



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**EVALUACIÓN DE UN MÉTODO *IN VITRO* PARA ESTIMAR LA
DEGRADABILIDAD RUMINAL DE LOS COMPUESTOS
NITROGENADOS**

GONZALO FERNANDEZ TURREN

TESIS DE MAESTRÍA EN NUTRICIÓN DE RUMIANTES

**URUGUAY
2016**



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**EVALUACIÓN DE UN MÉTODO *IN VITRO* PARA ESTIMAR LA
DEGRADABILIDAD RUMINAL DE LOS COMPUESTOS
NITROGENADOS**

GONZALO FERNANDEZ TURREN

CECILIA CAJARVILLE	GILBERTO V. KOZLOSKI	JOSE L. REPETTO
Prof. PhD.	Prof. PhD.	Prof. PhD.
Director de Tesis	Co-Director	Co-Director

2016

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE

DEFENSA DE TESIS

2016

**EN ESTA HOJA VA LA COPIA DEL
ACTA DE DEFENSA DE TESIS**

En esta hoja va el Informe del Tribunal

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, y en especial a mis padres y hermano por ser referencia importante en mi vida y ejemplo de esfuerzo y trabajo.

A Manuela, por ser novia, amiga y acompañarme siempre.

A Cecilia y Joselo, por su orientación y darme la oportunidad de ser parte del equipo.

A Gilberto Kozloski por su orientación y dejarme ser uno más en su equipo de trabajo durante la estadía en Santa María.

A todos los integrantes y amigos del IPAV, por ser un equipo de trabajo siempre dispuesto a colaborar.

A todos los integrantes y amigos del LABRUMEN, por su colaboración en los trabajos realizados.

A Pablo Fernández, por colaborar en los experimentos realizados durante la segunda etapa del trabajo.

A Elena de Torres y al personal del campo experimental de Libertad, por su colaboración en los trabajos de campo.

A la Cooperativa Agraria Nacional (COPAGRAN) por el aporte de muestras de alimentos para la realización del segundo ensayo.

A la fundación CAPES por el apoyo económico recibido durante la estadía en Santa María, Brasil.

A la Comisión de Investigación y Desarrollo Científico (CIDEC) de la Facultad de Veterinaria por el apoyo económico.

A todos, **MUCHAS GRACIAS**

INDICE

	Página
AGRADECIMIENTOS	I
ABREVIATURAS	ii
<u>1. RESUMEN</u>	1
<u>2. SUMMARY</u>	2
<u>3. INTRODUCCIÓN</u>	3
<u>4. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS</u>	5
4.1. DEGRADABILIDAD RUMINAL DE LAS PROTEÍNAS	5
4.2. MÉTODOS PARA ESTIMAR DEGRADABILIDAD RUMINAL	6
4.2.1. <i>Método in vivo</i>	6
4.2.2. <i>Método in situ</i>	6
4.2.3. <i>Técnica de producción de gas in vitro (TPGIN)</i>	8
4.3. MÉTODOS <i>IN VITRO</i> PARA DETERMINAR DEGRADABILIDAD RUMINAL DE LOS COMPUESTOS NITROGENADOS A PARTIR DE LA PRODUCCIÓN DE AMONÍACO	9
<u>5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</u>	11
<u>6. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</u>	11
6.1. HIPÓTESIS	11
6.2. OBJETIVO GENERAL	11
6.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
<u>7. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN</u>	12
<u>8. EXPERIMENTO I: ESTUDIO DE LA CAPTACIÓN DE NITRÓGENO EN SISTEMAS IN VITRO CERRADOS</u>	13
<u>8.1. MATERIALES Y MÉTODOS</u>	13
8.1.1. <i>Diseño experimental</i>	13
8.1.2 <i>Técnicas utilizadas</i>	13
8.1.2.1. Producción de gas in vitro	13

8.1.3. <i>Análisis químicos</i>	15
8.1.3.1. Determinación de N-amoniaco in vitro (Weatherburn, 1967).	15
8.1.3.2. Determinación de Purinas (Makkar y Becker,1999).	15
8.1.4. <i>Análisis estadístico</i>	15
<u>8.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	16
8.2.1. <i>Resultados</i>	16
8.2.2. <i>Discusión</i>	18
<u>9. EXPERIMENTO II: COMPARACIÓN DE RESULTADOS DE DEGRADACIÓN DE ALIMENTOS MEDIANTE LAS TÉCNICAS IN SITU E IN VITRO GAS</u>	20
<u>9.1. MATERIALES Y MÉTODOS</u>	20
9.1.1. <i>Diseño experimental</i>	20
9.1.2. <i>Técnicas utilizadas</i>	21
9.1.2.1 Producción de gas in vitro	21
9.1.2.2. Técnica in situ	22
9.1.3. <i>Análisis químicos</i>	22
9.1.4. <i>Cálculos y estimaciones</i>	23
9.1.4.1. Cinética de la degradabilidad de Nitrógeno in vitro	23
9.1.4.2. Cinética de degradabilidad de Nitrógeno in situ	24
9.1.4.3. Estimación de la degradabilidad efectiva in vitro e in situ	24
9.1.5. <i>Análisis estadístico</i>	24
<u>9.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	25
9.2.1. <i>Resultados</i>	25
9.2.2. <i>Discusión</i>	28

<u>10. EXPERIMENTO III: COMPARACIÓN DE RESULTADOS DE DEGRADACIÓN DE DIETAS MEDIANTE LAS TÉCNICAS IN VIVO E IN VITRO GAS</u>	29
<u>10.1. MATERIALES Y METODOS</u>	29
<i>10.1.1 Diseño experimental</i>	29
<i>10.1.2. Técnicas utilizadas</i>	31
10.1.2.1. Producción de gas in vitro	31
<i>10.1.3. Análisis químicos</i>	31
<i>10.1.4. Cálculos y estimaciones</i>	31
10.1.4.1. Cálculos para estimar proteína degradable in vitro	31
10.1.4.2. Cálculos para estimar proteína degradable en rumen in vivo	31
<i>10.1.5. Análisis estadístico</i>	32
<u>10.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	33
<i>10.2.1. Resultados</i>	33
<i>10.2.2. Discusión</i>	37
<u>11. CONCLUSIONES E IMPLICANCIAS</u>	38
<u>12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	39
<u>13. ANEXOS</u>	47
13.1. ANEXO I: VALORES DE PURINAS, PRODUCCIÓN DE GAS Y N-AMONIACAL DEL EXPERIMENTO I	47

ABREVIATURAS

- A: fracción soluble *in situ*
- a: fracción soluble *in vitro*
- AGV: ácidos grasos volátiles
- B: fracción potencialmente degradable *in situ*
- b: fracción potencialmente degradable *in vitro*
- DE02: degradabilidad ruminal *in situ* con kp 2%/h
- de02: degradabilidad ruminal *in vitro* con kp 2%/h
- DE04: degradabilidad ruminal *in situ* con kp 4%/h
- de04: degradabilidad ruminal *in vitro* con kp 4%/h
- DE08: degradabilidad ruminal *in situ* con kp 8%/h
- de08: degradabilidad ruminal *in vitro* con kp 8%/h
- kd*: tasa de degradación *in situ* (%/h)
- kd_{invitro}*: tasa de degradación *in vitro* (%/h)
- kdgas* : tasa fraccional de producción de gas *in vitro*
- kp*: tasa de pasaje ruminal (%/h)
- Lag: tiempo de retardo en la producción de gas (h)
- MS: materia seca
- N-NH₃: nitrógeno amoniacal
- NM: nitrógeno microbiano
- NNP: nitrógeno no proteico
- P: nivel de significancia observado
- PB: proteína bruta
- PDR: proteína degradable en rumen
- PNDR: proteína no degradable en rumen
- TPGIN: técnica de producción de gas *in vitro*
- R²: coeficiente de determinación

1. RESUMEN

El presente trabajo pretende contribuir a la puesta a punto de métodos sencillos para estimar la degradabilidad efectiva de las proteínas, utilizando sistemas de producción de gas *in vitro*. Se realizaron 3 experimentos. En el experimento I fueron estudiadas las dinámicas de producción de gas, crecimiento microbiano y concentración de N-amoniaco *in vitro* de almidón, celulosa y caseína. En el experimento II, se estudió la degradabilidad efectiva de las proteínas a partir de la tasa de producción de N-amoniaco *in vitro* de 10 alimentos y su correlación con la degradabilidad efectiva obtenida *in situ*. En el experimento III, se utilizó la producción de N-amoniaco *in vitro* para estimar la degradabilidad efectiva de las proteínas de dietas con la inclusión de taninos y diferente proporción forraje/suplemento. Los datos fueron analizados mediante un procedimiento mixto. Fueron realizados análisis de correlación y regresión para comparar los datos obtenidos. En el experimento I los carbohidratos produjeron mayor volumen de gas que los sustratos proteicos ($P < 0,001$), no existiendo correlación con la concentración de purinas como indicador de acúmulo de biomasa microbiana a lo largo del periodo de incubación para ninguno de los sustratos evaluados. En el experimento II se observó una correlación positiva entre los valores de la fracción soluble ($r=0,81$, $P=0,001$) y degradabilidad efectiva ($r=0,88$, $P=0,001$) obtenidos *in vitro* e *in situ*. En el experimento III se observó una correlación positiva entre los valores estimados *in vivo* comparados con la degradabilidad efectiva *in vitro* ($r=0,72$, $P < 0,001$). Se concluye que la técnica de producción de gas *in vitro* asociada a la medición de la producción de amoníaco puede ser una herramienta promisoría para estimar la degradabilidad efectiva de las proteínas de los alimentos y sus mezclas.

Palabras claves: tasa de degradación, amoníaco, *in situ*, *in vivo*, producción de gas *in vitro*.

2. SUMMARY

This work aims to contribute to the development of simple methods to estimate the ruminal degradability of proteins, using *in vitro* gas production systems. Three experiments were conducted. In Experiment I the *in vitro* dynamics of gas production, microbial growth and N-ammonia concentrations of starch, cellulose and casein were studied. In Experiment II, correlations among *in vitro* kinetics of ruminal degradation of proteins obtained from rates of N-ammonia production and the same kinetics obtained *in situ* for 10 feedstuffs were evaluated. In Experiment III, the production of N-ammonia *in vitro* was used to estimate the protein ruminal degradability of diets including tannins and different proportions of forage/concentrates, and were correlated with the ruminal degradable protein (RDP) values obtained *in vivo* for the same diets. A correlations and regression analysis were conducted to compare data obtained. In Experiment I, the incubation of carbohydrates led to higher gas volume than the proteinus substrates ($P<0.001$), with no correlation with the concentration of purines as indicator of microbial mass accretion for the substrates evaluated. In Experiment II the soluble fraction ($r=0.81$, $P=0.001$), and effective degradability ($r=0.88$, $P=0.001$) were positively correlated. In Experiment III a positive correlation was observed among the values of RDP obtained *in vivo* and the values calculated from the *in vitro* method ($r=0.72$, $P<0.001$). This correlation was higher when the analysis was conducted without the inclusion of samples containing tannins. In conclusion the *in vitro* gas production technique associated to the ammonia production measurement can be a promising tool to estimate the ruminal degradability of proteins of feedstuffs and its mixtures.

Keywords: degradation rate, ammonia, *in situ*, *in vivo*, *in vitro* gas production.

3. INTRODUCCIÓN

La degradación de la proteína de los alimentos en el rumen ocurre a través de proteasas, peptidasas y desaminasas secretadas por los microorganismos ruminales. Este proceso tiene gran importancia, ya que de los aminoácidos (AA) absorbidos en el intestino de los rumiantes, el principal aporte proviene de la proteína de origen microbiano, que es formada a partir de la proteína degradable en rumen (PDR) (Kozloski, 2011). La proteína degradable en rumen está compuesta de proteína verdadera y nitrógeno no proteico (NNP). La proteína verdadera es degradada en péptidos y aminoácidos (AA), los cuales pueden ser desaminados en amoníaco (NH₃) o incorporados a proteína microbiana. El NNP es compuesto de ácidos nucleicos, urea, aminoácidos (AA) y pequeños péptidos, siendo fuente de N para los microorganismos el NH₃ y los AA. (Bach et al. 2005).

Generalmente las pruebas de determinación del valor nutritivo en rumiantes, para estimar la cantidad de nutrientes que aportan determinados alimentos al organismo, requieren de animales fistulados en diferentes tramos del tracto digestivo (rumen, abomaso o duodeno). El NRC (2001) recomienda el uso del procedimiento *in situ* para estimar la degradación ruminal de las proteínas de los alimentos. Este procedimiento requiere de la incubación en bolsas porosas dentro del rumen y la posterior recuperación del residuo. Para evitar los errores asociados a la contaminación bacteriana, las bolsas son lavadas con agua corriente. Sin embargo, pueden quedar restos de contaminación bacteriana (Beckers et al. 1995). Purinas (adenina y guanina) son comúnmente usadas como marcadores (Broderick y Merchen, 1992) para corregir la contaminación bacteriana; sin embargo, las purinas originarias del residuo del alimento pueden afectar la precisión del marcador. La corrección de la contaminación bacteriana puede ser de mayor relevancia en alimentos de alto contenido en fibra detergente neutro (FDN). La excesiva degradación ruminal de la proteína de algunos alimentos sugiere pérdidas de contenido por lavado, por lo que la técnica de las bolsas no es adecuada para la evaluación de estos alimentos (Paz et al. 2014).

La determinación de la proteína degradable en rumen *in vivo* e *in situ* con animales canulados tanto en rumen como en duodeno, son metodologías costosas, que requieren alta demanda de mano de obra y son cuestionadas desde el punto de vista del bienestar animal (Stern et al. 1997). Por esta razón es importante buscar alternativas que permitan realizar estudios mediante sistemas *in vitro* que ofrezcan una simulación fidedigna de lo que ocurre en el rumen *in vivo* (Dijkstra et al. 2005). En base a ese problema es que surgen diversos sistemas *in vitro* para estimar la degradación ruminal de las proteínas (Edmunds et al. 2012).

Los métodos *in vitro* tienen la ventaja no solo de ser más baratos y consumir menos tiempo, sino de permitir manipular las condiciones experimentales con mayor precisión que los ensayos *in vivo* (Makkar, 2004). A pesar de la gran utilización de estos sistemas en investigación, el número de estudios comparativos (*in vivo* vs. *in vitro*) es escaso.

