



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**SUPLEMENTACIÓN DE FORRAJES DE ALTA CALIDAD CON  
DIFERENTES TIPOS DE CONCENTRADOS**

Efectos sobre la fermentación ruminal

**ALEJANDRO BRITOS ARCAUS**

**TESIS DE MAESTRÍA EN NUTRICIÓN DE RUMIANTES**

**URUGUAY  
2012**





**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**SUPLEMENTACIÓN DE FORRAJES DE ALTA CALIDAD CON  
DIFERENTES TIPOS DE CONCENTRADOS**

Efectos sobre la fermentación ruminal

**ALEJANDRO BRITOS ARCAUS**

---

**Cecilia Cajarville Sanz**  
**Director de Tesis**

---

**José Luis Repetto**  
**Co-director**

**2012**

**INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE**

**DEFENSA DE TESIS**

**María de Jesús Marichal; Ing. Agr., MSc.  
Departamento de Producción Animal y Pasturas, Facultad de  
Agronomía  
UdelaR - Uruguay**

**Gilberto Kozloski; Méd. Vet., MSc., PhD.  
Departamento de Zootecnia, Centro de Ciências Rurais  
Universidade Federal de Santa Maria – Brasil**

**Pablo Zunino; Méd. Vet., MSc., PhD.  
Departamento de Microbiología, Instituto de Investigaciones  
Biológicas Clemente Estable  
Ministerio de Educación y Cultura – Uruguay**



**FACULTAD DE VETERINARIA  
Programa de Posgrados**

**ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS**

**DE MAESTRÍA EN NUTRICIÓN DE RUMIANTES**

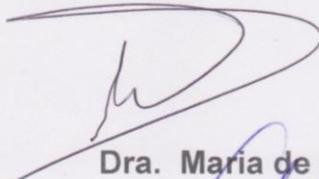
**“Suplementación de forrajes de alta calidad con diferentes tipos de concentrados- Efectos sobre la fermentación ruminal”**

---

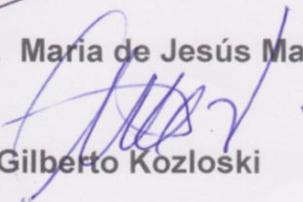
**Por: Dr. Alejandro Britos Arcaus  
Director de Tesis: Dra. Cecilia Cajarville  
Co-director de Tesis: Dr. José Luis Repetto**

**Tribunal**

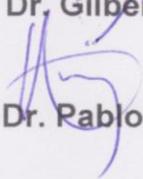
**Presidente:**

 **Dra. Maria de Jesús Marichal**

**Segundo Miembro:**

 **Dr. Gilberto Kozloski**

**Tercer Miembro:**

 **Dr. Pablo Zunino**

**Fallo del Tribunal:**

**Aprobada con Mención**

**Montevideo, 27 de setiembre de 2012**



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE VETERINARIA  
Postgrados Académicos y Especializaciones

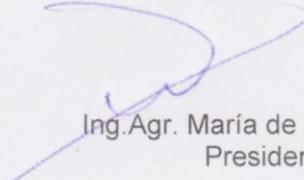
Montevideo, 1 de Octubre, 2012

El Tribunal que evaluó el documento así como la presentación y defensa oral del trabajo del Dr. Alejandro Britos, consideró que el trabajo fue realizado con interés y responsabilidad académica.

El trabajo abarcó aspectos básicos para nuestros sistemas de producción animal basados en pasturas sembradas, reconociéndose claramente el objetivo de contribuir a generar resultados que aportan a un nicho específico de carencia de información. Ese objetivo se logró y se presentaron caminos a explorar a partir de los resultados obtenidos.

La presentación oral de los resultados y su discusión fueron claros y de fácil comprensión. La defensa de la tesis mostró compromiso y conocimiento profundo de los antecedentes, resultados e implicancias del trabajo realizado.

Por los motivos antes expuestos, el trabajo de Tesis "Suplementación de forrajes de alta calidad con diferentes tipos de concentrados", Tesis de Maestría del Dr. Alejandro Britos, ha sido calificado como aprobada con mención.

  
Ing. Agr. María de Jesús Marichal  
Presidente del Tribunal

“Las ciencias aplicadas no existen, sólo las aplicaciones de la ciencia.”

Louis Pasteur (1822-1895)

“La ciencia será siempre una búsqueda, jamás un descubrimiento real. Es un viaje, nunca una llegada.”

Karl Popper (1902-1994)

*A mis abuelos*

## **AGRADECIMIENTOS**

- A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), por la financiación de los experimentos
- A Cecilia y Joselo, por haberme orientado en esta y en otras instancias.
- A Analía y Coco, por su colaboración y por crear un excelente ambiente de trabajo.
- A Alejandro, Álvaro, Carolina, Martín y Natalia,
- A Nicolle, por la notable labor cumplida en el Experimento I.
- A Agustín, Guillermo, Leandro, Marisa, Martín, Miguel, Nicolás y Sofía, por el gran trabajo que realizaron en el Experimento II.
- A la directora y a los funcionarios del Campo Experimental N°2 de la Facultad de Veterinaria, por la colaboración prestada en los trabajos de campo.
- A mis padres
- A Andrea

## ÍNDICE

1.1. RESUMEN.....	1
1.2. SUMMARY.....	2
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.....	4
3.1. <i>Efectos a nivel ruminal de la suplementación</i> .....	4
3.2. <i>La técnica de producción de gas in vitro como herramienta</i> .....	8
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS.....	10
4.1. <i>Hipótesis</i> .....	10
4.2. <i>Objetivos</i> .....	10
5. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN.....	11
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
6.1. <i>Diseños experimentales</i> .....	12
6.2. <i>Métodos analíticos</i> .....	14
7. RESULTADOS.....	17
7.1. <i>Experimento I</i> .....	17
7.2. <i>Experimento II</i> .....	21
8. DISCUSIÓN.....	28
8.1. <i>Fermentescibilidad</i> .....	28
8.2. <i>Actividad fermentativa</i> .....	29
9. CONCLUSIONES.....	30
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
11. ANEXO.....	36

## 1.1 RESUMEN

Se realizaron 3 experimentos con el fin de estudiar los efectos de la suplementación de forrajes de alta calidad con diferentes tipos de concentrados energéticos. En el experimento I se evaluó el efecto de la inclusión de niveles crecientes desde 0 a 100% de pulpa de citrus, maíz o cebada a una pastura fresca de alta calidad sobre la fermentación *in vitro*. En el experimento II se estimó el efecto de la inclusión de niveles crecientes desde 0 a 100% de cascarilla de soja, maíz o cebada sobre un ensilaje de pastura de alta calidad sobre la fermentación *in vitro*. El experimento III determinó la actividad fermentativa del líquido ruminal de 24 vaquillonas consumiendo un ensilaje de pastura como único alimento o suplementado con cascarilla de soja, maíz o cebada a razón del 1% del PV sobre concentrados o forrajes. En los experimentos se utilizó la técnica de producción de gas *in vitro* y los datos de volumen de gas fueron ajustados a un modelo exponencial simple con tiempo de latencia. En los experimentos I y II se realizaron regresiones lineales y cuadráticas mediante PROC REG de SAS<sup>®</sup> y se compararon las pendientes de las regresiones lineales. El experimento III fue analizado utilizando PROC MIXED de SAS<sup>®</sup>, las medias fueron separadas por LSMEANS y la opción SLICE se usó para detectar los efectos simples principales de la actividad fermentativa de los líquidos ruminales. El aumento del nivel de inclusión de concentrados incrementó la producción de gas y disminuyó la tasa de producción en los experimentos I y II. Se detectaron diferencias entre las respuestas lineales a la inclusión creciente de diferentes concentrados en la tasa de producción de gas ( $P < 0,001$ ) del experimento I y en el volumen de gas y en la tasa ( $P = 0,007$  y  $P < 0,001$ , respectivamente) en el experimento II. Los concentrados fibrosos disminuyeron la velocidad de fermentación como los concentrados almidonosos, aunque con distinta magnitud. La cascarilla de soja incrementó el volumen de gas más que la inclusión de cebada. En cuanto a la actividad fermentativa, se observaron interacciones entre líquido ruminal y tipo de alimento en el volumen de gas ( $P < 0,001$ ) y el tiempo de latencia ( $P < 0,001$ ). Los líquidos ruminales presentaron diferentes actividades fermentativas al incubar concentrados, pero no sobre forrajes. La suplementación con cebada generó un fluido ruminal que inicio rápidamente su actividad sobre concentrados pero produjo menor volumen de gas. La inclusión de diferente tipo de concentrados causó similares respuestas, aunque en algunos casos de diferente magnitud, y la suplementación de animales con diferentes concentrados llevó a ambientes ruminales con diferentes actividades fermentativas.

