cuando los animales fueron suplementados con altas cantidades de concentrado. En nuestro trabajo, la inclusión de cascarilla de soja también redujo la velocidad de producción de gas de forma similar a los concentrados altos en almidón.

De forma no prevista, el tiempo de latencia aumentó a medida que se incrementaba el nivel de inclusión de los granos de cereales. Este hallazgo reflejaría el proceso de adaptación de la microbiota del inóculo a los sustratos. Debido a la dieta forrajera que estaba consumiendo el animal donante hace que la microbiota ruminal debió adaptarse a las cantidades crecientes de almidón. Esta observación está en concordancia con lo indicado por Mc Allister y col. (1994) que el consorcio microbiano se vuelve estable cuando madura y se adapta a un tipo de alimento. Es por esto que los cambios en la alimentación pueden afectar la adhesión y colonización bacteriana y la formación del biofilm microbiano.

Sin embargo, la inclusión de cascarilla de soja no afectó el tiempo de latencia, probablemente debido al aumento de sustratos para las bacterias celulolíticas que provoca una mayor adherencia a las paredes celulares. En ese sentido, Barrios-Urdaneta y col. (2000) reportaron mayor adherencia bacteriana a paredes celulares de paja a las 8 y 12 h de incubación en un medio suplementado con una fuente de fibra soluble comparado con medios suplementados con almidón o azúcares.

CONCLUSIONES

La utilización de diferentes tipos de concentrados energéticos como suplementos de ensilaje de pastura causó respuestas similares de los parámetros de fermentación *in vitro* aunque en diferente magnitud.

La inclusión de cantidades crecientes de concentrados energéticos a forrajes de alta calidad produjo un aumento en la producción potencial de gas pero disminuyó su velocidad. La inclusión de cascarilla de soja a un ensilaje de pastura de alta calidad produjo un mayor incremento en el volumen de gas que la cebada.

Suplementar con cascarilla de soja causaría los mismos efectos a nivel ruminal y podría sustituir a los concentrados con alto contenido de almidón. Deberían tomarse las mismas precauciones que con los cereales al momento de suministrarlos a los animales, a pesar de que no afecte la adherencia microbiana *in vitro*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Acosta, Y. (2009). Conceptos sobre alimentación de ganado de carne y leche. Rev INIA 17:6-9.
- 2) Aikman, P.C., Beever, D.E., Humphries, D.J. (2006). The effect of incremental replacement of wheat with soya hulls in diets for Jersey cows on lactational performance, diet digestibility and feeding behaviour. Livest Sci 104:23-32.
- 3) 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.
- 4) Association of Official Analytical Chemists (1990). Oficial Methods of Analysis, 15^a ed. AOAC, Arlington, 1123p.
- 5) Bach, A., Calsamiglia, S., Stern, M.D. (2005). Nitrogen metabolism in the rumen. J Dairy Sci 88: (E. Suppl.): E9–E21.
- 6) Bampidis, B.A., Robinson, P.H. (2006). Citrus by-products as ruminant feeds: a review. Anim Feed Sci. Technol 128:175-217.
- 7) Bargo, F., Rearte, D.H., Santini, F.J., Muller, L.D. (2001). Ruminant digestion by dairy cows grazing winter oats pasture supplemented with different levels and sources of protein. J Dairy Sci 84:2260-2272.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) Barrios-Urdaneta, A., Fondevila, M., Balcells, J., Dapoza, C., Castrillo, C. (2000). *In vitro* microbial digestion of straw cell wall polysaccharides in response to supplementation with different sources of carbohydrates. Aust J Agric Res 51(3): 393-400.
- 12) Boucque, C.H.V., Fiems, L.O. (1988). Vegetable by-products of agro-industrial origin. Livest Prod Sci 19: 97-135.
- 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 87: (E. Suppl.) 2. J Dairy Sci 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) Cajarville C., Aguerre M., Repetto, J.L. (2006). Rumen pH, NH₃-N concentration and forage degradation kinetics of cows grazing temperate pastures and supplemented with different sources of grain. Anim Res 55:511-520.
 - 16) 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://fundacionfedna.org/sites/default/files/02CAP_VI.pdf Fecha de Consulta: 16 de Noviembre de 2012.
 - 17) Church, D.C. (1988). Función y producción de saliva. En: Church, D.C., El Rumiante: Fisiología Digestiva y Nutrición, Zaragoza, Acribia. p.127-135.
 - 18) de Veth, M.J., Kolver, E.S. (2001). Digestion of ryegrass pasture in response to change in pH in continuous culture. J Dairy Sci 84:1449-1457.
 - 19) DIEA (2012). Uruguay; Ministerio de Ganadería Agricultura y pesca. Estadísticas agropecuarias. Montevideo, Uruguay, Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/hqxpp001.aspx?7,5,659,O,S,0,MNU:E:27;8;MNU;> Fecha de Consulta: 23 de Abril de 2013.
 - 20) Dixon, R.M., Stockdale, C.R. (1999). Associative effects between forages and grains: consequences for feed utilization. Aust J Agric Res 50:757-773.
 - 21) Elizalde, J.C., Santini, F.J (1992). Factores nutricionales que limitan las ganancias de peso en bovinos durante el período otoño-invierno. Bol Téc, EEA INTA. Balcarce, Argentina. Nº 104 27 p.
 - 22) Elizalde, J.C., Merchen, N.R., Faulkner, D.B. (1999). Supplemental cracked corn for steers fed fresh alfalfa: I. Effects on digestion of organic matter, fiber, and starch. J Anim Sci 77:457-466.
 - 23) Elizalde, J.C. (2003). Alternativas de manejo para engorde de vacunos en sistemas pastoriles. XXXI Jornadas Uruguayas de Buiatría, Paysandú, Uruguay. p 45-55.
 - 24) Getachew G., Blümel M., Makaar H.P.S., Becker K. (1998). In vitro gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. Anim Feed Sci Technol 72:261-281.
 - 25) Giraldo, L.A., Gutiérrez, L.A., Sánchez, J. y Bolívar, P.A. (2006). Relación entre presión y volumen para el montaje de la técnica *in vitro* de producción de gases