Los sistemas *in vitro* para el estudio de la fermentación ruminal se comenzaron a implementar hace mucho tiempo, siendo los más simples los cultivos discontinuos o batch cultures, que consisten en botellas o tubos en los que se incubaba líquido ruminal mezclado con una solución tampón, en anaerobiosis y mantenidos a 39°C. Este tipo de cultivos se han usado tradicionalmente para incubaciones de corta duración (horas) o

para determinar la producción de gas (Getachew et al. 1998). Dicho método presenta ventajas como la pequeña cantidad de sustrato necesaria, el bajo costo, la posibilidad de llevar a cabo simultáneamente muchas pruebas y repeticiones, la simplicidad de manejo, la rapidez, la versatilidad, y la posibilidad de probar numerosos tratamientos experimentales en una sola prueba (Rymer et al. 2005).

En dichos ensayos surgen algunos inconvenientes propios del sistema, por ejemplo, a la hora de estimar degradabilidad ruminal de las proteínas deberá considerarse el reciclaje de N dentro de los frascos debido a que se desarrollan en un sistema cerrado, y por tanto el amoníaco producido no puede ser eliminado del frasco de incubación, lo que permite la reutilización por parte de las bacterias como fuente de nitrógeno.

Considerando las ventajas del método *in vitro*, Raab et al. (1983) propusieron un método que se basaba en la inclusión de niveles crecientes de carbohidratos fermentables en el medio de incubación para determinar la fracción de N-NH₃ utilizada por las bacterias. Por ecuación de regresión relacionando las concentraciones de N-NH₃ en los diferentes niveles de inclusión de carbohidratos llegaron a un valor de liberación de N-NH₃ cuando la producción de gas era igual a cero. Ese valor de N-NH₃ fue considerado ser proveniente de la degradación proteica, incluyendo la fracción utilizada para el crecimiento bacteriano. Años después, Harter (2009) propone estimar la tasa de degradación de los compuestos nitrogenados a nivel ruminal a partir de la tasa de producción de amoníaco al medio, concluyendo que no era necesario incorporar niveles crecientes de almidón para estimar la degradabilidad ruminal de las proteínas *in vitro*.

4. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

4.1. DEGRADABILIDAD RUMINAL DE LAS PROTEÍNAS

El N que entra en el rumen con el alimento procede tanto de las proteínas como de los compuestos nitrogenados no proteicos (ácidos nucleicos, nitratos, nitritos, NH_3 , urea, etc.). La microbiota ruminal tiene la capacidad de sintetizar AA *de novo* utilizando amoníaco y esqueletos de carbono derivados de varias vías en el rumen (Wang et al. 2015). También existe una importante fuente en forma de N endógeno, que procede de las enzimas de la saliva y de la descamación del epitelio digestivo, así como del reciclado de la urea plasmática a través de la saliva o por difusión a través de las paredes del rumen. Todos estos compuestos son degradados por las enzimas de los microorganismos hasta compuestos más simples, que serán utilizados para formar proteína microbiana o continuarán el proceso de fermentación (Czerkawski, 1986).

Aproximadamente dos tercios de los aminoácidos absorbidos por un rumiante son de origen microbiano, siendo la masa microbiana una excelente fuente proteica para cubrir sus necesidades (Verbic, 2002). Si la relación entre el aporte proteico y de energía en la dieta está en equilibrio, se produce el máximo crecimiento microbiano, producción de ácidos grasos volátiles (AGV), gases (CH_4 y CO_2) y NH_3 . Si el aporte de energía en relación con el aporte de proteína es muy elevado, por ejemplo, cuando hay un exceso de carbohidratos en la dieta, el crecimiento microbiano se verá reducido, y se desperdiciará energía (Russell y Strobel, 1993; Van Kessel y Russell, 1996). A su vez, se puede ver afectada la degradabilidad de la fibra por disminución de la actividad celulolítica, debido a bajas en el pH ruminal, por ejemplo, cuando suplementamos con alta inclusión de grano de sorgo (Aguerre et al. 2009; Aguerre et al. 2013). Por el contrario, si la dieta es rica en proteínas, el crecimiento microbiano estará limitado porque los microorganismos, al tener déficit de energía, se verán obligados a degradar el excedente proteico para obtenerla. Así aparecerán, altas concentraciones de NH_3 en el medio ruminal, y se formará una gran cantidad de urea en el hígado que será eliminada en la orina, lo que resulta en un proceso ineficiente.

El ritmo de degradación de la proteína en el rumen está afectado por las características inherentes a las proteínas y por la actividad proteolítica de los microorganismos (Wallace, 1996). Además, influyen factores como la dieta, el régimen de alimentación, la relación forraje/concentrado, el procesado y presentación del alimento, etc. Estos factores pueden provocar cambios en las condiciones del rumen que a su vez pueden alterar la actividad proteolítica (Schadt et al. 1999). Además, también influyen en la calidad de la proteína alimentaria no degradada en el rumen que fluye al duodeno (Stern et al. 1994).

El conocimiento sobre la degradación de la proteína de los alimentos es fundamental para lograr niveles ideales de proteína degradable en rumen (PDR), lo que optimizaría el crecimiento microbiano y llevaría a encontrar las cantidades de proteína no degradable en rumen (PNDR) que complementarían las exigencias nutricionales de los rumiantes (NRC, 2001). Adicionalmente, un mejor equilibrio en la oferta de PDR llevaría a una menor pérdida de compuestos nitrogenados, evitando la producción en exceso de amoníaco y su liberación en la forma de urea por la orina, reduciendo así el impacto ambiental y el gasto energético por parte del rumiante para eliminar dicho exceso.

4.2. METODOS PARA ESTIMAR DEGRADABILIDAD RUMINAL

Los modelos de cálculo necesitan de estimaciones confiables a la hora de estimar la degradabilidad ruminal de las proteínas. Actualmente existen diferentes metodologías para calcular la degradabilidad ruminal de los compuestos nitrogenados, siendo aún necesarios mayores avances en nuevas metodologías para dicha estimación. Los métodos de referencia son realizados con animales canulados en rumen (*in situ*) e intestino (*in vivo*).

4.2.1. Método *in vivo*

La forma utilizada para medir la degradación proteica *in vivo* se basa en la utilización de animales preparados quirúrgicamente con fístula duodenal reentrante o de tipo T. La proteína total que pasa por el duodeno proximal es medida y muestreada, y la fracción proteica proveniente de los microorganismos ruminales puede ser determinada por el uso de marcadores (Clark et al. 1992). Como marcadores, son utilizados ácidos nucleicos (ARN, ADN), purinas, amino ácidos (2,6-ácido diaminopimélico “DAPA”, D-alanina), e isotopos como sulfúrico-35 (P^{35}), fósforo-32 (P^{32}) y nitrógeno-15 (N^{15}) (Broderick y Merchen, 1992).

Para estimar el nitrógeno de origen microbiano (NM) dentro del nitrógeno no amoniacal que llega al intestino se utiliza la siguiente relación:

$$NM = \frac{\text{marcador en la digesta} \times \text{marcador en los microorganismos}}{N \text{ de los microorganismos}}$$

Luego de descontadas las cantidades de N amoniacal ($N-NH_3$) y de NM del N total de la digesta duodenal, la degradabilidad proteica se estima con base en el valor de N residual, compuesto por el N de origen alimentario no degradado en el rumen y por el N endógeno.

La principal limitación de este método para estimar la degradación proteica consiste en la dificultad de separar el N de origen endógeno de la PNDR (Chen y Gomes, 1992). Como alternativa, se puede calcular la PDR basada en el N consumido (CN) y flujo de N en el duodeno, siguiendo la ecuación:

$$PDR = CN - (N \text{ total} - (NM + NH_3))$$

Teóricamente, esta técnica es más confiable para la medida de la degradabilidad proteica, pero presenta muchas desventajas, ya que es invasiva y presenta elevado costo. Además, la medida del flujo de digesta intestinal es un proceso laborioso (Reynolds et al. 1994; Poncet et al. 1995), demanda mucho tiempo (Stern et al. 1994) y el proceso quirúrgico de canulación puede alterar las tasas de flujo normales (Faichney, 1993). A su vez, no existen aún marcadores o metodologías confiables para estimar el flujo de la digesta duodenal y la medida precisa de la proteína microbiana.

4.2.2. Método *in situ*

Propuesto por Mehrez y Orskov en 1977, el método *in situ* es el más ampliamente utilizado en los estudios de degradabilidad de la fracción nitrogenada de los alimentos para la utilización en sistemas de predicción de exigencias nutricionales en rumiantes

(AFRC, 1992; NRC, 1996). Dicho método se basa en la desaparición del nitrógeno de la muestra incubada en bolsas de poliéster directamente incubadas a nivel ruminal. Comparada con la técnica *in vivo* es considerada una técnica de fácil y rápida ejecución, necesitando poca cantidad de alimento, además de posibilitar el cálculo de cinéticas de degradación. A pesar de que la muestra no pasa por los procesos de masticación, rumia y escape ruminal, este método es considerado de referencia.

Factores, como la necesidad de animales fistulados a nivel ruminal, tipo de dietas de los animales experimentales, cantidad y granulometría de la muestra a ser incubada, el tamaño y porosidad de las bolsas deben ser considerados, ya que pueden influir en los resultados. Otro aspecto a tener en cuenta, es la contaminación del residuo de incubación por los microorganismos adheridos a las partículas de alimento, siendo una fuente de error importante para la estimación de las tasas de degradación ruminal de las proteínas (Nocek, 1988; Vanzant et al. 1998). Además, es discutida la barrera física que las bolsas representan para el acceso microbiano a la muestra, pudiendo, en el caso de existir, ocasionar una degradación incompleta (López, 2005). Más aún, algunos estudios mencionan que la población microbiana, así como la actividad proteolítica en el interior de las bolsas de incubación, es diferente de aquellas en el ambiente ruminal (Michalet-Doreau y Noziere, 1998; Huhtanen et al. 1998).

En 1979 Orskov y McDonald propusieron un modelo para estimar la cinética de degradación de los alimentos, considerando una división proteica en tres fracciones: A, B y C. La fracción A, corresponde al nitrógeno no proteico y la proteína soluble del alimento, siendo esta fracción totalmente y rápidamente soluble en el rumen. La fracción B es aquella potencialmente soluble, que sufrirá degradación durante todo el periodo de incubación. Y la fracción C es considerada indegradable a nivel ruminal.

$$P = a + b * (1 - \exp -c*t)$$

Donde:

P = degradabilidad potencial de la proteína;

t = tiempo de incubación

a = sustrato soluble y rápidamente degradable;

b = sustrato insoluble, pero potencialmente degradable;

c = tasa constante de la función b.

Para estimar la degradabilidad efectiva se debe considerar una tasa de pasaje del alimento (kp), relacionada a las características productivas de interés. El AFRC (1993) considera tasas de pasaje de 2%/h para un nivel de mantenimiento, mientras que 5%/h se atribuye a vacas lecheras, ganado de carne y ovinos con altos niveles de alimentación, pero menor a 2 x mantenimiento. Cuando la estimación se realiza sobre vacas lecheras de alta producción (>15 L/día) se debe considerar un kp de 8%/h.

Luego de la determinación de las fracciones A,B,C, tasa de pasaje (kp) y la obtención de la tasa de degradación proteica (kd), se puede calcular las fracciones PDR y PNDR de las proteínas de determinado alimento con las siguientes ecuaciones (NRC, 2001):

$$PDR = A + B [kd / (kd + kp)]$$

$$PNDR = B [kp / (kd + kp)] + C$$

A: fracción soluble (%)
B: fracción degradable (%)
C: fracción indegradable (%)
kd: tasa de degradación ruminal (%/h)
kp: tasa de pasaje (%/h)
PDR: proteína degradable en rumen (%)
PNDR: proteína no degradable en rumen (%)

4.2.3. Técnica de producción de gas *in vitro* (TPGIN)

Cuando se incuba en el laboratorio un alimento con fluido ruminal en condiciones de anaerobiosis y a una temperatura similar a la del rumen, los carbohidratos y las demás cadenas carbonadas son fermentados por los microorganismos, produciéndose AGV, principalmente de cadena corta, acético, propiónico y butírico (Wolin, 1960; Beuvinck y Spoelstra, 1992; Blummel y Orskov, 1993), gases (fundamentalmente CO₂, CH₄ y H₂) (Van Soest, 1994) y células microbianas, al igual que ocurre *in vivo* en el rumen.

La técnica de producción de gas *in vitro* (TPGIN) se centra en la aparición de productos de la fermentación (los productos solubles, pero no fermentables no contribuyen a la producción de gas) (Blummel y Orskov, 1993; Pell y Schofield 1993; Makkar et al. 1995), donde la cinética de producción de gases va a depender de la proporción relativa de partículas (solubles/insolubles y degradables/indegradable) del alimento.

Este sistema presenta la ventaja de que el producto final que se mide (gas) es resultado directo del metabolismo microbiano, en lugar de registrar desaparición de sustrato. Una segunda ventaja es que la formación de productos finales de la fermentación, pueden ser monitoreados a intervalos cortos de tiempo y por lo tanto la cinética de fermentación puede ser descripta con precisión (Bruni y Chilibroste, 2001).

El modelo exponencial de Orskov y McDonald (1979) ha sido ampliamente utilizado en la evaluación de alimentos para rumiantes con el fin de describir la cinética de degradación de alimentos medida con la técnica *in situ*, pero también para describir la cinética de producción de gas (Siaw et al. 1993; Khazaal et al. 1993).

En el método de Theodorou et al. (1994), una aguja hipodérmica conectada a un transductor de presión digital se inserta manualmente a través de un tapón de goma para medir la presión acumulada de gas. El volumen de gas se determina registrando el volumen de gas desplazado dentro del cilindro de la jeringa cuando el embolo se va moviendo por efecto de la presión, hasta que la presión iguala a la atmosférica y el embolo se detiene. La ventaja del método de Theodorou et al. (1994), es que se pueden manejar un gran número de muestras al mismo tiempo con un bajo costo, aunque la preparación de la técnica es laboriosa.

La TPGIN aparece como un sistema *in vitro* de alta capacidad operativa y bajo costo, en la cual los perfiles de producción de gas pueden ser generados utilizando sistemas semi o totalmente automatizados (Dijkstra et al. 2005). Existen sistemas semi-automatizados como el propuesto por Mauricio et al. (1999) quienes describieron un aparato que permitía incubar 336 frascos al mismo tiempo.