## 1.2 SUMMARY

Three experiments were conducted in order to study the effects of supplementation of high quality forages with different energy concentrates. In Experiment I it was evaluated the effect of increasing inclusion levels from 0 to 100% of citrus pulp, corn or barley to high quality pasture on *in vitro* fermentation. In Experiment II it was evaluated the effect of increasing inclusion levels from 0 to 100% of soyhulls, corn or barley to a high quality pasture silage on *in vitro* gas fermentation. Experiment III determined the fermentative activity of rumen fluid from 24 heifers consuming pasture silage as a sole feed or supplemented with soyhulls, corn or barley at 1% of BW. The *in vitro* gas production technique was used for the experiments, and the gas volume data were fitted to a simple exponential model with lag time. For experiment I and II linear and quadratic regressions were conducted using PROC REG of SAS<sup>®</sup> and the slopes of the linear regressions were compared using dummy variables. Experiment III was analyzed using PROC MIXED of SAS<sup>®</sup>, the means were separated by LSMEANS and the SLICE option was used to detect simple main effects of rumen fluid activity. The increase of concentrate inclusion level enhanced gas production and decreased the rate of production in experiments I and II. Differences were detected between linear responses to the increasing inclusion level of different concentrates for gas production rate of experiment I ( $P < 0.001$ ) and for the gas volume and the rate of gas production ( $P = 0.007$  and  $P < 0.001$ , respectively) of experiment II. The fibrous concentrates decreased the fermentation rate as starchy concentrates, although with different magnitude. Soyhulls increased gas volume more than the inclusion of barley. Regarding fermentative activity, interactions between rumen fluid and type of feedstuff were detected for volume ( $P < 0.001$ ) and lag time of gas production ( $P < 0.001$ ). Rumen fluids showed different fermentative activities when incubating concentrates, but not over forages. Barley supplementation resulted in a ruminal fluid that started quickly its activity over concentrates but produced lower gas volume. Inclusion of different concentrates led to similar responses, although in some cases of different magnitude, and the supplementation of animals with different concentrates conducted to ruminal environments with different fermentative activities.

## 2. INTRODUCCIÓN

En los sistemas de producción de rumiantes la principal meta de la suplementación es optimizar la producción por animal y por unidad de superficie (Kellaway y Harrington, 2004). Además, mediante el empleo de suplementos pueden ser superados los cambios en cantidad y calidad de las pasturas, y aumentar así la ingestión total de MS y la ingestión de energía y proteína (Bargo *et al.*, 2001). Asimismo, la inclusión de granos a dietas basadas en forrajes generalmente aumenta la eficiencia de utilización de los nutrientes absorbidos para la síntesis de tejidos o productos animales. Por lo tanto, a menudo es conveniente proveer granos en la dieta, a pesar de que estos usualmente son más caros por unidad de energía o proteína que los forrajes (Dixon y Stockdale, 1999).

La suplementación de dietas forrajeras con granos ocasiona efectos asociativos que tienen importantes (Dixon y Stockdale, 1999). Los efectos asociativos positivos están vinculados al aporte de nutrientes limitantes para el rumiante o para la microbiota ruminal; estos efectos usualmente suceden cuando los concentrados suplementan forrajes de baja calidad y están ligados al aumento de la digestibilidad de la MO (Moore *et al.*, 1999). Los efectos negativos ocurren generalmente cuando es incluida en la dieta una gran proporción de concentrados de rápida fermentación y están ligados a una menor ingestión y digestión de forraje debido a la reducción de la tasa de degradación de la fibra por los microorganismos ruminales (Dixon y Stockdale, 1999). Determinar si un efecto asociativo será positivo o negativo es difícil, y los errores en su predicción llevan a bajas performances animales y a un menor aprovechamiento de los recursos alimenticios.

Alimentar el ganado con subproductos de las cosechas y de las industrias procesadoras de alimentos es una práctica tan antigua como la domesticación de los animales por el hombre (Bampidis y Robinson, 2006). El suministro de subproductos a los animales tiene dos grandes ventajas: en la producción animal disminuye la dependencia de los granos que pueden ser consumidos por el hombre y en la industria alimentaria elimina la necesidad de contar con costosos mecanismos de eliminación de residuos (Grasser *et al.*, 1995). Algunos subproductos, como la pulpa de citrus o la cascarilla de soja, pueden ser catalogados como concentrados fibrosos y se ha sugerido que podrían tener efectos beneficiosos sobre el ambiente ruminal (Ipharraguerre y Clark, 2003; Bampidis y Robinson, 2006) y sobre la ingestión de forraje (Bargo *et al.*, 2003). Además, se ha sugerido que el uso de concentrados fibrosos tendría efectos beneficiosos mayores sobre la producción de leche asociándolos con pasturas de alta calidad (Delahoy *et al.*, 2003).

La calidad del forraje es quizás el factor más importante en la productividad de los rumiantes ya sea en pastoreo o en estabulación, y tiene mucho que ver con la cantidad de fibra que contiene. Se ha observado que animales alimentados con forraje de baja calidad y suplementados no alcanzan a producir al mismo nivel que animales alimentados con forraje de alta calidad y menor cantidad de suplemento (Van Soest, 1994). Sin embargo, la interacción entre un forraje de alta calidad y un concentrado como suplemento a veces no es tenida en cuenta a nivel productivo.

### 3. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

Los alimentos consumidos por los rumiantes son inicialmente expuestos a la actividad de fermentación en el rumen antes de la digestión gástrica e intestinal. Los carbohidratos y materias nitrogenadas de la dieta son degradados por los microorganismos ruminales en productos finales característicos, que a su vez proporcionan nutrientes para el metabolismo del animal hospedador. Es así que, la extensión y el tipo de transformaciones de los alimentos en el rumen determinan la performance productiva del rumiante (Mackie y White, 1990). Como se indicó anteriormente la combinación de forrajes y concentrados tiene importantes efectos sobre la productividad animal. A pesar de ello, los alimentos comúnmente son evaluados como entidades independientes aunque la mayoría de las veces los animales consumen mezclas de ingredientes (Sandoval-Castro *et al.*, 2002).

#### 3.1. Efectos de la suplementación sobre la fermentación ruminal

Los alimentos que son ingeridos por los rumiantes son fermentados en el rumen por la acción de una microbiota simbiote. Esta estrategia digestiva permite a los rumiantes obtener energía de los alimentos fibrosos más eficientemente que la mayoría de los herbívoros (Van Soest, 1994). Como resultado de la fermentación se forman productos finales característicos (AGV, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>) y masa microbiana. Cuando se agregan concentrados a la dieta de animales que consumen forrajes la fermentación ruminal es afectada y consecuentemente suceden importantes cambios en el ambiente ruminal y en la actividad de los microorganismos (Dixon y Stockdale, 1999).