en Colombia. *Livestock Research for Rural Development* 18. Disponible en: <http://www.lrrd.org/lrrd18/6/gira18075.htm> Fecha de consulta: 23 de abril de 2013.

- 26) Gómez, P.O. (1997). Aspectos relevantes a tener en cuenta en los sistemas de producción animal en pastoreo. En: Cangiano, C. (Ed) *Producción animal en pastoreo*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Balcarce. Buenos Aires. p.1-4.
- 27) 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.
- 28) 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.
- 29) Groot, J.C.J., Cone, J.W., Williams, B.A., Debersaques, F.M.A., Lantinga, E.A. (1996) Multiphasic analysis of gas production kinetics for in vitro fermentation of ruminant feeds. *Anim Feed Sci Technol* 64: 74-89.
- 30) Huntington, G.B. (1997). Starch utilization by ruminants: from basics to the bunk. *J Anim Sci* 75:852-867.
- 31) Ipharraguerre, I.R., Shabi, Z., Clark, J.H., Freeman, D.E. (2002a). Ruminal fermentation and nutrient digestion by dairy cows fed varying amounts of soyhulls as a replacement for corn grain. *J Dairy Sci* 85:2890-2904.
- 32) Ipharraguerre, I.R., Ipharraguerre, R.R., Clark, J.H. (2002b). Performance of lactating dairy cows fed varying amounts of soyhulls as a replacement for corn grain. *J Dairy Sci* 85: 2905-2912.
- 33) Ipharraguerre I.R., Clark, J.H. (2003). Soyhulls as an alternative feed for lactating dairy cows: a review. *J Dairy Sci* 86:1052-1073.
- 34) Kamra, D.N. (2005). Rumen microbial ecosystem. *Curr Sci* 89:124-135.
- 35) Kellaway, R., Harrington, T. (2004). General summary. En: Kellaway, R., Harrington, T., *Feeding concentrates: supplements for dairy cows*. 2^a ed. Melbourne, CISRO, p 1-4.
- 36) 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.
- 37) Lanzas, C., Fox, D.G., Pell, A.N. (2007). Digestion kinetics of dried cereal grains. *Anim Feed Sci Technol* 136:265–280.
- 38) 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.

- 39) 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.
- 40) 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.
- 41) 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.
- 42) 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.
- 43) Maynard, L.A, Loosli, J.K., Hintz, H.F., Warner, R.G. (1981). *Nutrición Animal*, 4a ed. Mexico, Mc Graw Hill, 640p.
- 44) 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.
- 45) McDonald, P., Edwards, R.A., Greenhalgh, J.F.D., Morgan, C.A. (2006). *Nutrición Animal*, 6a.ed. Zaragoza, Acribia. 587 p.
- 46) 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.
- 47) 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.
- 48) 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.
- 49) Naragaja, T.G., Titgemeyer, E.C. (2007). Ruminal acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook. *J Dairy Sci* 90 (E.Suppl): E17-E38.
- 50) 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.lrrd.org/lrrd16/11/nogu16086.htm>
Fecha de consulta: 8 de abril de 2013.
- 51) Offner, A., Bach, A., Sauvant, D. (2003). Quantitative review of in situ starch degradation in the rumen. *Anim Feed Sci Technol* 106:81-93.
- 52) Owens, F.N., Goetsch, A.L. (1988). Fermentación ruminal. En: Church, D.C., *El Rumiante: Fisiología Digestiva y Nutrición*, Zaragoza, Acribia. p.159-189.