El principal error que se comete es la asunción de que la producción de gas es directamente proporcional a la digestión del sustrato, y por lo tanto a su valor nutritivo (Beever y Mould, 2000). Esto no es estrictamente cierto, porque la producción de gas depende de la composición del sustrato, de las comunidades microbianas que se establezcan en el cultivo y de la utilización de los nutrientes por parte de las bacterias para su crecimiento. Por ejemplo, el cambio en el perfil de AGV puede causar alteraciones en la relación entre la desaparición de sustrato y la producción de gas, debido a que la producción de CO₂ durante la fermentación de un sustrato proviene de dos fuentes: directo de los pasos metabólicos como la descarboxilación oxidativa del piruvato y de las reacciones de los productos finales de la fermentación (AGV) con el bicarbonato del buffer (producción de gas indirecta) (Beuvink y Spoeltra, 1992). A su vez, la presencia de NH₃ en forrajes ricos en proteína puede hacer decrecer la producción de gas por una reacción con los AGV (Schofield, 2000). Como consecuencia de esto, varios autores concluyeron que la TPGIN provee poca información aparte de la estimación de las tasas de fermentación, lo cual llevó a sugerir que los datos obtenidos deberían ser complementados con datos de degradación de los sustratos, perfiles de AGV, y crecimiento microbiano (Blummel y Bullerick, 1997; Blummel et al. 1997; Beever y Mould, 2000).

La determinación de los productos finales de la fermentación y los residuos no fermentados, en conjunto con los perfiles de producción de gas, permite estimar la tasa, extensión y eficiencia de la fermentación, logrando predecir el reparto del alimento degradado entre la síntesis de proteína microbiana y los AGV (proporción del alimento que es fermentado y del que es derivado al crecimiento microbiano), así como el CO₂, CH₄, H₂ y N-amoniaco producidos (Rymer et al. 2005).

Considerando el uso de la TPGIN combinada con los valores de N-amoniaco, es que algunos autores (Raab et al. 1983; Karlsson et al. 2009; Harter, 2009) propusieron la combinación de los productos de la fermentación (gas y N-amoniaco) para la estimación de la degradabilidad de las proteínas *in vitro*.

4.3. MÉTODOS *IN VITRO* PARA DETERMINAR DEGRADABILIDAD DE LOS COMPUESTOS NITROGENADOS A PARTIR DE LA PRODUCCIÓN DE AMONIACO

La concentración de amoniaco ruminal ha sido empleada como un indicador de la degradación microbiana de proteína *in vivo* e *in vitro*, y también de la utilización de NNP (Olmos-Colmenero y Broderick 2006; Marichal et al. 2009). Algunos autores han propuesto utilizar los sistemas *in vitro* gas junto a la determinación de N-amoniaco como metodología para estimar la degradabilidad ruminal de las proteínas.

Raab et al. (1983) propusieron un método *in vitro* gas para estimar la degradabilidad de la proteína basado en la determinación de nitrógeno amoniaco por el método Kjeldahl, donde las muestras eran analizadas después del término de la incubación, a las 24 horas, sin verificar la tasa de liberación de amoniaco en el medio de incubación durante ese tiempo. Este método se basó en la inclusión de niveles crecientes de

carbohidratos fermentables en el medio de incubación, con el fin de determinar la fracción de N-NH₃ utilizada por las bacterias. Por ecuación de regresión relacionando las concentraciones de N-NH₃ en los diferentes niveles de inclusión de carbohidratos llegaron a un valor de liberación de N-NH₃ cuando la producción de gas era igual a cero, incluyendo la fracción utilizada para el crecimiento microbiano.

Karlsson et al. (2009) propusieron una metodología *in vitro* que permite reducir el número de frascos que empleaba el método propuesto por Raab et al. (1983), pudiendo estimar la tasa de degradación de las proteínas, registrando producción de gas y amoníaco en los tiempos 4, 8, 12, 16, 24 y 30 h.

Desde la Universidad Federal de Santa María (Brasil), Harter (2009) propuso una metodología *in vitro* para estimar la degradabilidad de las proteínas a nivel ruminal, donde se lograba disminuir significativamente la demanda analítica con respecto al método planteado por Raab et al. (1983), y adaptado por Karlsson et al. (2009). Como resultados, Harter (2009) definió un tamaño de muestra de 0,5 g, no siendo necesaria una fijación en la cantidad de N incubado para los estudios de degradabilidad proteica. Con respecto a la composición del medio de incubación, concluyó que la incorporación de bicarbonato de amonio podría causar un retraso en el inicio de la digestión microbiana de la proteína del alimento incubado, interfiriendo en los resultados finales de degradación. En dicho trabajo la muestra inicial era previamente incubada en solución buffer para retirar la fracción soluble del alimento. El mismo autor, también evaluó la inclusión de almidón para la obtención de los valores de degradabilidad, concluyendo que no fue necesario adoptar esta práctica para corregir la fracción capturada por las bacterias, lo que disminuyó notoriamente la demanda analítica del método. En comparación con las metodologías *in situ* los resultados obtenidos con el método *in vitro* estimando la tasa de degradación ruminal a partir de la producción de amoníaco al medio, y calculando la degradabilidad ruminal con dicho *kd*, fueron menores a los obtenidos con la técnica de referencia, mientras que fueron similares a los valores de proteína degradable en rumen obtenidos con la técnica *in vivo*. No obstante, los valores de R² fueron bajos, lo que refuerza la necesidad de continuar investigando con el fin de validar el método *in vitro*.

Si bien es claro que un sistema de fermentación artificial no puede imitar la fermentación ruminal *in vivo* en todos sus aspectos (Muetzel et al. 2009), se puede intentar perfeccionar su capacidad para la simulación. Para validar un sistema y utilizarlo como un modelo de la fermentación ruminal, se requieren trabajos que comparen de forma directa los resultados obtenidos *in vivo* e *in vitro* (Mansfield et al. 1995).

Los estudios que muestran comparaciones directas *in vivo-in vitro* son escasos, algunos de estos trabajos son los de Slyter y Putnam (1967) quienes compararon las poblaciones microbianas *in vivo* con las encontradas en fermentadores continuos, utilizando las mismas dietas. Hannah et al. (1986) utilizando vacas canuladas en rumen e intestino, compararon los valores de digestibilidad obtenidos *in vivo* e *in vitro*. Mansfield et al. (1995) trabajaron con vacas canuladas en rumen e intestino y fermentadores continuos comparando los parámetros de la fermentación y ecología ruminal. Ziemer et al. (2000) también estudiaron las diferencias entre las poblaciones ruminales *in vivo* y las que se pueden observar en los fermentadores continuos. Devant et al. (2001) evaluaron los efectos de diferentes fuentes de nitrógeno sobre la fermentación y excreción urinaria de derivados púricos, a través de dos experimentos, uno realizado *in vivo* y otro con sistemas *in vitro* en cultivos continuos. Yang et al.

(2004) estudiaron las características fermentativas de *pennisetum purpureum* ensilado con el agregado de carbohidratos no fibrosos, evaluando los efectos sobre pH *in vivo* y digestibilidad *in vitro*. Rotger et al. (2006) estudiaron de la sincronización entre carbohidratos no estructurales y degradación proteicas sobre el consumo y la fermentación ruminal estudiadas *in vivo e in vitro*. Carro et al. (2009) compararon dos sistemas *in vitro* frente a datos obtenidos *in vivo*, estudiando la digestibilidad de la fibra. Muetzel et al. (2009) presentaron un sistema *in vitro* para evaluar parámetros ruminales, y cambios en la comunidad ruminal, validando la técnica con valores obtenidos *in vivo*.

En el presente trabajo, se pretende profundizar la técnica propuesta por Harter (2009), tomando como base los cambios metodológicos propuestos en dicho estudio, validando la técnica *in vitro* con resultados *in situ e in vivo*.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A partir de la información disponible con respecto a las técnicas *in vitro* como predictoras de la degradación ruminal de las proteínas se plantean algunas preguntas sin respuestas claras hasta el momento:

¿Existe correlación entre la producción de gas *in vitro* y la dinámica de la biomasa microbiana en estos sistemas que permita corregir la captación de amoníaco?

¿Es posible estimar la degradabilidad efectiva de la proteína a partir de la producción de amoníaco *in vitro*?

El presente trabajo intenta aportar información relevante acerca de las interrogantes planteadas.

6. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

6.1. HIPÓTESIS

6.1.1 La producción de gas *in vitro* permite corregir el amoníaco captado por la biomasa microbiana

6.1.2 La producción de amoníaco al medio de incubación permite estimar la degradabilidad efectiva de los compuestos nitrogenados

6.2. OBJETIVO GENERAL

Poner a punto una metodología *in vitro* que permita estimar la degradabilidad efectiva de los compuestos nitrogenados.

6.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Correlacionar la producción de gas y la dinámica de la biomasa microbiana en sistemas *in vitro*.

Comparar la degradabilidad efectiva de los compuestos nitrogenados obtenida a través de la técnica *in vitro*, con la degradabilidad efectiva *in situ*.

Comparar la degradabilidad efectiva *in vitro* con la degradabilidad ruminal medida *in vivo*.

7. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN

En base a las hipótesis y objetivos planteados, la presente Tesis de Maestría comprende 3 experimentos, realizados en la Universidad Federal de Santa María (UFSM) y en el Instituto de Producción Animal de la Facultad de Veterinaria (IPAV-UdelaR).

En el **Experimento I** Fueron registrados los valores de producción de gas, amoníaco y purinas. Las determinaciones realizadas en este experimento buscaban establecer una correlación entre la producción de gas y la dinámica de la biomasa microbiana, de modo de corregir los valores de amoníaco a través de la producción de gas *in vitro*, ya que la captación de N es una de las principales limitantes en estos sistemas cerrados para la determinación de la degradabilidad proteica.

En el **Experimento II** se comparó la técnica de referencia *in situ* con el método *in vitro* gas, buscando correlacionar los valores de degradabilidad efectiva *in vitro* con la degradabilidad efectiva estimada *in situ*. Fueron evaluados 10 alimentos de uso común en la nutrición de rumiantes a través de la técnica *in situ* e *in vitro*.

En el **Experimento III** se comparó la degradabilidad efectiva estimada *in vitro* con datos obtenidos *in vivo* de muestras utilizadas en ensayos realizados en la Universidad Federal de Santa María (UFSM) y en la Universidad de Santa Catalina (UDESC-Lages).

8. EXPERIMENTO I: ESTUDIO DE LA CAPTACIÓN DE NITRÓGENO EN SISTEMAS IN VITRO CERRADOS

8.1. MATERIALES Y METODOS

El trabajo de campo y los análisis químicos del experimento I fueron realizados en el Laboratorio de Bromatología y Nutrición de Rumiantes, del departamento de Zootecnia de la Universidad Federal de Santa María (UFSM).

8.1.1 Diseño experimental

Fueron estudiadas las concentraciones de amoníaco, presión de gas y purinas, utilizando 3 sustratos puros en un diseño totalmente al azar para cada sustrato. Las muestras fueron incubadas en 3 frascos por horario y por corrida, siendo realizadas 3 corridas por cada muestra.

Los sustratos usados fueron almidón (Sigma-Aldrich S-4126), celulosa (Fluka Avicel® PH-101) y caseína (Conaprole).

8.1.2 Técnicas utilizadas

8.1.2.1. Producción de gas *in vitro*

Se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por Mauricio et al. (1999). Se realizó la incubación *in vitro* de 3 frascos/horario, siendo retirados a la hora correspondiente para análisis de purinas. La producción de gas *in vitro* de cada sustrato fue realizada en 3 corridas. Se pesaron 0,5 g de muestra en cada frasco de fermentación. Fueron agregados a cada frasco 40 mL de solución tampón y a continuación fueron tapados y se mantuvieron refrigerados a 4°C durante 12 h antes de la inoculación para permitir la hidratación del sustrato. Previo a la inoculación, los frascos fueron llevados a un baño María a 39°C donde se mantuvieron por todo el periodo de mediciones. Inmediatamente a la inoculación con 10 mL de fluido ruminal, cada frasco fue tapado con septo de goma de butilo. Todas las manipulaciones se realizaron bajo un flujo de CO₂. Cada sustrato fue incubado por triplicado y además tres frascos de fermentación sin sustrato fueron incluidos como blancos para corregir la fermentación propia del inóculo. La composición de la solución tampón (Schofield et al. 1994; Theodorou et al. 1994; Mauricio et al. 1999) figura en el cuadro IV.

Los horarios de muestreo fueron 0, 3, 6, 9, 12, 24, 30, 36, 48 y 72 hrs para presión de gas (psi).

Cuadro IV: Composición de la solución tampón utilizada en los ensayos *in vitro* gas realizados en los 3 experimentos

Ingredientes	ml/litro
Solución tampón 1	450
Solución tampón 2	450
Solución reductora	100
Total	1000
Solución Tampón 1	
Reactivos	g/litro
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	4,411
KH ₂ PO ₄	2,893
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,233
CaCl ₂	0,025
Solución Tampón 2	
Reactivos	g/litro
NaHCO ₃	12,040
Solución Reductora	
Reactivos	g/litro
Cysteine HCL	3,900
NaOH	1,000

Las mediciones de presión de gas se realizaron mediante un transductor de presión, a los horarios ya indicados para cada ensayo. Luego de medida la presión se liberaba el gas, hasta obtener presión 0,00 psi. La cantidad de gas en mL fue estimada de acuerdo a una ecuación obtenida en experimentos previos bajo condiciones similares en cada laboratorio.

Ecuación utilizada en la Universidad Federal de Santa María (Brasil):

$$V = 0,66 + (4,95 * P)$$

Ecuación utilizada en el Instituto de Producción Animal (Uruguay):

$$V = 4,40P + 0,09P^2$$

V: volumen de gas en mL

P: presión observada en psi

El volumen de gas de cada frasco de fermentación fue ajustado por regresión no lineal mediante PROC NLIN de SAS al modelo:

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

donde “V” (mL/g MS incubada) denota la producción de gas acumulada a tiempo t, “a” (mL/g MS incubada) es la producción potencial de gas, “kd” (h⁻¹) es la tasa fraccional de producción de gas y “L” (h) es el tiempo de latencia de la producción de gas.