El pH ruminal está influenciado por la ingestión de carbohidratos fermentescibles, la secreción de saliva que aporta sustancias tampón y la absorción y utilización de los ácidos producto de la fermentación ruminal (Zebeli *et al.*, 2010). Las dietas con alta proporción de concentrados de fácil fermentación (como la cebada) son rápidamente fermentadas en el rumen, conducen a altas concentraciones de AGV y a pH ruminales relativamente bajos (Beauchemin *et al.*, 2001). Es sabido que el bajo pH puede afectar la degradación ruminal de la fibra y de la proteína, la eficiencia de síntesis de la proteína microbiana y los productos finales de la fermentación (Rotger *et al.*, 2006; Naragaja y Titgemeyer, 2007). Bargo *et al.* (2003) en una revisión sobre efectos de la suplementación en vacas lecheras compararon los tratamientos sin suplementación con los suplementados y hallaron un efecto depresor sobre el pH. En ese sentido, en vacas Holstein en lactación la suplementación de una pastura con cantidades crecientes de un concentrado basado en granos (0, 3 y 6 kg MS/d) llevó a una disminución lineal del pH ruminal (Sairanen *et al.*, 2005). También Leddin *et al.* (2009) encontraron disminución del pH a medida que se incrementó la proporción de trigo en la dieta de vacas lecheras que consumían heno de ryegrass perenne. Del mismo modo, Wales *et al.* (2009) en un estudio *in vitro* incrementando la proporción de concentrado (compuesto por cebada y maíz) en detrimento de ryegrass liofilizado hallaron un descenso lineal del pH. En nuestro país, Cajarville *et al.* (2006) observaron pH más bajos al suplementar vacas pastoreando una pradera de leguminosas y gramíneas con una mezcla de maíz y cebada que cuando los animales no fueron suplementados. También Aguerre *et al.* (2011) suplementando vaquillonas y corderos que consumían lotus con 4 niveles de sorgo (0, 0,5, 1 y 1,5% del PV) hallaron un descenso lineal del pH ruminal en ambas especies de rumiantes. No

obstante, en otros trabajos se ha observado que dietas suplementadas con concentrados (maíz, avena, cebada, cebada/avena) producen similares niveles de pH ruminal que dietas exclusivamente forrajeras (Berzaghi *et al.*, 1996; García *et al.*, 2000; Khalili y Sairanen, 2000). En el caso de la suplementación con un cereal de lenta degradación como el maíz, se ha observado que no produce efectos depresores del pH ruminal tan importantes como la cebada (Schwarz *et al.*, 1995; Delahoy *et al.*, 2003). Khorasani *et al.* (2001) si bien no observaron diferencias en el pH promedio entre la suplementación con cebada o maíz, este último ocasionó un descenso más lento del pH. También se ha reportado que el uso de concentrados fibrosos (pulpa de citrus y cascarilla de soja) en lugar de concentrados con alto contenido de almidón no disminuye tanto el pH ruminal (Ipharraguerre y Clark, 2003; Bampidis y Robinson, 2006). Es así que Bargo *et al.* (2003) sugieren que no hay una relación simple entre la cantidad de concentrado suministrada y el pH ruminal; y además, que la interacción entre la cantidad y el tipo de concentrado suplementado y la cantidad y calidad de la pastura ofrecida podrían tener un papel clave.

La disminución del pH ruminal puede disminuir la actividad o el número de bacterias celulolíticas y la tasa de digestión de la fibra de la pastura (Dixon y Stockdale, 1999). Varios autores han descrito la disminución de la degradación de la fibra de henos y forrajes de baja o media calidad como respuesta a la suplementación en diferentes especies y categorías de rumiantes. Así, Anderson *et al.* (1988) alimentando novillos de engorde con rastrojo de maíz ensilado y suplementando con cascarilla de soja y grano de maíz hasta niveles del 50% de la dieta, observaron que la digestibilidad de la MS aumentó pero que la de la FDN disminuyó. En ovejas, Zorrilla-Ríos *et al.* (1989), utilizando paja de trigo suplementada con tres niveles de maíz reportaron una disminución lineal de la de digestibilidad de la FDN y de la MO. También la suplementación con diferentes granos (maíz o trigo) de heno de pasto bermuda en novillos Holstein redujo la digestibilidad de la FDN (Galloway *et al.*, 1993). Asimismo, Loy *et al.* (2007) encontraron menores velocidades de degradación ruminal de la FDN en vaquillonas suplementadas con maíz o un subproducto derivado de destilería. En ovejas, el incremento de la proporción de un concentrado basado en cereales desde 30% a 70% de dietas con heno de alfalfa o de gramíneas disminuyó la digestibilidad ruminal de la FDN y de la FDA (Ramos *et al.*, 2009). La suplementación de forrajes de alta calidad provoca una fermentación ruminal de diferentes características que cuando se suplementan forrajes de baja calidad, por lo tanto la repercusión sobre la digestibilidad es diferente. Matejovsky y Sanson (1995) obtuvieron una reducción lineal de la digestibilidad de la FDN en corderos alimentados con henos de calidad baja o media y suplementados con tres niveles de maíz, sin embargo no se redujo utilizando henos de calidad alta. En ese sentido, Elizalde *et al.* (1999) observaron que la digestión ruminal de la fibra no es afectada a pesar de la disminución lineal del pH en novillos alimentados con alfalfa fresca en estado vegetativo y suplementados con tres niveles de maíz. También Cajarville *et al.* (2006) observaron menores pH sin disminución de la degradación de las fracciones fibrosas, suplementando una pastura de alta calidad con maíz o trigo. García *et al.* (2000) tampoco observaron efecto sobre la digestión de la fibra de la suplementación con maíz o cebada a una pastura de avena, e inclusive no registraron diferencias en el pH ruminal. Precisamente, De Veth y Kolver (2001) observaron en un sistema *in vitro* de cultivo continuo que una pastura de alta calidad (con predominancia de ryegrass) presentó una digestibilidad de la MS óptima a pH 6,35 y

que la disminución más importante de la digestibilidad se presentó con valores de pH por debajo de 5,8.

Más allá de la disminución del pH, la depresión de la digestibilidad de los forrajes por la inclusión de carbohidratos de rápida fermentación en la dieta puede asignarse a otros mecanismos (Mould *et al.*, 1983). También Caton y Dhuyvetter (1997) indican que sólo una parte de los datos apoyan la teoría de la reducción de la digestibilidad del forraje debida a la disminución del pH ruminal asociado con la suplementación con granos. Más recientemente, Arroquy *et al.* (2005) sugieren que es una simplificación excesiva atribuir el efecto de los carbohidratos no fibrosos sobre la digestión de la fibra solamente a la disminución del pH. Este efecto marginal de los carbohidratos más fermentescibles se ha atribuido al uso preferencial por la microbiota ruminal de carbohidratos más fácilmente disponibles o a mecanismos regulatorios mediados por la acumulación de catabolitos (Russell y Baldwin, 1978; Russell, 1993).