- 53) Posada, S.L., Noguera, R., Bolívar, D. (2006). Relación entre presión y volumen para la implantación de la técnica *in vitro* de producción de gases en Medellín, Colombia. *Rev Col Cienc Pec* 19: 407-414.
- 54) 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.
- 55) Rearte, D.H. (1992) Alimentación y composición de la leche en los sistemas pastoriles. CERBAS-INTA. Balcarce. 94 p.
- 56) Rearte, D.H.; Pieroni, G.A. (2001). Supplementation of temperate pastures. International Grassland Congress, São Pedro. Sociedade Brasileira de Zootecnia, p.679-689.
- 57) Rearte, D.H., Santini, F.J. (1989). Digestión ruminal y producción en animales a pastoreo. *Rev Arg Prod Anim* 9: 93-105.
- 58) Repetto, J.L., Cajarville, C., Curbelo, A., Sapriza, D., (2003). Módulo IV: Suplementos. Curso a distancia sobre Nutrición de Rumiantes. Montevideo, Uruguay. p 1-155.
- 59) 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.
- 60) Restaino, E., Fernández, E., La Manna, A. (2009). Predicción del valor nutritivo de ensilaje de pasturas mediante espectrofotometría en el infrarrojo cercano (NIRS). *Chilean J Agric Res* 69 (4):560-566.
- 61) Richards, C.J., Pugh, R.B., Waller, J.C. (2006). Influence of soybean hull supplementation on rumen fermentation and digestibility in steers consuming freshly clipped, endophyte-infected tall fescue. *J Anim Sci* 84:678-685.
- 62) Robertson, J.B., Van Soest, P.J. (1981). The detergent system of analysis. En: James, W.P.T., Theander, O. (Eds.), *The Analysis of Dietary Fibre in Food*. New York, Dekker, p.123-158.
- 63) 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.
- 64) Rosso, O.R. (1997). Suplementación Energética en Pastoreo. En: Cangiano, C. (Ed). *Producción animal en pastoreo*. Balcarce, INTA. p 85-101.
- 65) Rotger, A., Ferret, A., Calsamiglia, S., Manteca, X. (2006). Effects of nonstructural carbohydrates and protein sources on intake, apparent total tract digestibility, and ruminal metabolism *in vivo* and *in vitro* with high-concentrate beef cattle diets. *J Anim Sci* 84:1188-1196.
- 66) Russell, J.B., Hespell, R.B. (1981). Microbial rumen fermentation. *J Dairy Sci* 64:1153-1169.

- 67) 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.
- 68) Sairanen, A., Khalili, H., Nousiainen, J.I., Ahvenjärvi, S., Huhtanen, P. (2005). The effect of concentrate supplementation on nutrient flow to the omasum in dairy cows receiving freshly cut grass. *J Dairy Sci* 88:1443-1453.
- 69) Salado, E.E., Comeron, E.A., Silva, C., Gaggiotti, M.C., Alesso, A. Pardo, J. (2005). Cascarrilla de soja y afrechillo de trigo: cinética de la degradabilidad ruminal de la fibra. XIXª Reunión de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal. Tampico, México, p.1-4.
- 70) 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 Technol* 101: 191–200.
- 71) 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://anterior.inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/ganaderia/bovinos/nutricion/SANTINI.pdf> Fecha de Consulta: 16 de Noviembre de 2012.
- 72) Sauvant, D. (1999). Influences of feeding level and type of starch on its digestion in cattle. *Sci Alim* 19:499–503.
- 73) Statistical Analysis Systems. SAS®, versión 8.2 para Windows, User's Guide. Statistics. Statistical Analysis Systems Institute. Inc., Cary, North Carolina; 2001.
- 74) 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.
- 75) 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.
- 76) Van Soest, P.J. (1982) *Nutritional Ecology of the Ruminant*. Oregon, Corvallis. 374 p.
- 77) 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.
- 78) Van Soest, P.J. (1994). *Nutritional Ecology of the Ruminant*. 2a Ed. Cornell University Press. 476 p.
- 79) Van Vuuren, A.M., Van der Koelen, C.J., Vroons de Bruin, J. (1993a). 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

- 80) Van Vuuren, A.M., Van der Koelen, C.J., Valk, H., De Visser, H. (1993b). 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.
- 81) 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.
- 82) 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. p.189-213.
- 83) Yokohama, M.T.; Johnson, K.A. (1988). Microbiología del rumen e intestino En: Church, D.C., *El Rumiante: Fisiología Digestiva y Nutrición*, Zaragoza, Acribia. p.137-158.
- 84) Zea, J., Díaz, M. (1996). Utilización de pastos y ensilados en la producción de carne de vacuno. *Rev Pastos* 26:129-173.
- 85) Zebeli, Q., Mansmann, D., Steingass, H., Ametaj, B.N. (2010). Balancing diets for physically effective fibre and ruminally degradable starch: a key to lower the risk of sub-acute rumen acidosis and improve productivity of dairy cattle. *Livest Sci* 127:1-10.