8.1.3. Análisis químicos

8.1.3.1 Determinación de N-amoniaco *in vitro* (Weatherburn, 1967).

Se realizó el muestreo en los tiempos 0, 6, 12, 18, 24, 36, 48 y 72 h. extrayendo 0,5 ml de sobrenadante a través de una jeringa de insulina. Luego la muestra se almacenó en 2,5 ml de ácido sulfúrico 2% v/v, y posteriormente se congeló para analizar N-amoniaco por la técnica de Weatherburn, 1967.

8.1.3.2 Determinación de Purinas (Makkar y Becker, 1999).

3 frascos eran retirados del baño maría en cada horario (0, 6, 12, 18, 24, 36, 48 y 72 h). Una vez retirados, el contenido era transportado para frascos de centrifuga y se realizaba una primera centrifugación a 4000 x g por 20 minutos. Luego de la centrifugación eran colocados en estufa a 65 ° C durante 48 h. Una vez obtenido el residuo seco, se procedía a determinar concentración de purinas según la metodología propuesta por Makkar y Becker, 1999.

8.1.4. Análisis estadístico

Los datos fueron analizados utilizando el programa estadístico SAS (SAS 9.0V, SAS Institute Inc., Cary, NC). Diferencias significativas se declararon cuando $P \leq 0,05$, y se consideró una tendencia cuando $0,05 < P \leq 0,10$.

Los datos de producción de gas, amoniaco y purinas fueron analizados utilizando el procedimiento mixto del SAS, de acuerdo al modelo: $Y_{ij} = \mu + T_i + S_j + (T \times S)_{ij} + C_j + e_{ij}$, donde μ es la media poblacional, T_i es el efecto fijo del tiempo ($i=0, 6, 12, 18, 24, 36, 72$ h), S_j es el efecto fijo del sustrato (j =almidón, celulosa, caseína), $(T \times S)_{ij}$ es el efecto fijo de la interacción entre el tiempo y el sustrato, C_j es el efecto aleatorio de la corrida y e_{ij} es el error residual.

En los casos en que el efecto de la interacción $(T \times S)_{ij}$ fue estadísticamente significativo, el efecto simple principal del sustrato fue analizado utilizando la opción SLICE.

Los datos de producción de gas fueron correlacionados con el acumulo de purinas a través del procedimiento PROC CORR.

Para determinar la hora en que la concentración de purinas y amoniaco fue mínima se utilizaron regresiones lineales y cuadráticas, mediante el procedimiento PROC REG, de SAS.

8.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.2.1. Resultados

El volumen final de gas fue diferente según el sustrato incubado, siendo mayor en el caso de almidón y celulosa comparado con caseína (281,2, 229,1 y 120,9 ml/g MS incubada, respectivamente) ($P < 0,001$, ver fig. 2).

La producción de purinas varió a lo largo del tiempo de incubación para los 3 sustratos. En ningún caso se observó una correlación significativa entre producción de gas y purinas a lo largo de 72 h de incubación *in vitro* ($P > 0,05$).

La concentración de amoníaco en el medio de incubación por sustrato fue diferente a lo largo del tiempo. En el caso de los carbohidratos, el punto mínimo de concentración de amoníaco se produjo a las 40 h. En el caso de los sustratos proteicos, la concentración de amoníaco aumentó a lo largo del tiempo de incubación (fig. 2).

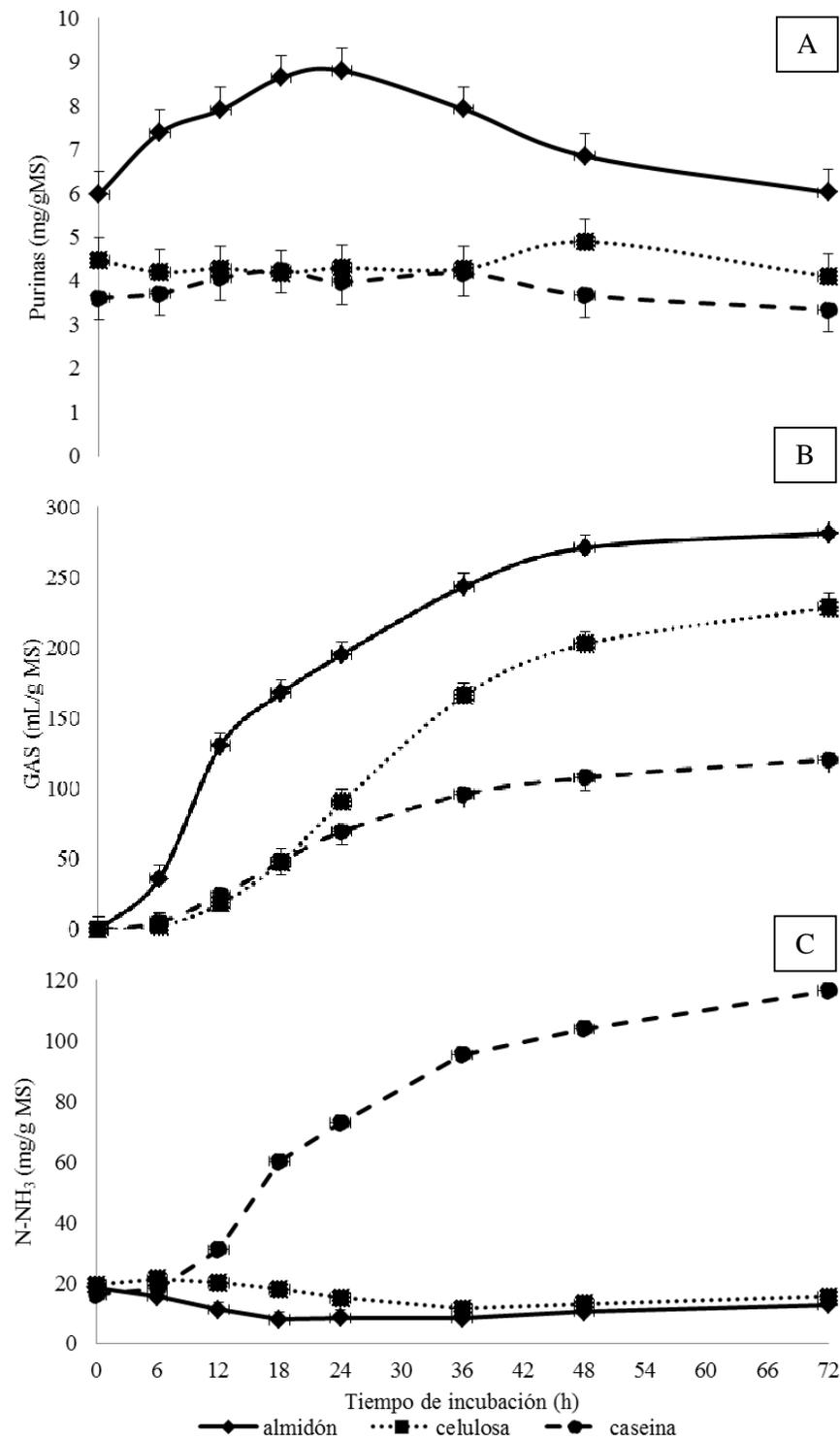


Fig. 2. Dinámicas de concentración de purinas (mg/g MS incubada) (A), producción de gas *in vitro* (mL/g MS incubada) (B) y N-NH₃ (mg/g MS incubada) (C), hasta la hora 72 de incubación con sustratos puros (almidón, celulosa y caseína) (valores medios ± error estándar).

No existió correlación significativa entre la producción de gas y el acumulo de purinas a lo largo de la incubación *in vitro* en ninguno de los sustratos puros evaluados (Cuadro V).

Cuadro V: Correlación entre producción de gas y acúmulo de purinas *in vitro* según sustratos (almidón, celulosa y caseína) a lo largo de 72 h de incubación

Almidón	Celulosa	Caseína
-0,26 ¹	0,20	-0,21
0,542 ²	0,631	0,623

¹coeficiente de correlación; ²P: nivel de significancia

8.2.2. Discusión

La diferencia en producción de gas según el sustrato, era esperable, sobre todo considerando que el almidón es un carbohidrato de rápida degradación por parte de la microbiota ruminal. En el caso de carbohidratos estructurales, era de esperar una menor tasa de producción de gas, debido a la estructura química de la celulosa. A su vez, las bacterias responsables de la degradación de celulosa, presentan una menor velocidad de duplicación, lo que explicaría la menor producción de purinas, considerando que este marcador refleja la dinámica de crecimiento de la biomasa bacteriana (Broderick y Merchen, 1992). En el caso del almidón, las bacterias que degradan carbohidratos no fibrosos, presentan una tasa de crecimiento relativamente más alta, con respecto a las fermentadoras de CHO fibrosos (Russell et al. 1992) En ambos casos, dependen del amoníaco en el medio de incubación para la síntesis de sus proteínas.

La falta de correlación entre la biomasa microbiana (purinas) y la producción de gas, coincide con lo reportado por Dijkstra et al. (2005), dichos autores plantean que la producción de gas no refleja exactamente los cambios en la producción de biomasa microbiana, en respuesta a cambios en los sustratos como ocurre *in vivo*.

En el caso de sustratos proteicos, la concentración de amoníaco varió a lo largo del tiempo, lo cual era de esperar, debido a que las bacterias proteolíticas al degradar el sustrato generan amoníaco como producto de la degradación de las proteínas (Russell et al., 1992).

En principio, una de las principales limitantes de los sistemas *in vitro* para determinar la tasa de degradación ruminal de los compuestos nitrogenados basado en la medición de amoníaco es que los procesos de degradación de la proteína y síntesis de proteína

microbiana ocurren de forma simultánea, lo que llevaría a subestimaciones de los resultados (Chamberlain y Thomas, 1979).

A nivel ruminal, el amoníaco que no es incorporado en los compuestos nitrogenados microbianos, es en gran parte absorbido a través del epitelio ruminal (Russell et al. 1992). En el caso de los sistemas *in vitro* donde no existe flujo de nutrientes, el amoníaco es reciclado por las propias bacterias, ya que aminoácidos y N-NH_3 generados como resultado de la hidrólisis de proteínas y desaminación en el rumen son una fuente de N para el crecimiento microbiano (Wang y Tan, 2013).

A pesar de las variaciones en los valores de producción de gas *in vitro* y amoníaco, las purinas no siguieron el mismo comportamiento, lo que muestra que, si bien la microbiota fue capaz de degradar el sustrato, la actividad microbiana no se tradujo en crecimiento microbiano. Debe considerarse que las purinas no reflejan la actividad microbiana, sino que permiten explicar el crecimiento microbiano. La explicación de porqué no varió la biomasa microbiana, a pesar de existir una variación en la producción de gas y amoníaco para los diferentes sustratos no tiene una explicación simple y no es posible realizarla con los datos obtenidos, ya que son muchos los factores que pueden estar afectando los resultados. Por ejemplo, la producción de gas *in vitro* está formada en su mayor parte por CO_2 , el cual variará según los productos de la fermentación.

Luego de analizados los resultados obtenidos en el exp. I donde no se observó correlación entre la biomasa microbiana y la producción de gas, se pautó la metodología *in vitro* a emplear para estimar la degradabilidad efectiva de las proteínas sin la corrección de los valores de amoníaco, dicha metodología *in vitro* fue comparada con los métodos *in situ* (exp. II) e *in vivo* (exp. III).

9. EXPERIMENTO II: COMPARACIÓN DE RESULTADOS DE DEGRADACIÓN DE ALIMENTOS MEDIANTE LAS TÉCNICAS IN SITU E IN VITRO GAS

9.1. MATERIALES Y METODOS

Los trabajos de campo del experimento II, análisis de composición química de los alimentos y la determinación de producción de gas y amoníaco fueron realizados en el Laboratorio de Nutrición Animal del Instituto de Producción Animal de la Facultad de Veterinaria (IPAV).

Los protocolos con animales experimentales se desarrollaron siguiendo las recomendaciones de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (UdelaR, Montevideo, Uruguay).

9.1.1. Diseño experimental

Fueron realizados dos experimentos para comparar la degradabilidad efectiva estimada *in situ* e *in vitro*.

En el experimento *in situ* las muestras fueron incubadas utilizando 3 bovinos por corrida, siendo realizadas 2 corridas por cada muestra. *In vitro* fueron incubados 3 frascos por sustrato, realizando 3 corridas por muestra.

Los bovinos en los cuales se llevó a cabo la incubación de las bolsas *in situ* y de los cuales se extrajo inóculo ruminal para la evaluación *in vitro* recibieron una dieta compuesta de forrajes y concentrados. (Cuadro I).

Cuadro I: Oferta diaria, componentes y parámetros nutricionales (materia seca, proteína y cenizas) de la dieta ofrecida a los bovinos canulados a nivel ruminal utilizados para los ensayos *in vitro* e *in situ* del experimento II

Alimentos	Oferta (kg MS/día)	MS (%)	PB (%MS)	Cenizas (%MS)
Harina de soja	1	83,5	46,56	6,16
Grano húmedo de maíz	2	70,34	6,80	1,4
Fardo de moha	<i>Ad libitum</i>	78,76	4,57	7,38

MS: materia seca; PB: proteína bruta;

Como sustratos para las pruebas, fueron seleccionados 10 alimentos con características nutricionales diferentes, y de uso común en las dietas de rumiantes (Cuadro II). Las medidas de degradación *in situ* e *in vitro* se realizaron en los tiempos 0, 3, 6, 12, 18, 24, 36, 48 y 72 h luego del comienzo de la incubación *in situ* e *in vitro* gas respectivamente.

Cuadro II: Composición química (materia seca, proteína bruta y N soluble) de afrechillo de trigo, afrechillo de arroz, raicilla de cebada, harina de girasol, cascarilla de soja, DDGS de maíz, harina de soja, alfalfa peleteada, forraje fresco de avena y avena ensilada, evaluados *in situ* e *in vitro*

Alimentos	MS (%)	PB (%MS)	N soluble (% del N total)	
			<i>in situ</i>	<i>in vitro</i>
Afrechillo de trigo	90,7	15,7	21,3	54,5
Afrechillo de arroz	90,4	12,6	27,6	56,0
Raicilla de cebada	90,8	27,0	27,0	61,0
Harina de girasol	91,3	30,2	20,4	52,5
Cascarilla de soja	91,1	11,7	18,2	39,0
DDGS de maíz	91,5	22,5	5,1	40,4
Harina de soja	91,0	46,7	9,6	20,2
Alfalfa peleteada	91,8	14,4	25,0	50,1
Avena forraje fresco	91,0	11,8	75,7	71,1
Avena ensilada	90,1	11,5	76,9	72,4

MS: materia seca; PB: proteína bruta; N soluble: nitrógeno soluble, % del N total de la muestra. *in situ*: N soluble obtenido por lavado con agua corriente; *in vitro*: N soluble obtenido dejando 3 h en agua destilada y posterior lavado con agua corriente.