Basándonos en este supuesto, la suplementación con concentrados fibrosos de fácil fermentación no afectaría la digestión de la fibra como lo hacen los concentrados con alto contenido de almidón. Carey *et al.* (1993) reportaron mayor digestibilidad de la FDN cuando se suplementa con pulpa de remolacha que cuando se suplementa con cebada o maíz a novillos alimentados con heno de *Bromus* de calidad media. Además, la sustitución de grano de trigo por cantidades crecientes de cascarilla de soja provocó un aumento lineal en las digestibilidades de la FDN y de la FDA en vacas Jersey en lactación alimentadas con una ración totalmente mezclada (Aikman *et al.*, 2006). En ese sentido, Ipharraguerre y Clark (2003) indican que el aumento de la digestibilidad de la FDN puede estar asociado con la naturaleza degradable de la FDN de la cascarilla de soja y/o con la reducción de los efectos asociativos negativos del almidón sobre la digestión de la fibra; además postulan que este efecto positivo parecería ser independiente del pH ruminal. También el uso de pulpa de citrus (rica en pectinas y en FDN altamente degradable) mejora la utilización de las fracciones fibrosas de la dieta, posiblemente debido a efectos positivos sobre la microbiota ruminal (Bampidis y Robinson, 2006). Asimismo, Asadi Alamouti *et al.* (2009) hallaron una mayor digestibilidad de la FDN con la inclusión de pulpa de remolacha en vacas Holstein en lactación e indicaron que el efecto asociativo positivo puede ser debido a un mejor aporte o sincronización de sustratos disponibles para la microbiota fibrolítica.

Los cambios en la fermentación ruminal, provocados por la suplementación, ocasionan que las cantidades absolutas y las proporciones relativas de los AGV se modifiquen. Weiss y Shockey (1991) suplementando ensilajes de alfalfa o dactylis con 3 niveles de un concentrado basado en maíz hallaron una disminución lineal del ácido acético y un aumento lineal del ácido propiónico. Hess *et al.* (1996) reportaron un aumento de la concentración de AGV totales, una disminución de la proporción molar de ácido acético y un aumento de la de ácido propiónico en novillos alimentados con festuca y suplementados con maíz o dos niveles de afrechillo de trigo. En el mismo sentido, en vacas en lactación consumiendo trébol persa (*Trifolium resupinatum*) y suplementadas con 3 niveles de trigo se observó una disminución lineal del ácido acético y un aumento lineal del propiónico (Leddin *et al.*, 2010). También en cabras alimentadas con heno de alfalfa o de gramíneas el incremento de la suplementación con un concentrado basado en cereales produjo

menor concentración de ácido acético y mayor de ácido propiónico (Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2009). Sin embargo, otros autores reportan hallazgos diferentes tanto en la concentración de AGV totales como en la proporción de ácido acético y ácido propiónico. Reis y Combs (2000) encontraron un aumento de la concentración de ácido propiónico pero no en la de ácido acético. Sairanen *et al.* (2005) reportaron que la inclusión de niveles crecientes de concentrado no afectó la proporción de ácido propiónico, pero disminuyó linealmente la proporción de ácido acético. Majdoub *et al.* (2003) suplementando con cebada una pastura de alta calidad (ryegrass) obtuvieron mayores concentraciones de AGV totales a expensas del aumento de la proporción de ácido acético y ácido butírico y no se afectó la proporción de ácido propiónico. Aún más, Ramos *et al.* (2009) y Wales *et al.* (2009) reportaron que el incremento de la inclusión de concentrados disminuyó la concentración de AGV totales. Con el uso de concentrados fibrosos como suplementos, Khalili y Sairanen (2000) reportaron que no hay diferencias en la concentración de AGV totales ni en las proporciones de los 3 AGV mayores; pero Sayers (1999) no encontró efecto sobre la concentración de AGV totales, aunque observó mayor proporción de ácidos acético y butírico y menor de ácido propiónico. Sin embargo, Ipharraguerre *et al.* (2002) obtuvieron un incremento lineal de la concentración de AGV totales y de la proporción de ácido acético utilizando dietas con proporción creciente de cascarilla de soja en detrimento del grano de maíz.

La fermentación ruminal de los carbohidratos, suministrados de forma adecuada en cantidad y en tipo, provee la energía necesaria para la síntesis de los enlaces peptídicos de la proteína microbiana (Bach *et al.*, 2005). Galloway *et al.* (1993) reportaron un aumento del flujo de N microbiano al duodeno suplementando heno de *Cynodon dactylon* con maíz o trigo. El incremento hasta 6 kg MS/d de la inclusión de concentrado a una pastura de alta calidad aumentó linealmente la producción de proteína microbiana en vacas Holstein en lactación (Sairanen *et al.*, 2005). En tanto que Ramos *et al.* (2009) observaron que el aumento desde 30 a 70% de la suplementación de distintos forrajes aumentó la síntesis de proteína microbiana, pero el aumento fue mayor para el heno de calidad más baja. Sin embargo, Berzaghi *et al.* (1996) no encontraron diferencia en la producción de proteína microbiana entre vacas en lactación que consumían sólo una pastura de alta calidad y las suplementadas con 6,4 kg de maíz. La suplementación de vaquillonas alimentadas con avena no aumentó la síntesis de proteína bacteriana y tampoco existieron diferencias entre el tipo de suplemento utilizado (maíz o cebada) (García *et al.*, 2000). Tampoco Wales *et al.* (2009) obtuvieron incrementos de la producción de N microbiano *in vitro* al aumentar la inclusión de un concentrado compuesto por cebada y maíz hasta el 45% a expensas de ryegrass de alta calidad. En nuestro país, Tebot *et al.* (2012) alimentando ovejas con una pastura en dos edades de rebrote no encontraron diferencias de la suplementación con cebada o con cebada-melaza en la producción de proteína microbiana. Por otro lado, la mayoría de los autores mencionados no encontraron diferencias en el efecto de la suplementación sobre la eficiencia de síntesis de proteína microbiana, estimada como la cantidad de N microbiano producido por día en función de la cantidad de MO fermentada en el rumen. Galloway *et al.* (1993) observaron que ni la suplementación ni el tipo de suplemento (maíz entero, maíz molido, sorgo molido o trigo molido) afectan la eficiencia de síntesis; similares resultados obtuvieron García *et al.* (2000) utilizando maíz o cebada. En ese sentido, Sairanen *et al.* (2005) indican que la fermentación de pasturas de alta calidad provee suficiente energía para la síntesis de proteína

microbiana y que la suplementación no mejoraría la eficiencia de síntesis. La utilización de un concentrado de tipo fibroso (cascarilla de soja) como suplemento aumentó el flujo de N microbiano al duodeno al suplementar novillos alimentados con festuca, pero no la eficiencia de síntesis (Richards *et al.*, 2006). Sin embargo, Ipharraguerre *et al.* (2002) no observó diferencias en la cantidad de proteína microbiana producida por día ni en la eficiencia de síntesis al sustituir maíz por cascarilla de soja. Tampoco se detectaron diferencias en el flujo de N bacteriano *in vitro* entre la utilización de maíz, pulpa de remolacha o cascarilla de soja como suplementos de una pastura mezcla de gramíneas y leguminosas (Bach *et al.*, 1999).

### **3.2. La técnica de producción de gas *in vitro* como herramienta**

Todos los fenómenos descritos anteriormente suceden simultáneamente en el rumen y son resultado de la extensión y de la dinámica de la fermentación ruminal. Entonces, para estimar el efecto a nivel ruminal de la suplementación es fundamental la cuantificación del proceso de fermentación. Una técnica que permite estimar de manera precisa los cambios de la fermentación ruminal es la producción de gas *in vitro*. Esta técnica fue desarrollada para predecir la fermentación de alimentos para rumiantes y evalúa alimentos de forma rápida y barata. La misma consiste en incubar un alimento con líquido ruminal tamponado y medir el gas producido como indicador indirecto de la fermentación; permitiendo así determinar la magnitud y la cinética de fermentación de un alimento (Theodorou *et al.*, 1994; Rymer *et al.*, 2005). Cuando es incubado un alimento se producen AGV, gases (CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> mayoritariamente) y células microbianas. El gas medido es tanto el generado directamente como resultado de la fermentación como el producido indirectamente por el tamponamiento de los AGV por el bicarbonato (CO<sub>2</sub>). Por lo tanto, la producción de gas es básicamente el resultado de la fermentación de los carbohidratos hasta ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico (Getachew *et al.*, 1998).