9.1.2. Técnicas utilizadas

9.1.2.1. Técnica *in vitro*

Fue conducido un ensayo *in vitro*, donde se registró la producción de N-amoniaco en el medio de incubación de 10 alimentos (cuadro II). Cada muestra fue previamente colocada en bolsas de polyester, e incubadas en agua destilada a temperatura ambiente por 3 h con agitación lenta. Luego eran lavadas con agua corriente hasta obtener agua cristalina, dicho residuo era considerado libre de nitrógeno soluble. 0,5 g de muestra libre N soluble molida a 1mm fue incubada en frascos de 125 mL. Luego fueron agregados 40 mL de solución buffer (cuadro IV) y se almacenaron a 4°C durante 12h para hidratar la muestra. Previo a la inoculación, los frascos fueron llevados a un baño María a 39°C donde se mantuvieron por todo el periodo de mediciones. Inmediatamente a la inoculación con 10 mL de fluido ruminal, cada frasco fue tapado. Todas las manipulaciones se realizaron bajo un flujo de CO₂. Cada sustrato fue incubado por triplicado, siendo los muestreos realizados en los tiempos 0, 3, 6, 12, 24,

36, 48 y 72 h. El muestreo para amoníaco fue realizado siguiendo los pasos descritos en el punto 8.1.3.1 del experimento I.

En cada horario de medición se liberó el gas producido por la fermentación del sustrato.

9.1.2.2. Técnica *in situ*

Fue conducido un ensayo de degradación *in situ* de acuerdo al procedimiento propuesto por Mehrez y Orskov (1977). Las muestras fueron secadas en estufa a 55 °C durante 72 h y molidas en molino con una criba de 2 mm. 7 g de cada muestra fueron pesados en bolsas de poliéster (10 x 20 cm y porosidad de 50 µm), las que fueron selladas e incubadas ruminal en duplicado por horario.

Las bolsas eran sujetas a una cadena a través del uso de un precinto, siendo retiradas secuencialmente en los horarios 3, 6, 12, 24, 36, 48 y 72 h. Luego de retiradas del rumen, las bolsas eran lavadas con agua corriente y posteriormente congeladas. Adicionalmente, las bolsas no incubadas correspondientes a la hora cero también fueron lavadas hasta obtener agua clara. Posteriormente fueron descongeladas, lavadas en agua corriente, colocadas en estufa a 55 °C durante 48 h, pesadas y almacenadas para posterior análisis.

9.1.3. Análisis químicos

Las muestras de alimentos utilizados en el experimento II fueron analizadas para determinar su composición. La materia seca (MS) se determinó por secado en estufa de aire forzado a 105°C hasta peso constante (Método 7.003; AOAC, 1997). Las cenizas fueron determinadas por combustión a 600°C por dos horas (Método 7.009; AOAC, 1997) y la materia orgánica (MO) se determinó por diferencia. El nitrógeno total fue determinado por el método de Kjeldahl (Método 984.13; AOAC, 1997).

9.1.4. Cálculos y estimaciones

9.1.4.1 Cinética de degradabilidad de Nitrógeno *in vitro*

La fracción de N soluble *in vitro* (a) se determinó por diferencia entre la concentración de nitrógeno de la muestra original y la obtenida luego de incubar el alimento durante 3 h en agua destilada con agitación lenta a temperatura ambiente, en una proporción de 1g de muestra/L de agua, y posterior lavado con agua corriente.

$$NS = (1 - (N \text{ residual}/N \text{ incubado})) \times 100$$

NS= nitrógeno soluble (%)

N residual= nitrógeno luego de 3 h en agua destilada a temperatura ambiente (mg).

N incubado= nitrógeno incubado (mg)La desaparición de los compuestos nitrogenados en cada tiempo de incubación fue calculada según la siguiente ecuación:

$$\text{DNIV} = \frac{([\text{N-NH}_3] \times \text{Volumen saliva artificial} + \text{inóculo})}{\text{NI}}$$

DNIV= desaparición *in vitro* del nitrógeno

[N-NH₃] = concentración de amoníaco medida (mg)

NI= N incubado (mg)

La tasa de degradación proteica *in vitro* fue estimada como el coeficiente de regresión entre el logaritmo natural de la proporción indegradable ($\ln(1-\text{DNIV})$) y el tiempo de incubación (horas) (Broderick, 1987). Se presenta un ejemplo en la fig.1.

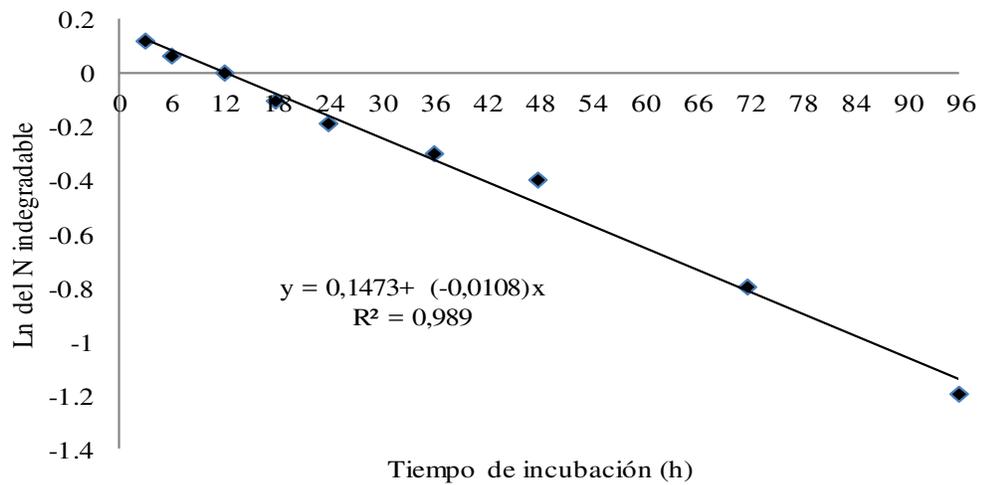


Fig. 1: Ejemplo de cálculo de la tasa de degradación proteica *in vitro* publicado por Harter 2009 utilizando la metodología propuesta por Broderick 1987. Ln: logaritmo natural de la fracción indegradable del nitrógeno de la muestra.

9.1.4.3. Cinética de degradación de Nitrógeno *in situ*

Los valores de desaparición de N de las muestras a lo largo del tiempo de incubación, fueron ajustados al modelo propuesto por Orskov y McDonald (1979) para el cálculo de las tasas de degradación, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{DegPB} = a + b \cdot (1 - \exp(-kd \cdot (\text{hora})))$$

Siendo:

DegPB= degradabilidad de la proteína del alimento

a= fracción soluble y rápidamente degradable (%)

b=fracción insoluble pero potencialmente degradable (%)

kd= tasa de degradación (%/h)

hora= tiempo de incubación (h)

Los resultados de tasa de degradación de la proteína fueron obtenidos usando el programa estadístico SAS®.

9.1.4.4. Estimación de la degradabilidad efectiva *in vitro* e *in situ*

La degradabilidad efectiva (DE) de los alimentos fue calculada con los parámetros obtenidos *in vitro*, e *in situ*, a través de la siguiente ecuación (Orskov y McDonald, 1979):

$$\text{Degradabilidad efectiva} = A + ((B \times c)/(c + k))$$

Siendo:

A= representa la fracción soluble y rápidamente degradable (%);

B= representa la fracción insoluble, pero potencialmente degradable (%);

c= tasa constante de la función B

k=tasa de pasaje de las partículas por el rumen (%/h)

9.1.5. Análisis estadístico

Los datos de degradabilidad efectiva, obtenidos con la metodología *in situ*, fueron correlacionados con los valores de la degradabilidad efectiva *in vitro* utilizando el procedimiento PROC CORR. Se empleó además un análisis de regresión lineal, utilizando el procedimiento PROC REG

9.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.2.1. Resultados

Los parámetros de la cinética de degradación ruminal *in situ*, así como la degradabilidad efectiva calculada a con una tasa de pasaje de 4%/h son presentados en el cuadro VI. Afrechillo de trigo y harina de girasol fueron los alimentos con mayores tasas de degradación ruminal.

Cuadro VI: Parámetros de cinética de degradabilidad ruminal de las proteínas estimados *in situ*, fracción soluble (A), potencialmente degradable (B), tasa de degradación y degradabilidad ruminal efectiva a una tasa de pasaje de 4%/h para afrechillo de trigo, afrechillo de arroz, raicilla, harina de girasol, cascarilla, DDGS maíz, harina de soja, alfalfa, forraje fresco de avena y avena ensilada

Alimento	A	B	Kd	DE04
Af. Trigo	21,3	70,1	33,6	83,96
Af. Arroz	27,6	60,4	16,5	76,21
Raicilla	27,0	61,5	21,0	78,81
H. Girasol	20,4	73,3	28,0	84,54
Cascarilla	18,2	69,9	7,1	62,91
DDGS Maíz	5,1	54,6	6,2	38,29
H. Soja	9,6	93,1	7,8	71,14
Alfalfa	25,0	53,7	11,7	65,02
Avena FF	75,7	12,4	9,7	84,26
Avena silo	76,9	6,3	3,2	79,70

A=fracción de N soluble; B=fracción de N potencialmente degradable; kd=tasa de degradación de los compuestos nitrogenados; DE04=degradabilidad con kp 4%/h; kp=tasa de pasaje.

Los resultados obtenidos con la técnica *in vitro* son presentados en el cuadro VII, afrechillo de trigo y harina de girasol fueron los alimentos que presentaron mayores tasas de degradación ruminal. Cascarilla de soja y ddg maíz fueron los sustratos con menor degradabilidad ruminal *in vitro*.

Cuadro VII: Parámetros de cinética de degradabilidad ruminal de las proteínas estimados *in vitro*, fracción soluble (a), potencialmente degradable (b), tasa de degradación y degradabilidad ruminal efectiva según tasa de pasaje de 4 %/h para afrechillo de trigo, afrechillo de arroz, raicilla, harina de girasol, cascarilla, DDGS maíz, harina de soja, alfalfa, forraje fresco de avena y avena ensilada

Alimento	a	b	$kd_{in vitro}$	de04
Af. Trigo	54,5	45,5	7,06	83,5
Af. Arroz	56,0	44,0	1,34	67,0
Raicilla	61,0	39,0	3,12	78,1
H. Girasol	52,5	47,5	9,48	85,9
Cascarilla	39,0	61,0	1,21	53,2
DDGS Maíz	40,4	59,6	0,91	51,4
H. Soja	20,2	79,8	6,13	68,5
Alfalfa	50,1	49,9	2,89	71,0
Avena FF	71,1	28,9	3,36	84,3
Avena silo	72,4	27,6	2,26	82,4

a =fracción de N soluble *in vitro*; b =fracción de N potencialmente degradable *in vitro*; $kd_{in vitro}$ =tasa de degradación de los compuestos nitrogenados *in vitro*; $de04$ =degradabilidad *in vitro* con kp 4%/h;; kp =tasa de pasaje.

Los valores de degradabilidad efectiva de la proteína *in vitro*, calculados a partir de la producción de amoníaco en cada horario, mostraron correlación positiva ($R=0,88$; $P<0,001$) con los valores de degradabilidad efectiva *in situ*, basados en la desaparición de nitrógeno en cada horario. Se observó una relación lineal y positiva cuando fueron estimados los parámetros de fracción soluble, tasa de degradación y degradabilidad efectiva a través de la técnica *in vitro*, comparado con los mismos parámetros estimados *in situ* (Cuadro IX).

Cuadro IX: Correlación entre la fracción soluble estimada *in situ* (A) e *in vitro* (a), tasa de degradación *in situ* (kd) e *in vitro* ($kd_{in vitro}$) y degradabilidad efectiva estimada *in situ* (DE04) e *in vitro* (de04) con una tasa de pasaje de 4%/h

	fracción soluble	tasa de degradación	degradabilidad efectiva, kp 4%/h
Correlación	0,81 ¹	0,69	0,88
P	0,004 ²	0,027	0,001

A vs. a; B vs. b; kd vs. $kd_{in vitro}$; ¹coeficiente de correlación; ²P: nivel de significancia

En la fig.6 son presentados los valores del análisis de regresión entre la degradabilidad efectiva de las proteínas estimada *in situ* (DE04) y la degradabilidad efectiva *in vitro* (de04) con una tasa de pasaje de 4%/h.

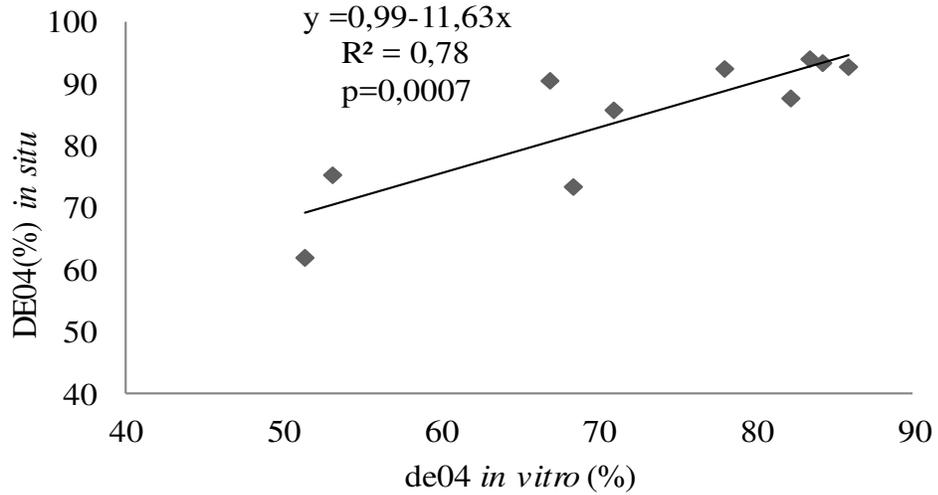


Fig.6: Regresión lineal entre la degradabilidad efectiva estimada *in vitro*(de04) e *in situ* (DE04) con tasa de pasaje “kp” (4%/h) de afrechillo de trigo, afrechillo de arroz, raicilla, harina de girasol, cascarilla de soja, DDGS maíz, harina de soja, alfalfa peleteada, forraje fresco de avena y silo de avena

9.2.2. *Discusión:*

Los valores de degradabilidad *in situ* para estos alimentos coinciden con lo publicado en la bibliografía (NRC, 2001). La diferencia entre sustratos es lógica, ya que cada alimento tiene una composición química y perfil de aminoácidos particular, lo que determinará su degradabilidad ruminal (Yang y Russell, 1992).

Los compuestos nitrogenados no proteicos son rápidamente metabolizados por las bacterias ruminales, mientras que la degradabilidad ruminal de las proteínas presenta gran variabilidad, lo que se refleja en las tasas de degradación de los diferentes sustratos utilizados en este ensayo. Debe considerarse que el residuo libre de N soluble, en el caso del valor estimado *in vitro* incluye las fracciones potencialmente degradable “B” e indegradable “C”. Otros autores obtuvieron resultados similares cuando estimaron la fracción soluble de diferentes concentrados proteicos (Reynal et al. 2007).

La tasa de degradación *in situ* fue mayor a la obtenida *in vitro*, lo que coincide con lo reportado por Harter (2009), pero en el presente estudio, el coeficiente de correlación fue mayor a lo observado por dicho autor.

Las diferencias entre los valores estimados *in situ* e *in vitro* coinciden con lo reportado por otros autores (Sehgal y Makkar, 1994; Dewhurst et al. 1995), los cuales atribuyen a una posible sobreestimación de la degradabilidad en el caso de la estimación *in situ*, debido a la pérdida de alimento a través de los poros de las bolsas incubadas en rumen, siendo una de las limitantes de la técnica *in situ* (Michalet-Doreau y Ould-Bah, 1992).

Los ensayos *in situ* basan sus cálculos en la desaparición del sustrato, considerando que el alimento que falta en las bolsas de nylon incubadas en el rumen fue degradado por las bacterias ruminales. La desaparición del sustrato en cada horario, permite calcular la tasa de degradación del alimento en cuestión (Orskov y McDonald, 1979). Dicho parámetro se correlacionó positivamente con la producción de amoníaco, lo que resulta lógico, considerando que, al degradarse el alimento por parte de las bacterias, se generan productos, como amoníaco, CO₂, CH₄, proteína microbiana y AGV.

La degradabilidad efectiva estimada *in vitro* presentó muy buena aproximación a la metodología *in situ*, sin embargo, las cinéticas de degradación fueron diferentes según la metodología utilizada. En relación a esto, es necesario recordar que para el método *in situ* se empleó el modelo propuesto por Orskov y McDonald (1979) mientras que para el método *in vitro* se estimó la cinética con un modelo diferente (Broderick 1987). Por tanto, la metodología *in vitro* propuesta, no permite comparar los parámetros de cinética con la metodología *in situ*, pero si los valores de degradabilidad efectiva obtenidos por ambos métodos.

10. EXPERIMENTO III: COMPARACIÓN DE RESULTADOS DE DEGRADACIÓN DE DIETAS MEDIANTE LAS TÉCNICAS IN VIVO E IN VITRO GAS

10.1. MATERIALES Y MÉTODOS

10.1.1. Diseño experimental

Fue realizado un experimento *in vitro* con muestras obtenidas de ensayos *in vivo*, y los resultados de degradabilidad efectiva *in vitro* fueron comparados con los datos de proteína degradable en rumen obtenidos *in vivo*.

Se seleccionaron muestras de dietas evaluadas en ensayos *in vivo*, con ovinos (UDESC) y bovinos (UFMS) canulados en duodeno (ver cuadro III). Las muestras fueron representativas de los alimentos ofrecidos en los correspondientes trabajos. Cada muestra fue previamente colocada en bolsas de polyester, e incubadas en agua destilada a temperatura ambiente por 3 h con agitación lenta. Luego eran lavadas con agua corriente hasta obtener agua cristalina, dicho residuo era considerado libre de nitrógeno soluble.

La evaluación *in vitro* se llevó a cabo según el procedimiento descrito previamente en el punto 9.1.2.1. (*Técnica in vitro*). La incubación de cada muestra fue realizada en 3 corridas, con 3 frascos por sustrato en cada corrida.

Cuadro III: Componentes de la dieta, relación forraje/suplemento y composición química (materia seca, proteína bruta y nitrógeno soluble) de los alimentos evaluados *in vivo* e *in vitro* obtenidos de trabajos realizados en las Universidades de Santa María (UFMS) y Santa Catalina (UDESC) con rumiantes canulados en duodeno

Referencias	Origen de datos	Muestras de Alimentos		MS (%)	PB (%MS)	N sol. (% N total)
		Componentes de la dieta	F/S			
Alves, 2012	UFMS	Avena + H.S	60:40	89,7	24,8	31,8
Alves, 2012	UFMS	Avena + H.S + 2% taninos	60:40	90,5	22,8	36,4
Alves, 2012	UFMS	Avena + H.S + 4% taninos	60:40	90,6	21,7	38,3
Alves, 2012	UFMS	Avena + H.S + 6% taninos	60:40	89,5	22,5	35,6
Capa de Ávila, 2013	UFMS	Silo maíz + H.S	70:30	92,8	13,7	37,0
Capa de Ávila, 2013	UFMS	Silo maíz + H.S + 5% taninos	70:30	92,5	14,1	36,6
Capa de Ávila, 2013	UFMS	Silo maíz + H.C	70:30	92,6	13,7	35,3
Capa de Ávila, 2013	UFMS	Silo maíz + H.C + 5% taninos	70:30	92,4	13,9	34,6
Rossini, 2013	UDESC	Silo de raygrass	100:0	88,0	12,3	15,4
Rossini, 2013	UDESC	Silo de raygrass + silo maíz y H.S	80:20	88,7	11,9	19,0
Rossini, 2013	UDESC	Silo de raygrass + silo maíz y H.S	75:25	90,5	11,5	21,4
Rossini, 2013	UDESC	Silo de raygrass + silo maíz y H.S	70:30	92,2	11,5	23,4
Reiter , 2012	UDESC	Capim elefante	100:0	91,1	9,3	26,8
Reiter, 2012	UDESC	Capim elefante + Arachis pintoi	66:33	90,3	11,0	27,5
Reiter , 2012	UDESC	Capim elefante + Arachis pintoi	33:66	90,4	12,4	29,1
Reiter , 2012	UDESC	Arachis pintoi	0:100	89,9	14,0	32,9
Schnaider et al, 2014	UDESC	Capim elefante 30 días al corte	100:0	91,2	9,6	29,5
Schnaider et al, 2014	UDESC	Capim elefante 30 días al corte + Arachis pintoi	70:30	91,2	10,2	31,8
Schnaider et al, 2014	UDESC	Capim elefante 45 días al corte	100:0	91,5	8,4	30,2
Schnaider et al, 2014	UDESC	Capim elefante 45 días al corte + Arachis pintoi	70:30	90,5	9,6	29,6

UFMS: Universidad Federal de Santa Maria; UDESC: Universidad de Santa Catarina; H.S: harina de soja; HC: harina de canola. F/S: Relación Forraje: Suplemento de la dieta; %MS: materia seca; PB: proteína bruta; N sol. (% N total): nitrógeno soluble como % del N total.

10.1.2. Técnicas utilizadas

10.1.2.1. Técnica *in vitro*

Fue utilizada la técnica *in vitro* descrita en el punto 9.1.2.1. (*Técnica in vitro*)

10.1.3. Análisis químicos

Las muestras de alimentos utilizados en el experimento III fueron analizadas para determinar su composición. La materia seca (MS) se determinó por secado en estufa de aire forzado a 105°C hasta peso constante (Método 7.003; AOAC, 1997) El nitrógeno total fue determinado por el método de Kjeldahl (Método 984.13; AOAC, 1997).

El muestreo fue realizado siguiendo los pasos descritos en el punto 8.1.3.1 del experimento I.

10.1.4. Cálculos y estimaciones

10.1.4.1. Cálculos para estimar degradabilidad efectiva *in vitro*

Fueron utilizados los mismos procedimientos descritos previamente en los puntos 9.1.3.1 al 9.1.3.4 para los cálculos de degradabilidad *in vitro*.

10.1.4.2. Cálculos para estimar proteína degradable en rumen *in vivo*

La estimación del consumo de nutrientes fue realizada por la diferencia entre oferta y rechazo de los alimentos ofrecidos.

El flujo de N de origen microbiano (Nm) en el intestino delgado fue estimado en base al flujo de purinas al duodeno (Chen y Gomes, 1992). El muestreo del contenido duodenal fue realizado entre el día 11 y 14 de cada periodo experimental, obteniendo 200 ml de muestra. Los muestreos fueron realizados 3 veces/día con intervalos de 8 h entre colectas. Luego las muestras fueron congeladas para posterior análisis.

El flujo de MS en el duodeno fue calculado basado en la excreción fecal y en la concentración duodenal de FDN:

$$\text{MS duodenal (g/día)} = \text{Excreción fecal (g/día)} \times \text{FDN fecal (\%)} / \text{FDN duodenal (\%)}$$

El flujo de N total (Nt) fue calculado considerando el flujo de MS duodenal y el porcentaje de N en el contenido duodenal:

$$\text{N duodenal (g/día)} = (\text{N duodenal (\%MS)} \times \text{MS duodenal (g/día)}) / 100$$

$$\text{N-amoniacal (g/día)} = (\text{N duodenal (g/día)} \times \text{N amoniacal (\% del N)}) / 100$$

El flujo de nitrógeno microbiano fue estimado por el producto entre la concentración de Nm (g/gMS) y el flujo de MS duodenal (g/día).

El flujo N residual del alimento fue estimado como la diferencia entre el flujo de N total, N amoniacal y N microbiano:

$$\text{N residual} = \text{Nt} - \text{NNH}_3 - \text{Nm}$$

Nt: nitrógeno total

NNH₃: nitrógeno amoniacal

Nm: nitrógeno microbiano

La desaparición del Nitrógeno alimentario fue estimada por la diferencia entre el consumo total de N (CN) y el N residual alimentario (incluye N endógeno):

$$\text{PDR} = \text{CN} - \text{N residual}$$

PDR: proteína degradable en rumen

CN: consumo de nitrógeno

N residual: nitrógeno residual

10.1.5. Análisis estadístico

Los datos de PDR publicados en los trabajos con rumiantes canulados en duodeno, fueron correlacionados con los obtenidos *in vitro*, mediante el procedimiento PROC CORR. Algunas variables seleccionadas se analizaron también mediante regresión lineal por el procedimiento PROC REG.

10.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

10.2.1. Resultados

Las muestras evaluadas en el experimento III provenían de dietas con diferentes proporciones de forraje/suplemento y variados niveles de inclusión de taninos de *Acacia mearnsii*. Los valores de degradabilidad ruminal estimados *in vitro* e *in vivo* de las proteínas de cada muestra son presentados en el cuadro X.

Cuadro X: Resultados de degradabilidad efectiva estimados *in vitro* con una tasa de pasaje 4%/h y proteína degradable en rumen *in vivo*, de alimentos evaluados con rumiantes canulados en duodeno en trabajos realizados en las Universidades de Santa María y Santa Catalina (Brasil).

Alimentos	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>
	de04(%PB)	PDR (%PB)
Avena + Harina de soja	53,7	78,0
Avena + Harina de soja + 2% taninos	53,3	66,0
Avena + Harina de soja + 4% taninos	51,2	45,0
Avena + Harina de soja + 6% taninos	52,1	38,0
Silo de maíz + Harina de soja	63,0	68,0
Silo de maíz + Harina de soja + 5% taninos	57,7	48,0
Silo de maíz + Harina de canola	61,6	67,0
Silo de maíz + Harina de canola + 5% taninos	57,0	55,0
Silo de Raygrass	40,4	43,0
Silo de Raigrass + Silo de maíz y H. soja (5)*	39,2	38,5
Silo de Raigrass + Silo de maíz y H. soja (10)*	47,7	55,0
Silo de Raigrass + Silo de maíz y H. soja (15)*	48,7	50,2
Capim elefante	60,2	64,0
Capim elefante + 33% Arachis pintoï	61,9	74,0
Capim elefante + 66% Arachis pintoï	61,0	75,0
Arachis pintoï	60,6	73,0
Capim elefante 30 días al corte	53,9	78,0
Capim elefante 30 días al corte + Heno de Arachis pintoï	57,8	77,0
Capim elefante 45 días al corte	66,5	75,0
Capim elefante 45 días al corte + Heno de Arachis pintoï	63,4	81,0

de04: degradabilidad ruminal *in vitro* para una tasa de pasaje de 4%/h; PDR: Proteína degradable en rumen estimada *in vivo*. *In vitro*: valores estimados *in vitro*; *In vivo*: valores obtenidos con animales canulados en duodeno.*5,10,15: gr de materia seca de suplemento (silo de maíz + h. soja)/kg de peso vivo.

Los resultados de degradabilidad ruminal *in vitro* presentaron correlación positiva con la PDR estimada *in vivo* con animales canulados en duodeno (cuadro XI).

Cuadro XI: Coeficientes de correlación entre la degradabilidad ruminal *in vitro* y los valores de proteína degradable en rumen *in vivo* de los alimentos provenientes de trabajos con rumiantes canulados en duodeno realizados en las Universidades de Santa María y Santa Catalina (Brasil)

	de02	de04	de08
PDR	r=0,74, p<0.001	r=0,72, p<0.001	r=0,66, p=0.001

PDR =proteína degradable en rumen estimada in vivo; de02=degradabilidad efectiva in vitro con kp 2%/h; de04o=degradabilidad efectiva in vitro con kp 4%/h; de08=degradabilidad efectiva in vitro con kp 8%/h.

La degradabilidad efectiva *in vitro* presentó correlación positiva con la proteína degradable en rumen *in vivo*, en la fig. 7 son presentados los valores de R² y P obtenidos a partir del análisis de regresión.