La técnica ha probado ser útil para la evaluación de mezclas de alimentos. En ese sentido, Liu *et al.* (2002) estudiaron combinaciones de paja de arroz o paja de arroz tratada con bicarbonato de amonio con heno de ryegrass y hoja de morera, observando que se incrementó el volumen y la tasa de producción de gas a medida que aumentaban las proporciones de heno y hoja de morera. También Sandoval-Castro *et al.* (2002) evaluaron dos hojas forrajeras de árboles (*L. leucocephala* y *L. latisiliquum*) y sus combinaciones con un concentrado y un heno en un diseño de mezclas simplex; encontrando mayor producción de gas en las mezclas que incluían sólo heno y concentrado, mientras que la inclusión de *L. latisiliquum* deprimía la tasa de producción de gas. Robinson *et al.* (2009) evaluaron dos grupos de 4 alimentos mezclados entre sí, observando efectos asociativos más importantes cuando se combinaban sólo 2 alimentos y concluyeron que los efectos asociativos *in vitro* varían con el tipo y nivel de alimento incluido en la mezcla.

Según Rymer *et al.* (2005) el origen del inóculo es la fuente de variación más importante y la actividad de la microbiota en el inóculo tiene un efecto más influyente sobre el perfil de producción de gas que el sustrato. Es así que esta técnica puede evaluar la actividad fermentativa de diferentes ambientes ruminales ocasionados por distintos tratamientos nutricionales. En ese sentido nuestro equipo de trabajo ya posee antecedentes, Pérez-Ruchel (2010) evaluó en ovinos el efecto del tiempo de acceso a la pastura y el uso de una sustancia tampón o levaduras vivas

como aditivos y reportó diferencias en el volumen y en el tiempo de latencia de la producción de gas utilizando líquidos ruminales de los distintos tratamientos. Hernández *et al.* (2011) hallaron una mayor producción de gas con líquido ruminal procedente de vaquillonas alimentadas con pastura durante 24 horas que con líquido ruminal de las alimentadas por 4 horas. Con respecto a los efectos de la suplementación, se ha reportado que la utilización de líquidos ruminales de animales consumiendo heno producen menos gas que usando líquidos ruminales de animales suplementados con cebada o suplementados con sorgo, y que también existen diferencias entre estos (Trei *et al.*, 1970).

En suma, la técnica de producción de gas *in vitro* posee un potencial, no del todo explotado, como herramienta para dilucidar y describir procesos biológicos relativos a los alimentos y/o a las respuestas animales. Por lo tanto nos permite utilizarla de modos complementarios para una aproximación más completa y certera al problema en estudio, determinando perfiles de fermentación tanto de una combinación de alimentos como de ecosistemas ruminales causados por una alimentación determinada.

## **4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS**

Si bien hay disponible una amplia bibliografía sobre los efectos de la suplementación a nivel ruminal, existen carencias de información en determinadas áreas. Por un lado, la información sobre suplementación de forrajes de alta calidad es escasa y a menudo no es concordante. Por otro lado, como ya se ha mencionado en el apartado anterior, hay pocos trabajos que estudien a la vez la cantidad y el tipo de concentrado, a pesar de que se ha indicado que son los factores más importantes relacionados al suplemento que afectan variables productivas. Además, la estimación de la capacidad fermentativa de los ecosistemas ruminales generados por la suplementación con diferentes concentrados es un área poco explorada. Es así que este trabajo intenta generar información sobre qué tipo de concentrado y que nivel sería el más apropiado para suplementar forrajes de alta calidad a partir de aproximaciones complementarias.

### ***4.1. Hipótesis***

- El aumento de las proporciones de concentrados energéticos en mezclas con forrajes de alta calidad determinará un incremento en la magnitud y en la velocidad de la fermentación ruminal *in vitro*.
- El aumento de las proporciones de concentrados energéticos de tipo fibroso en mezclas con forrajes de alta calidad determinará un mayor incremento en la magnitud y un menor incremento en la velocidad de la fermentación ruminal *in vitro* que la inclusión creciente de concentrados con alto contenido de almidón
- El uso de diferentes concentrados como suplementos en bovinos causará diferentes actividades fermentativas de sus líquidos ruminales.
- La suplementación de bovinos con concentrados de tipo fibroso causará que el líquido ruminal presente mayor capacidad fermentativa de forrajes.

### ***4.2. Objetivos***

#### ***4.2.1. Objetivo general***

Evaluar el efecto de la incorporación de diferentes tipos de concentrados energéticos (dos cereales de diferente velocidad de degradación y un concentrado fibroso) a forrajes de alta calidad sobre la fermentación ruminal

#### ***4.2.2. Objetivos específicos***

- Evaluar el efecto de la inclusión de proporciones crecientes de diferentes tipos de concentrados energéticos en mezclas con forrajes de alta calidad sobre la fermentación ruminal.
- Comparar las respuestas de la fermentación ruminal al incremento de la inclusión de proporciones crecientes de diferentes tipos de concentrados energéticos en mezclas con forrajes de alta calidad sobre la fermentación ruminal.

- Estimar la actividad fermentativa de líquidos ruminales de vaquillonas alimentadas con forraje de alta calidad y suplementadas con diferentes tipos de concentrados energéticos.

## **5. ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN**

Para cumplir con los objetivos se llevaron a cabo tres experimentos consecutivos:

- Experimento I

Evaluó el efecto de la inclusión de niveles crecientes de pulpa de citrus, maíz o cebada a una pastura fresca de alta calidad sobre la fermentescibilidad *in vitro*.

- Experimento II

Estimó el efecto de la inclusión de niveles crecientes de cascarilla de soja, maíz o cebada a un ensilaje de pastura de alta calidad sobre la fermentescibilidad *in vitro*.

- Experimento III

Determinó el efecto sobre la actividad fermentativa *in vitro* del líquido ruminal de bovinos alimentados con un ensilaje de pastura de alta calidad como único alimento o suplementados con cascarilla de soja, maíz o cebada.

Se incluye a este documento como anexo un artículo correspondiente al Experimento II de este trabajo:

“Soyhulls, corn or barley as supplements of a high quality pasture silage: effects on ruminal fermentation” Britos A., Repetto J.L. y Cajarville C. Enviado a *Animal Production Science* el 23/7/12.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos fueron llevados a cabo en la Unidad de Digestión y Metabolismo Ruminal del Departamento de Nutrición Animal en el Campo Experimental N° 2 de la Facultad de Veterinaria-UdelaR (San José, Uruguay, 34° 41' S and 56° 32' O). Los análisis de composición química de los alimentos se realizaron en el laboratorio de análisis químicos del Departamento de Nutrición Animal de la Facultad de Veterinaria-UdelaR (Montevideo, Uruguay). El manejo de los animales experimentales se ajustó a la Ordenanza sobre el uso de animales de experimentación, docencia e investigación universitaria de la UdelaR.

### 6.1. Diseños experimentales

#### 6.1.1. *Experimento I*

Se prepararon mezclas de pastura fresca con pulpa de citrus, maíz o cebada. Cada concentrado fue incluido en niveles desde 0 a 100% con incrementos de 10%, lo que hizo un total de 31 mezclas. La composición química de los componentes individuales incluidos en las mezclas se presenta en el Cuadro I. Cada mezcla fue utilizada como sustrato para estimar su fermentescibilidad mediante la técnica de determinación de la producción de gas *in vitro*. El líquido ruminal utilizado como inóculo fue colectado de una vaca Holstein en lactación (580 kg de PV), que consumía pastura templada de alta calidad por pastoreo directo (4 h en la mañana y 4 h en la tarde) y heno de pastura. Cada mezcla fue incubada por triplicado y además tres frascos de fermentación sin sustrato fueron incluidos como blancos para corregir la fermentación propia del inóculo.