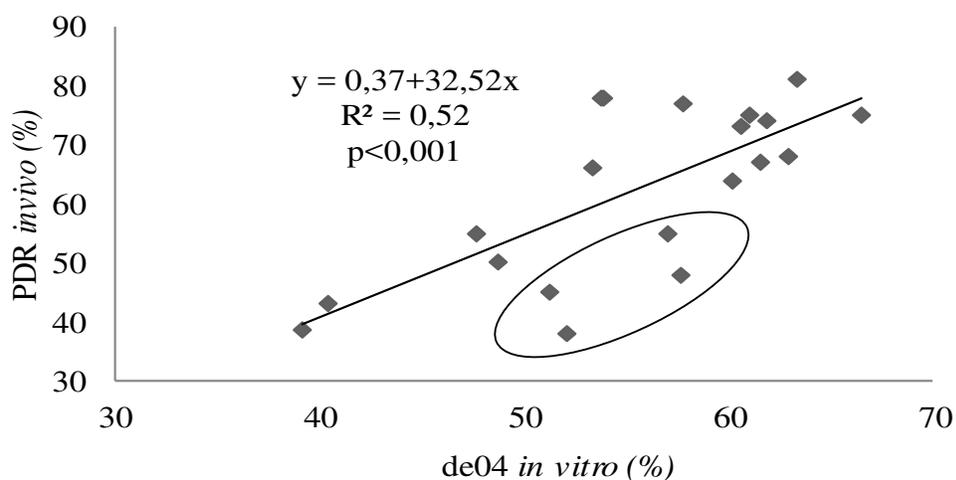


Fig.7: Regresión lineal entre la degradabilidad efectiva estimada *in vitro* con un “kp” de 4%/h y la proteína degradable en rumen *in vivo* (PDR), de dietas utilizadas en trabajos realizados en UFSM y UDESC con rumiantes canulados en duodeno. (Puntos delimitados dentro del ovalo, corresponden a muestras conteniendo taninos).

Cuando el análisis de regresión se realizó sin las muestras que incluían taninos, el coeficiente mejoró notoriamente, estos valores son presentados en la fig. 8.

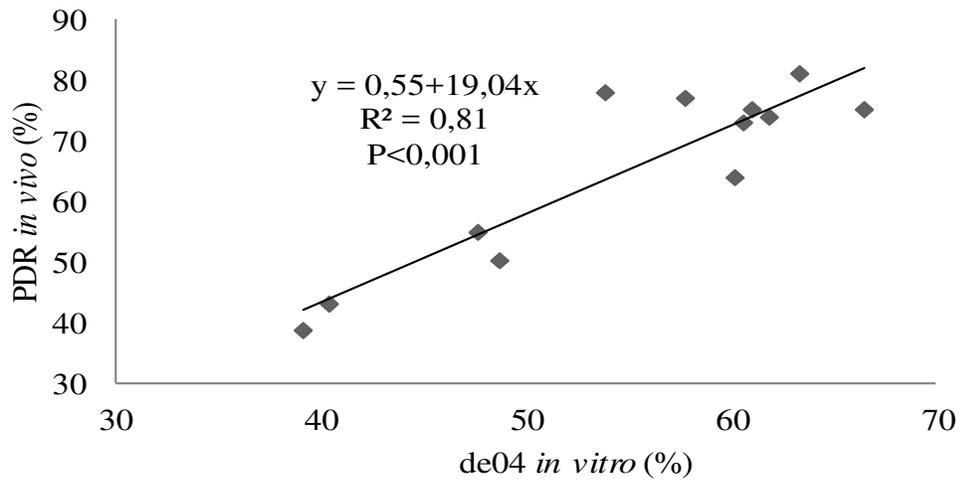


Fig.8: Análisis de regresión entre la degradabilidad efectiva estimada *in vitro* con un “*k_p*” de 4%/h y la proteína degradable en rumen *in vivo* (PDR) de muestras sin taninos de dietas utilizadas en trabajos realizados en UDESC con rumiantes canulados en duodeno.

10.2.2 Discusión

Los resultados de degradabilidad efectiva *in vitro* presentaron correlación positiva con la proteína degradable en rumen *in vivo*, a diferencia de los resultados obtenidos por Harter (2009), en el presente trabajo existió relación lineal y positiva entre los valores obtenidos por ambas técnicas.

El coeficiente de regresión mejoró notoriamente cuando la comparación se realizó excluyendo las muestras conteniendo taninos (Alves 2012; Capa de Ávila 2013), dichos compuestos secundarios alteran la degradación ruminal de las proteínas (Min et al. 2003; Patra y Saxena, 2010) lo que se reflejó en los resultados obtenidos con las pruebas *in vivo* e *in vitro*.

Son pocos los trabajos que comparan las técnicas *in vitro* con ensayos *in vivo*, sin embargo, existen factores como el reciclado de la urea o el aporte de N endógeno que no pueden ser reproducidos *in vitro*, pudiendo ser causa de fallos en la simulación del metabolismo nitrogenado (Meng et al. 1999; Tapia et al. 2002; Rotger et al. 2006), lo cual en este experimento no fue una limitante para lograr resultados significativos.

Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con lo reportado por Sehgal y Makkar (1994), quienes reportan buena aproximación entre los resultados obtenidos *in vitro* e *in situ* respecto a la técnica *in vivo*. Remarcando que la diferencia obtenida *in vitro-in situ* puede atribuirse a la pérdida de partículas a través de los poros de las bolsas.

La propuesta de métodos *in vitro* que permitan una aproximación a los resultados *in vivo* resulta relevante, considerando que estos métodos suponen una simplificación importante del complejo proceso de fermentación ruminal y generan información que es de gran utilidad para el diseño y clarificación de los ensayos *in vivo* (Merry et al., 1990).

Por lo antes mencionado, y analizando la correlación con los resultados *in vivo*, el presente trabajo permitió generar datos promisorios sobre la validación de una técnica *in vitro* para estimar degradabilidad efectiva de los compuestos nitrogenados.

11. CONCLUSIONES E IMPLICANCIAS

La producción de gas *in vitro* no presenta correlación con la dinámica de la biomasa microbiana, por tanto, no es posible utilizarla como herramienta para estimar la captación de amoníaco *in vitro*.

La degradabilidad efectiva *in vitro* a partir de la producción de amoníaco presentó correlaciones razonablemente buenas con las técnicas *in situ* e *in vivo*, lo que avala el potencial de la técnica *in vitro* como método de evaluación de muestras de alimento.

Serán necesarios futuros trabajos para que la técnica *in vitro* pueda ser puesta en práctica como metodología para estimar la degradabilidad efectiva de las proteínas.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agricultural and Food Research Council (1992). Nutritive requirements of ruminant animals: protein (Report 9). Nutrition Abstracts and Reviews, CAB International, Wallingford, 62:787-835
2. Agricultural and Food Research Council (1993). Energy and protein requirements of ruminants. CAB International, Wallingford.
3. Agricultural and Food Research Council (1995). Energy and protein requirements of ruminants. CAB International, Wallingford, Oxon, U.K
4. Aguerre M., Repetto J.L., Pérez-Ruchel A., Mendoza A., Pinacchio G., Cajarville C. (2009). Rumen pH and NH₃-N concentration of sheep fed temperate pastures supplemented with sorghum grain. South African Journal of Animal Science 39: 246-250.
5. Aguerre M., Cajarville C., Kozloski G.V. y Repetto J.L. (2013). Intake and digestive responses by ruminants fed fresh temperate pasture supplemented with increased levels of sorghum grain: a comparison between cattle and sheep. Anim. Feed Sci. Technol. 186: 12-19.
6. Alves P.T. (2012). Avaliação do uso de extracto tanífero de *Acacia mearnsii* como modulador da fermentação ruminal em bovinos. Tesis de maestría, Universidad de Federal de Santa María, Santa María (RS), Brasil.
7. Association of Official Analytical Chemists A.O.A.C. (1997). Methods of Analysis. 16th ed. 3rd revision. Gaithersburg, MD, USA.
8. Bach A., Calsamiglia S., Stern M.D. (2005). Nitrogen metabolism in the rumen. J. Dairy Sci. 88: 9-21.
9. Beckers Y., Théwis A., Maudoux B., y François E. (1995). Studies on the in situ nitrogen degradability corrected for bacterial contamination of concentrate feeds in steers. J. Anim. Sci. 73:220–227.
10. Beaver D. E. y Mould F. L. (2000). Forage evaluation for efficient ruminant livestock production. Forage Evaluation in Ruminant Nutrition. Givens, D.I., Owen, E., Axford, R. F.E., Omed, H.M. (Eds.). CABI Publishing, Wallingford, UK
11. Beuvink J. M. W., Spoelstra S. F., Hogendorp R. J. (1992). An automated method for measuring time-course of gas production of feedstuffs incubated with buffered rumen fluid. Neth. J. Agric. Sci. 40:401–407.
12. Blümmel M. y Orskov E. R. (1993). Comparison of in vitro gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle, Anim. Feed Sci. Technol. 40: 109-119.
13. Blümmel M., Makkar H. P. S., Becker K. (1997). In vitro gas production: A technique revisited. J. Anim. Physiol. 77:24–34

14. Blümmel M. y Bullerdieck P. (1997). The need to complement the in vitro gas measurements with residue determination from in sacco degradabilities to improve the prediction of voluntary intake of hays. *Anim Sci* 64:71–75
15. Broderick G.A. (1987). Determination of protein degradation rates using a ruminal in vitro system containing inhibitors of microbial nitrogen metabolism. *British Journal of Nutrition*. 67:27-42.
16. Broderick G. A., Merchen N. R. (1992). Markers for quantifying microbial protein synthesis in the rumen. *J. Dairy Sci.* 75:2618– 2632.
17. Bruni M. A. y Chilibroste P. (2001). Simulación de la digestión ruminal por el método de la producción de gas. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 9: 43-51.
18. Capa de Ávila S. (2013). Fermentação ruminal e digestibilidade em bovinos recebendo dietas com ou sem adição de extrato tanífero de acacia mearnsii. Tesis de maestría, Universidad Federal de Santa María, Santa María (RS), Brasil.
19. Carro M. D., Ranilla M. J., Martin-Garcia A. I., Molina-Alcaide E. (2009). Comparison of microbial fermentation of high- and low-forage diets in Rusitec, single-flow continuous-culture fermenters and sheep rumen. *Animal*. doi:10.1017/S1751731108003844
20. Clark J.H., Klusmeyer T.H., Cameron M.R. (1992). Symposium: Nitrogen metabolism and amino acid nutrition in dairy cattle. Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. *J Dairy Sci.* 75: 2304-2323.
21. Chamberlain D.G. y Thomas P.C. (1979). *Proceedings of the Nutrition Society* 38, 138A.
22. Chen X. B., Gomes M. J. (1992) Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives – An overview of the technical details. *International Feed Resources Unit Rowett Research Institute , Bucksburn: Rowett Research Institute, Aberdeen.*1-22.
23. Czerkawski J.W. (1986). *An introduction to rumen studies.* Pergamon Press, Oxford, UK.
24. Devant M., Ferret A., Calsamiglia S., Casals R., Gasa J. (2001). Effect of nitrogen source in high-concentrate, low-protein beef cattle diets on microbial fermentation studied in vivo and in vitro. *J. Anim. Sci.* 79:1944–1953.
25. Dewhurst R.J., Hepper D, Webster A.J.F (1995). Comparison of in sacco and in vitro techniques for estimating the rate and extent of rumen fermentation of a range of dietary ingredients. *Anim. Feed Sci. Technol.* 51:211-229.

26. Dijkstra J., Kebreab E., Bannink A., France J., López S. (2005). Application of the gas production technique to feed evaluation systems for ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123–124: 561–578.
27. Edmunds B., Südekum K-H., Spiekers H., Schwarz F.J. (2012). Estimating ruminal crude protein degradation of forages using in situ and in vitro technique. *Anim. Feed Sci. Technol.* 175:95-105.
28. Faichney G. J. (1993). Digesta flow. In: Forbes, J. M.; France, J. (Eds.) *Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism*. London: Commonwealth Agricultural Bureaux, Cambridge University p.53-85
29. Getachew G., Makkar H. P. S. Becker K. (1998). The in vitro gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 72: 261– 281.
30. Hannah S. M., Stern M. D., Ehle F. R. (1986). Evaluation of a dual flow continuous culture system for estimating bacterial fermentation in vivo of mixed diets containing various soybean products. *Anim. Feed Sci. Technol.* 16: 51-62.
31. Harter C J (2009). Desenvolvimento e avaliação de um método in vitro para estimar a degradabilidade das proteínas no rumen. Tesis de maestría. Universidad Federal de Santa María, Santa María (RS), Brasil.
32. Huhtanen, P., Vanhatalo, A., Varvikko, T. (1998) Enzyme activities of rumen particles and feed samples incubated in situ with differing types of cloth. *British Journal of Nutrition* 79:161-168.
33. Karlsson L., Hetta M., Udén P., Martinsson K. (2009). New methodology for estimating rumen protein degradation using the in vitro gas production technique. *Anim. Feed Sci. Technol.* 153:193-202.
34. Khazaal K., Dentinho M. T., Ribeiro J. M., Ørskov E. R. (1993). A comparison of gas production during incubation with rumen contents in vitro and nylon bag degradability as predictors of the apparent digestibility in vivo and the voluntary feed intake of hays. *Anim. Science.* 57: 105–112.
35. Kozloski, G. (2011). *Bioquímica dos Ruminantes*. 3ed. Santa María: Ed. UFSM.
36. López S. (2005). In Vitro and In Situ Techniques for Estimating Digestibility. In: *Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism*. Jan Dijkstra, J.; Forbes, J. M.; France, J., 2 ed.
37. Makkar H. P. S. y Becker K. (1999). Purine quantification in digesta from ruminants by spectrophotometric and HPLC methods. *British J. of Nutrition* 81: 107–112.
38. Makkar H. P. S. (2004). Assessing quality and safety of animal feed. *FAO. Recent advances in the in vitro gas method for evaluation of nutritional quality of feed resources.* (<http://www.fao.org/docrep/007/y5159e/y5159e05.htm#bm05>).