**Cuadro I.** Composición química de los alimentos, composición botánica y disponibilidad de la pastura utilizados como sustratos en el experimento I

Alimento	MS (%)	MO (% MS)	PB (% MS)	FDN (% MS)	FDA (% MS)
pastura	13,67	89,46	18,70	37,51	19,91
pulpa de citrus	14,64	96,48	6,86	20,66	15,45
cebada	88,83	97,31	11,21	14,99	4,95
maíz	85,85	98,56	9,90	7,64	1,71
Composición botánica y disponibilidad de la pastura					
				56,13	
				39,04	
				2,46	
				2,38	
				4180,3	

*MS: materia seca; MO: materia orgánica; PB: proteína bruta; FDN: fibra detergente neutro; FDA: fibra detergente ácido*

### 6.1.2. Experimento II

En este experimento se siguió un diseño experimental similar al del experimento I. Se prepararon mezclas de ensilaje de pastura con cascarilla de soja, maíz o cebada. Cada concentrado fue incluido en niveles desde 0 a 100% con incrementos de 10%, totalizando 31 mezclas. La composición química de los componentes individuales de las mezclas se presenta en el Cuadro II. Cada mezcla fue utilizada como sustrato para determinar su fermentescibilidad mediante la técnica de producción de gas *in vitro*. El líquido ruminal utilizado como inóculo fue colectado de una vaca Holstein en lactación (580 kg de PV), que consumía únicamente el ensilaje de pastura utilizado como sustrato. Cada mezcla fue incubada por triplicado y además tres frascos de fermentación sin sustrato fueron incluidos como blancos para corregir la fermentación propia del inóculo.

### 6.1.3. Experimento III

Para evaluar el efecto de la suplementación con diferentes concentrados sobre la actividad fermentativa del líquido ruminal, se utilizaron 24 vaquillonas Hereford (PV promedio = 224,2 kg, EEM = 4,2) alojadas en jaulas metabólicas, provistas de sondas ruminales. Los animales se dividieron al azar en 4 tratamientos:

- ensilaje de pastura como único alimento (P)
- ensilaje de pastura suplementado con cascarilla de soja (P+CdeS)
- ensilaje de pastura suplementado con maíz (P+M)
- ensilaje de pastura suplementado con cebada (P+C).

Los alimentos utilizados en las dietas fueron los mismos que se utilizaron en el experimento II y su composición química se presenta en el cuadro II. El ensilaje fue ofrecido sin límite de cantidad y los concentrados al 1% del PV (base MS). Las dietas se ofrecieron desde las 7:00 h hasta las 20:00 h. Los concentrados se proveían una vez al día inmediatamente antes del forraje. El nivel de suplementación y el manejo de la alimentación utilizados fueron seleccionados debido a que son los habitualmente usados por los productores uruguayos y de la región. El consumo diario de MS total (ensilaje más concentrado) fue similar entre los grupos (media = 6,93 kg MS/d, S.E.M. = 0,63).

La actividad fermentativa se determinó mediante un ensayo de producción de gas *in vitro*. Después de 21 d de adaptación a las dietas se colectaron 60 mL de líquido ruminal de cada animal luego de 8 h del inicio de la comida y se mezclaron los líquidos ruminales provenientes de los animales que consumían la misma dieta. Las mezclas de líquido ruminal (n=4) fueron utilizadas como inóculo sobre 2 tipos de sustrato: forrajes (ensilaje de pastura, lotus y avena) o concentrados (cascarilla de soja, maíz y cebada). Cada combinación de líquido ruminal y sustrato fueron incubadas por triplicado y además se incluyeron como blancos tres frascos sin sustrato por cada mezcla de líquido ruminal para corregir la fermentación propia del inóculo.

**Cuadro II.** Composición química de los alimentos utilizados en experimentos II y III

<b>Alimento</b>	<b>MS (%)</b>	<b>MO (% MS)</b>	<b>PB (% MS)</b>	<b>FDN (% MS)</b>	<b>FDA (% MS)</b>
ensilaje de pastura	22,6	86,8	16,7	44,9	31,9
cascarilla de soja	90,2	93,9	15,4	57,0	39,0
cebada	89,5	95,6	9,4	22,9	8,7
maíz	88,4	98,7	8,6	12,1	3,4
lotus*	31,7	94,0	10,8	47,8	30,3
avena*	19,5	91,7	8,40	57,6	29,4

MS: materia seca; MO: materia orgánica; PB: proteína bruta; FDN: fibra detergente neutro; FDA: fibra detergente ácido

\*: forrajes utilizados sólo en el experimento III

## 6.2. Métodos analíticos

### 6.2.1. Técnica de producción de gas in vitro

La misma técnica de producción de gas *in vitro* fue utilizada en todos los experimentos. Se introdujeron 0,5 g de sustrato seco molido a 1 mm en frascos de fermentación de 125 mL. Se agregó a cada frasco de fermentación 38 mL de solución basal, 2 mL de solución tampón y 0,5 mL de solución reductora (Cuadro III) y a continuación fueron tapados con septos de goma butilo y se mantuvieron refrigerados a 4°C durante 8 horas 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 período de mediciones. Inmediatamente a la inoculación con 10 mL de fluido ruminal, cada frasco se tapó con septo de goma butilo y fue sellado con precintos de aluminio. Todas las manipulaciones se realizaron bajo un flujo de CO<sub>2</sub>.

Las mediciones de presión de gas se realizaron mediante medidor de presión con transductor (RZ-68601-00, Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA) a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 48, 72 y 96 h luego de la inoculación. Luego de medida la presión se dejaba insertada una aguja para permitir el escape de gas hasta equilibrar con la presión atmosférica y se agitaba suavemente para mezclar el contenido de los frascos. La cantidad de gas en mL fue estimada de acuerdo a la ecuación  $V = 4,40P + 0,09P^2$  (V es el volumen de gas en mL y P es la presión observada en psi) obtenida en un experimento previo.

El volumen de gas obtenido de cada frasco de fermentación fue ajustado por regresión no lineal mediante PROC NLIN de SAS<sup>®</sup> (versión 8.02, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 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<sup>-1</sup>) es la tasa fraccional de producción de gas y “L” (h) es el tiempo de latencia de la producción de gas.

### 6.2.2. *Análisis químicos*

Las muestras de alimentos se secaron en estufa durante 48 h a 60°C para determinar Materia Seca (MS) y luego se molieron en un molino de rotor provisto de criba de 1 mm (Fritsch GMBH, Idar-Oberstein, Alemania). Se determinaron Cenizas y Proteína Bruta (PB) según los métodos 942.05 y 984.13 respectivamente de AOAC (1990). La Materia Orgánica (MO) se calculó por diferencia (% MO = 100 -% de Cenizas). Las determinaciones de Fibra Detergente Neutra (FDN) y Fibra Detergente Ácida (FDA) se realizaron de acuerdo al método propuesto por Robertson y Van Soest (1981) usando un analizador de fibra ANKOM<sup>220</sup> (ANKOM Technology Corp., Macedon, NY, USA) con  $\alpha$ -amilasa termoestable, y fueron expresadas con la ceniza residual incluida.

**Cuadro III.** Composición del medio de incubación libre de N

<b>Solución basal</b>		
KCl	0,6 g	
NaCl	0,6 g	
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,2 g	
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5 g	
		MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O    0,025 g FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O    0,020 g ZnCl <sub>2</sub> 0,025 g CuCl·2H <sub>2</sub> O    0,025 g CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O   0,050 g SeO <sub>2</sub> 0,050 g NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O    0,250 g Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O 0,250 g NaVO <sub>3</sub> 0,0314g H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 0,250 g
Solución de oligoelementos	10 mL	disueltos en HCl 0,02M 1L (c.s.p.)
Solución de hemina	10 mL	0,1g disuelto en una pequeña cantidad de NaOH 0,05M y luego 1L (c.s.p.) de H <sub>2</sub> O destilada hervida con burbujeo de CO <sub>2</sub>
<b>Solución reductora</b>		
Na <sub>2</sub> S·9H <sub>2</sub> O	20,5 g	disuelto en 1L (c.s.p.) de H <sub>2</sub> O destilada hervida con burbujeo de CO <sub>2</sub>
<b>Solución tampón</b>		
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	82 g	disuelto en 1L (c.s.p.) de H <sub>2</sub> O destilada hervida con burbujeo de CO <sub>2</sub> , previo al uso 20 min de burbujeo de CO <sub>2</sub>

### 6.2.3. Análisis estadísticos

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

$$Y = \beta_0 + \beta_1x + \beta_2z_{CdeS} + \beta_3z_M + \beta_4x * z_{CdeS} + \beta_5x * z_M + \varepsilon$$

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

Para evaluar el efecto sobre la actividad fermentativa del líquido ruminal, de la suplementación con diferentes concentrados (experimento III), se utilizó el procedimiento PROC MIXED de SAS<sup>®</sup> (versión 8.02, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), de acuerdo al modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + I_i + F_j + (I*F)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

donde  $\mu$  es la media general,  $I_i$  es el efecto fijo del inóculo (n=4) medido en k réplicas (3 frascos),  $F_j$  es el efecto fijo del tipo de alimento (n=2, forraje o concentrado),  $(I*F)_{ij}$  es la interacción entre inóculo y tipo de alimento y  $\varepsilon_{ijk}$  es el error residual. El tipo de alimento se consideró como la unidad experimental y cada forraje o concentrado se consideraron réplicas experimentales. Las medias de los inóculos y de los sustratos fueron separadas mediante el procedimiento LSMEANS de SAS<sup>®</sup>. En los casos en que la interacción I\*F fue significativa, el efecto simple principal del inóculo fue analizado utilizando la opción SLICE.

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

## 7. RESULTADOS

### 7.1. *Experimento I*

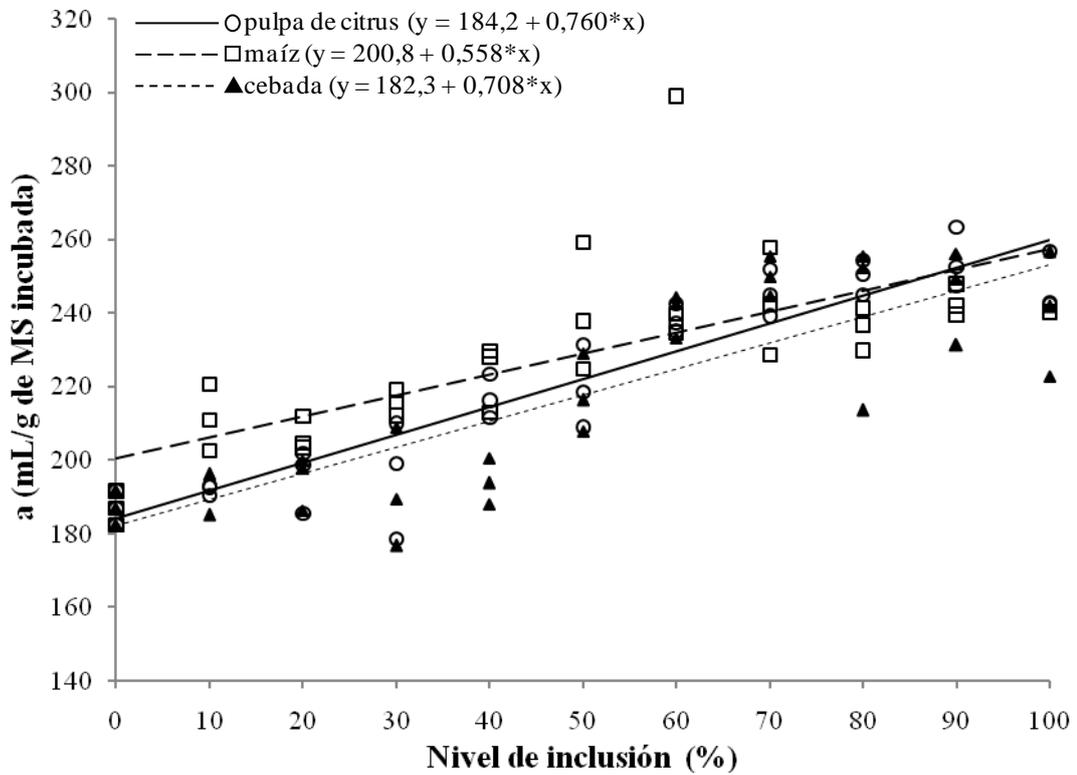
Los parámetros de producción de gas según el nivel de inclusión de pulpa de citrus, maíz y cebada se muestran en el cuadro IV. El incremento del nivel de inclusión provocó aumentos de la producción de gas (a) de los 3 concentrados a tasas crecientes, mostrando efectos lineales ( $P < 0,001$ ) y cuadráticos ( $P < 0,001$ ). Sin embargo, las tasas fraccionales de producción de gas (kd) disminuyeron a tasas decrecientes con efectos lineal ( $P < 0,005$ ) y cuadrático ( $P < 0,001$ ). Los tiempos de latencia (L) del maíz y de la cebada aumentaron a tasas crecientes (efecto lineal:  $P < 0,001$ ; efecto cuadrático:  $P < 0,001$ ), mientras que la inclusión de pulpa de citrus presentó sólo respuesta cuadrática ( $P = 0,002$ ).

**Cuadro IV.** Efectos del incremento del nivel de inclusión de pulpa de citrus, maíz o cebada a una pastura de alta calidad sobre los parámetros de producción de gas *in vitro*

Parámetro	Concentrado	Nivel de inclusión de concentrado (%)											Lineal			Cuadrático		
		0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	<i>P</i>	<i>R</i> <sup>2</sup>	<i>DER</i>	<i>P</i>	<i>R</i> <sup>2</sup>	<i>DER</i>
a (ml/g MS incubada)	pulpa de citrus		192	196	196	217	220	238	246	250	255	248	<0,001	0,867	9,698	<0,001	0,873	9,633
	maíz	187	212	207	216	224	241	258	243	236	243	249	<0,001	0,570	15,83	<0,001	0,655	14,40
	cebada		193	195	192	194	218	240	250	241	246	240	<0,001	0,712	14,72	<0,001	0,714	14,90
kd (h <sup>-1</sup> )	pulpa de citrus		0,12	0,12	0,12	0,12	0,12	0,11	0,12	0,11	0,11	0,10	0,005	0,598	0,006	<0,001	0,658	0,005
	maíz	0,12	0,13	0,12	0,11	0,10	0,09	0,09	0,09	0,08	0,08	0,08	<0,001	0,899	0,006	<0,001	0,902	0,006
	cebada		0,12	0,12	0,11	0,11	0,10	0,17	0,11	0,11	0,11	0,11	<0,001	0,349	0,006	<0,001	0,521	0,006
L (h)	pulpa de citrus		0,10	0,29	0,47	0,31	0,47	0,17	0,34	0,16	0,21	0,22	0,380	0,025	0,204	0,002	0,336	0,171
	maíz	0,08	0,70	0,57	0,54	0,65	1,10	0,76	0,87	0,98	1,42	1,53	<0,001	0,615	0,285	<0,001	0,621	0,287
	cebada		0,54	0,89	0,94	1,17	1,21	1,03	1,02	1,29	1,51	1,61	<0,001	0,723	0,234	<0,001	0,762	0,221