39. Mansfield H. R., Endres I. M., Stern M.D. (1995). Comparison of microbial fermentation in the rumen of dairy cows and dual flow continuous culture. *Anim. Feed Sci. Technol.* 55:47-66.
40. Marichal M. de J., Trujillo A.I., Guerra M.H., Carriquiry M., Piaggio L. (2009). Comparación de las cinéticas de liberación de N-NH₃ in vitro y de la degradación ruminal del N de la urea protegida, urea y subproductos agroindustriales. *Agrociencia* Vol. XIII N°2 p.52-59.
41. 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.
42. Menke K. H., Raab L., Salewski A. Steingass H., Fritz D., Schneider W. (1979). The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. 93:217-222.
43. Mehrez A. Z. y Ørskov E. R. (1977). A study of the artificial fibre bag technique for determining the digestibility of feed in the rumen. *Journal of Agricultural Science* 88: 645-650.
44. Meng Q., Kerley M.S., Ludden P. A., Belyea R. L. (1999). Fermentation substrate and DR interact to affect microbial growth and efficiency. *J. Anim. Sci.* 77:206-214.
45. Merry R. J., McAllan A. B., Smith R. H. (1990). In vitro continuous culture studies on the effect of nitrogen source on rumen microbial growth and fibre digestion. *Anim. Feed Sci. Technol.* 31: 55-64.
46. Michalet-Doreau B., y Ould-Bah M. Y. (1992). In vitro and in sacco methods for the estimation of dietary nitrogen degradability in the rumen: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 40: 57-86.
47. Michalet-Doreau B., Noziere P. (1998). Validation of in situ nitrogen degradation measurements: comparative proteolytic activity of solid-adherent microorganisms isolated from rumen content and nylon bags containing various feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 70:41-47.
48. Min B.R., Barry T. N., Attwood G. T., McNabb W.C. (2003). The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 106: 3–19.
49. Muetzel S., Lawrence P., Hoffmann E. M., Becker K. (2009) Evaluation of a stratified continuous rumen incubation system. *Anim. Feed Sci. Technol.* 151:32-43.
50. National Research Council. (1996). *Nutrient requirements of Beef Cattle* . 7.ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
51. National Research Council (2001). *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.

52. Nocek J. E. (1988) In situ and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility: a review. *J. Dairy Sci.* 71: 2051 – 2069.
53. Olmos-Colmenero J.J., Broderick G.A.(2006). Effect of Dietary Crude Protein Concentration on Milk Production and Nitrogen Utilization in Lactating Dairy Cows. *J. Dairy Sci.*89:1704-1712.
54. Orskov E.R., McDonald I. (1979). The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal Agricultural Science* 92:499-503.
55. Patra A. K., Saxena J. (2010) Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. *J. Sci. Food Agric.* 91: 24 -37.
56. Paz H. A., Klopfenstein T. J., Hostetler D., Fernando S. C, Castillo-Lopez E., Kononoff P. J. (2014). Ruminal degradation and intestinal digestibility of protein and amino acids in high-protein feedstuffs commonly used in dairy diets. *J. Dairy Sci* 7:6485–6498.
57. Pell A. N., Schofield P. (1993). Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion in vitro. *J. Dairy Sci.* 76:1063-1073.
58. Pell A.N., Schofield P., Stone W.C.(1994). Rates of digestion of feeds measured in vitro with computers. *Proc. Cornell Nutr. Conf.* 74-81.
59. Poncet C. B. (1995). Dietary compounds escaping rumen digestion. In M. Journet, E. Grenet, M.-H. Farce, M. Theriez, and C. Demarquilly, ed. *Recent Development in the Nutrition of Herbivores*. INRA Editions, Paris. p. 167.
60. Raab L., Cafantaris B., Jilg T., Menke K.H. (1983). Rumen protein degradation and biosynthesis. 1. A new method for determination of protein degradation in rumen fluid in vitro. *British Journal of Nutrition* 50:569-582.
61. Reiter T. (2012). Introdução de leguminosas tropicais em dietas para ruminantes: efeito do nível de inclusão do amendoim forrageiro sobre o valor alimentar. Tesis de maestría, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages (SC), Brasil.
62. Reynal S. M., Ipharraguerre I.R., Liñeiro M., Brito A F., Broderick G. A., Clark J. H.(2007). Omasal Flow of Soluble Proteins, Peptides, and Free Amino Acids in Dairy Cows Fed Diets Supplemented with Proteins of Varying Ruminal Degradabilities. *J. Dairy Sci.* 90:1887-1903.
63. Reynolds C. K., Harmon D. L., Cecava M. J. (1994). Absorption and delivery of nutrients for milk protein synthesis by portal-drained viscera. *J. Dairy Sci.* 77: 2787-2808.
64. Rossini A. J. G. (2013). Valor alimentar da dieta em ruminantes alimentados com azevém e diferentes níveis de forragem suplementar a base de silagem de milho. Tesis de maestría, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages (SC), Brasil.
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., O'Connor J. D., Fox D. G., Van Soest P. J., Sniffen C. J. (1992). A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. *J Anim Sci.* 70:3551-3561.

67. Russell J.B., Strobel H.J. (1993) Microbial energetics. Quantitative Aspects of the Ruminant Digestion and Metabolism. Forbes, J M, France, J.D. (Eds.) Wallingford, Oxon.: CAB International

68. 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.

69. Satter L. D., Slyter L. L. (1974). Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. *Br. J. Nutr.* 32, 199.

70. SAS. Statistical Analysis Systems User's Guide . Version 2001, SAS Institute, Cary, NC.

71. Schadt I., Hoover W. H., Miller-Webster T. K., Thayne W. V., Licitra G. (1999). Degradation of two protein sources at three solids retention times in continuous culture. *J. Anim. Sci.* 77: 485-491.

72. Schnaider M. A., Ribeiro-Filho H. M. N., Kozloski G. V., Orsoletta A. C. D., Dallabrida A. L. (2014). Intake and digestion of wethers fed with dwarf elephant grass hay 5 with or without the inclusion of peanut hay. *Trop Anim Health Prod.* 46: 975–980.

73. Schofield P., Pitt R. E., Pell A. N. (1994). Kinetics of fiber digestion from in vitro gas production. *J. Anim. Sci.* 72: 2980-2991.

74. Schofield P. (2000). Gas production methods. *Farm Animal Metabolism and Nutrition.* Wallingford. CAB International, UK.

75. Sehgal J. P., y Makkar G. S. (1994). Protein evaluation in ruminants in vitro, in sacco, in vivo protein degradability and microbial efficiency of different protein supplements in growing buffalo calves. *Anim. Feed Sci. Technol.* 45:149-165.

76. Siaw D. E. K. A., Osuji P. O., Nsahlai I. V. (1993). Evaluation of multipurpose tree germplasm: the use of gas production and rumen degradation characteristics., *J. Agric. Sci., Camb.* 120: 319–330.

77. Slyter L. L., Putnam P. A. (1967). In vivo vs. in vitro continuous culture of ruminal microbial populations. *J. Anim. Sci.*, 26. p. 1421-1427.

78. Stern M. D., Calsamiglia S., Endres M.I. (1994). Dinámica del metabolismo de los hidratos de carbono y del nitrógeno en el rumen. Nuevos sistemas de valoración de alimentos y programas alimenticios para especies domésticas. Ed. FEDNA, Madrid.

79. Stern M D, Bach A., Calsamiglia S. (1997). Alternative techniques for measuring nutrient digestion in ruminants. *J Anim Sci*: 75:2256-2276.
80. Tapia M. O., Stern M. D., Koski R. L., Bach A., Murphy M. J. (2002). Effects of patulin on rumen microbial fermentation in continuous culture fermenters, *Anim. Feed Sci. Technol.* 97: 239–246.
81. Theodorou M.K., Williams B.A, Dhanoa M.S., McAllan A.B., France J. (1994). A simple gas production using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology.* 48: 185-197.
82. Van Kessel J.S., Russell J.B. (1996). The effect of amino-nitrogen on the energetics of ruminal bacteria and its impact on energy spilling. *J. Dairy Sci.* 79: 1237-1243.
83. Van Soest, P. J. (1994). *Nutritional ecology of the ruminant.* Cornell University Press, Ithaca, NY.
84. Vanzant E S., Cochran R C, Titgemeyer E C. (1998). Standardization of in situ techniques for ruminant feedstuff evaluation. *J. Anim. Sci.* 76:2717-2729.
85. Verbic, J. (2002). Factors affecting microbial protein synthesis in the rumen with emphasis on diets containing forages. *Viehwirtschaftliche Fachtagung, Milchproduktion und Rindermast.* Gumpenstein, Germany.
86. Wallace R.J. (1996). Ruminal microbial metabolism of peptides and amino acids. Conference: Altering ruminal nitrogen metabolism to improve protein utilization. *J. Nutr.*126: 1326S-1335S.
87. Wang P.P., Tan Z. L.(2013). Ammonia assimilation in rumen bacteria: a review. *Anim. Biotechnol.* 24: 107-128.
88. Wang Pengpeng, Tan Zhiliang, Guan Leluo, Tang Shaoxun, Zhou Chuanshe, Han Xuefeng, Kang Jinhe, He Zhixiong. (2015). Ammonia and amino acids modulates enzymes associated with ammonia assimilation pathway by ruminal microbiota in vitro. *Livestock Science* 178:130-139.
89. Weatherburn, M.W. (1967). Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry.*
90. Wolin M. J. (1960). A theoretical rumen fermentation balance. *J. Dairy Sci.* 43:1452–1459.
91. Woods V. B. O'Mara F. P., Moloney A. P. (2002). The in situ ruminal degradability of concentrate feedstuffs in steers as affected by level of feed consumption and ratio of grass silage to concentrate. *Anim. Feed Sci. Technol.* 100: 15–30.
92. Yang C. M. J., Huang S. C. Chang T., Cheng Y. H., Chang C. T. (2004). Fermentation acids, aerobic fungal growth, and intake of napiergrass ensiled with nonfiber carbohydrates, *J. Dairy Sci.* 86: 630–636.

93. Yang C. M. J. y Russell J. B. (1992). Resistance of proline-containing peptides to ruminal degradation in vitro. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 58, p.3954-3958.

94. Ziemer C. J., Sharp R., Stern M. D., Cotta M. A., Whitehead T. R., Stahl D. A. (2000). Comparison of microbial populations in model and natural rumens using 16S ribosomal RNA-targeted probes. *Environ. Microbiol.* 2(6):632-643.

13. ANEXOS

13.1. ANEXO 1: ENSAYO CON SUSTRATOS PUROS: VALORES DE PURINAS, PRODUCCIÓN DE GAS Y N-AMONIAL *IN VITRO* EN LOS 3 ENSAYOS (VALORES PROMEDIO/ENSAYO).

Muestra	E	t (h)	Purinas (mg/g MSi)	Producción de gas (mL/g MSi)	N-NH3 (mg/g MSi)
Almidón	1	0	4.62	0.00	18.45
Almidón	1	6	5.49	27.04	15.44
Almidón	1	12	6.93	120.92	12.66
Almidón	1	18	6.24	143.99	8.81
Almidón	1	24	7.61	158.36	7.20
Almidón	1	36	7.80	187.69	5.65
Almidón	1	48	7.72	228.59	7.67
Almidón	1	72	6.57	235.62	7.71
Almidón	2	0	7.01	0.00	19.08
Almidón	2	6	10.04	23.53	16.59
Almidón	2	12	9.58	111.73	8.40
Almidón	2	18	10.47	147.48	9.96
Almidón	2	24	11.22	177.27	8.91
Almidón	2	36	7.49	249.69	8.00
Almidón	2	48	6.16	274.25	8.12
Almidón	2	72	6.98	284.20	7.57
Almidón	3	0	6.87	0.00	17.85
Almidón	3	6	6.14	58.25	14.18
Almidón	3	12	5.31	159.00	12.40
Almidón	3	18	5.24	212.08	4.74
Almidón	3	24	5.03	249.56	9.01
Almidón	3	36	6.23	292.68	11.05
Almidón	3	48	3.71	310.92	15.40
Almidón	3	72	2.61	323.89	22.65
Celulosa	1	0	5.36	0.00	20.64
Celulosa	1	6	4.36	2.89	22.09
Celulosa	1	12	4.98	25.88	19.88
Celulosa	1	18	4.66	67.24	18.18
Celulosa	1	24	4.20	121.64	14.80
Celulosa	1	36	4.97	208.03	11.28
Celulosa	1	48	4.84	246.72	13.37
Celulosa	1	72	3.36	272.05	17.79
Celulosa	2	0	5.05	0.00	16.19
Celulosa	2	6	5.07	3.88	19.21
Celulosa	2	12	4.94	27.69	16.73
Celulosa	2	18	4.53	69.88	13.24
Celulosa	2	24	4.89	117.48	10.75
Celulosa	2	36	5.02	186.58	9.97

Celulosa	2	48	5.71	214.85	14.21
Celulosa	2	72	4.59	227.30	15.86
Celulosa	3	0	2.97	0.0	21.35
Celulosa	3	6	3.14	0.40	22.66
Celulosa	3	12	2.90	1.06	23.31
Celulosa	3	18	3.31	7.43	22.03
Celulosa	3	24	3.79	31.64	19.37
Celulosa	3	36	2.76	102.65	13.29
Celulosa	3	48	4.04	146.56	11.56
Celulosa	3	72	4.32	187.97	12.56
Caseina	1	0	4.05	0.00	14.94
Caseina	1	6	4.15	2.93	23.07
Caseina	1	12	4.49	17.57	42.55
Caseina	1	18	5.22	40.25	59.48
Caseina	1	24	5.14	63.71	73.95
Caseina	1	36	4.63	89.84	101.49
Caseina	1	48	4.09	100.56	115.67
Caseina	1	72	4.26	111.61	116.03
Caseina	2	0	3.95	0.00	22.60
Caseina	2	6	3.99	9.65	15.63
Caseina	2	12	4.22	37.73	25.57
Caseina	2	18	4.09	65.27	65.88
Caseina	2	24	3.65	87.03	58.94
Caseina	2	36	4.30	114.86	90.54
Caseina	2	48	3.86	124.54	81.45
Caseina	2	72	3.18	134.66	116.71
Caseina	3	0	2.83	0.00	10.75
Caseina	3	6	2.95	3.26	15.71
Caseina	3	12	3.44	17.93	24.63
Caseina	3	18	3.40	39.08	55.07
Caseina	3	24	3.14	57.54	85.72
Caseina	3	36	3.52	83.02	93.92
Caseina	3	48	3.00	98.97	114.79
Caseina	3	72	2.55	116.28	116.80

E: ensayo; t: tiempo