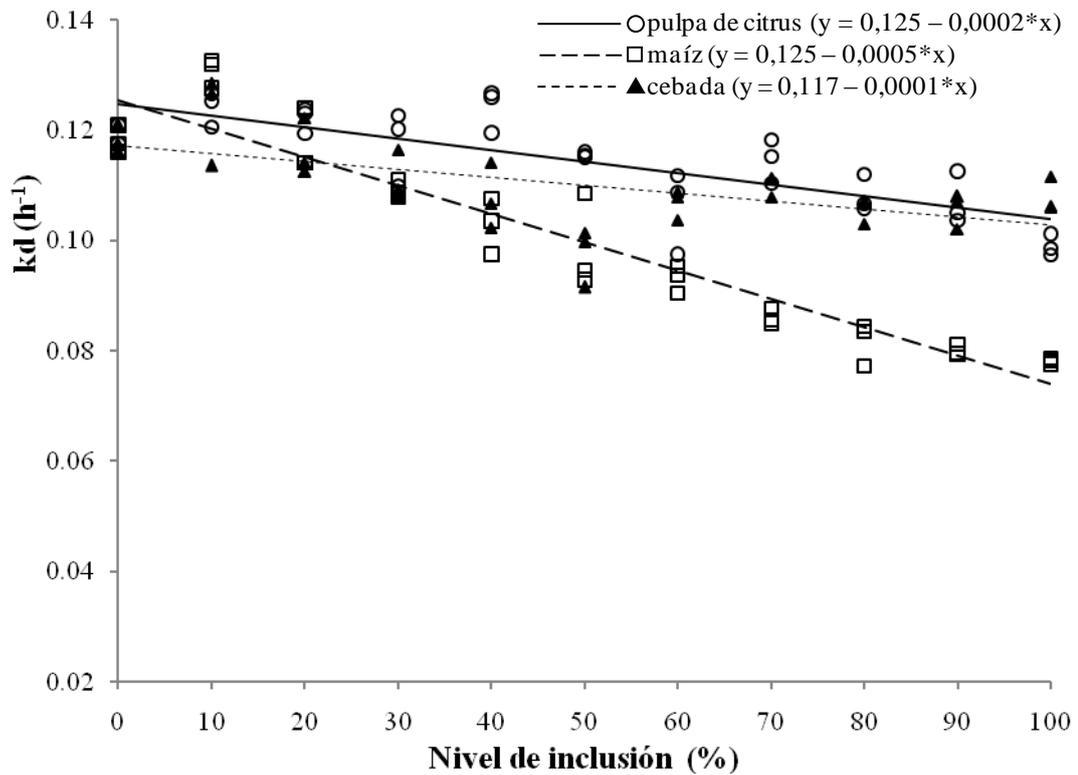
a: Producción potencial de gas (ml de gas /g MS incubada); kd: tasa fraccional de producción de gas (h<sup>-1</sup>); L: tiempo de retardo en la producción de gas (h); P: nivel de significación; R<sup>2</sup>: coeficiente de determinación; DER: desviación estándar de la regresión

Las respuestas lineales de la producción potencial de gas (a) al incremento del nivel de inclusión de cada concentrado se ilustran en la Figura 1. La respuesta al nivel de inclusión fue similar para los 3 concentrados, ya que las pendientes de las curvas de regresión de cada concentrado no fueron significativamente diferentes entre sí ( $P = 0,151$ ).



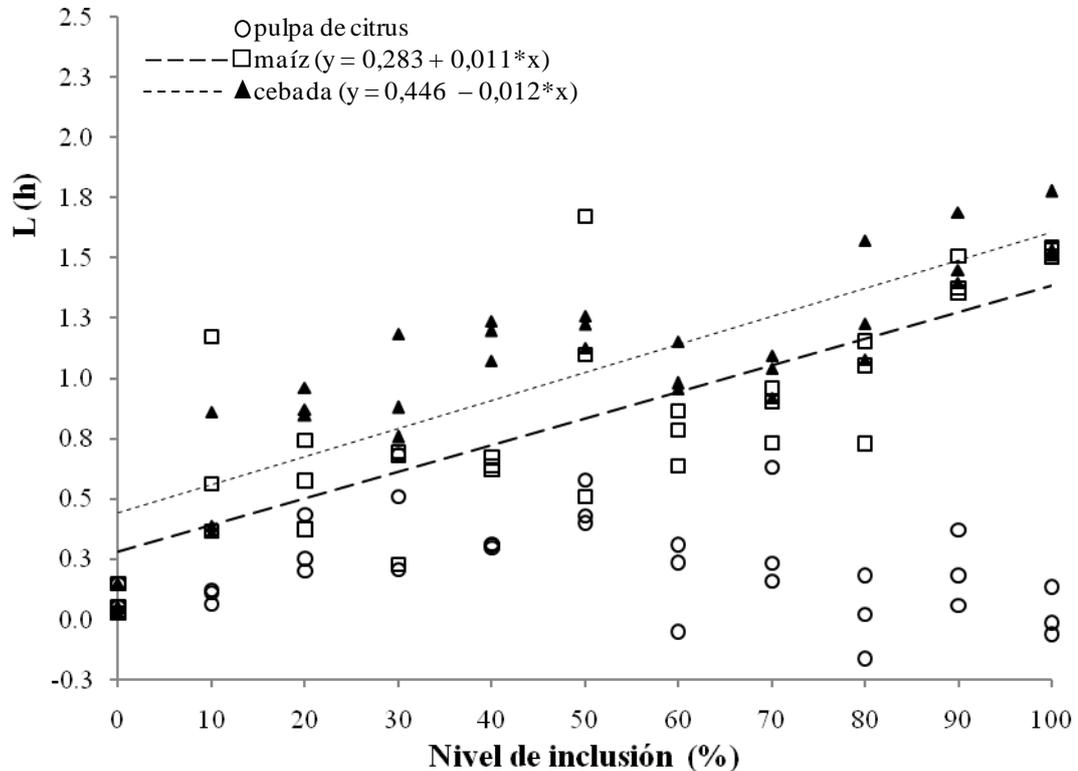
**Figura 1.** Respuestas lineales de la producción potencial de gas (a) al incremento del nivel de inclusión de pulpa de citrus, maíz o cebada a una pastura de alta calidad.

Sin embargo, las tasas fraccionales de producción de gas disminuyeron con distinta pendiente según el concentrado ( $P < 0,001$ ) (Figura 2). El incremento de la inclusión de maíz ocasionó la disminución más importante de la velocidad de producción de gas, mientras las inclusiones de pulpa de citrus y cebada ocasionaron disminuciones similares.



**Figura 2.** Respuestas lineales de la tasa de producción de gas (kd) al incremento del nivel de inclusión de pulpa de citrus, maíz o cebada a una pastura de alta calidad.

En la Figura 3 se ilustran las respuestas lineales del tiempo de latencia a los incrementos de los niveles de inclusión del maíz y la cebada, ya que la pulpa de citrus mostró únicamente un comportamiento cuadrático. Las pendientes de las curvas fueron similares para ambos concentrados almidonosos ( $P = 0,402$ ).



**Figura 3.** Respuestas lineales del tiempo de latencia de la producción de gas (L) al incremento del nivel de inclusión de maíz o cebada a una pastura de alta calidad.

## 7.2. Experimento II

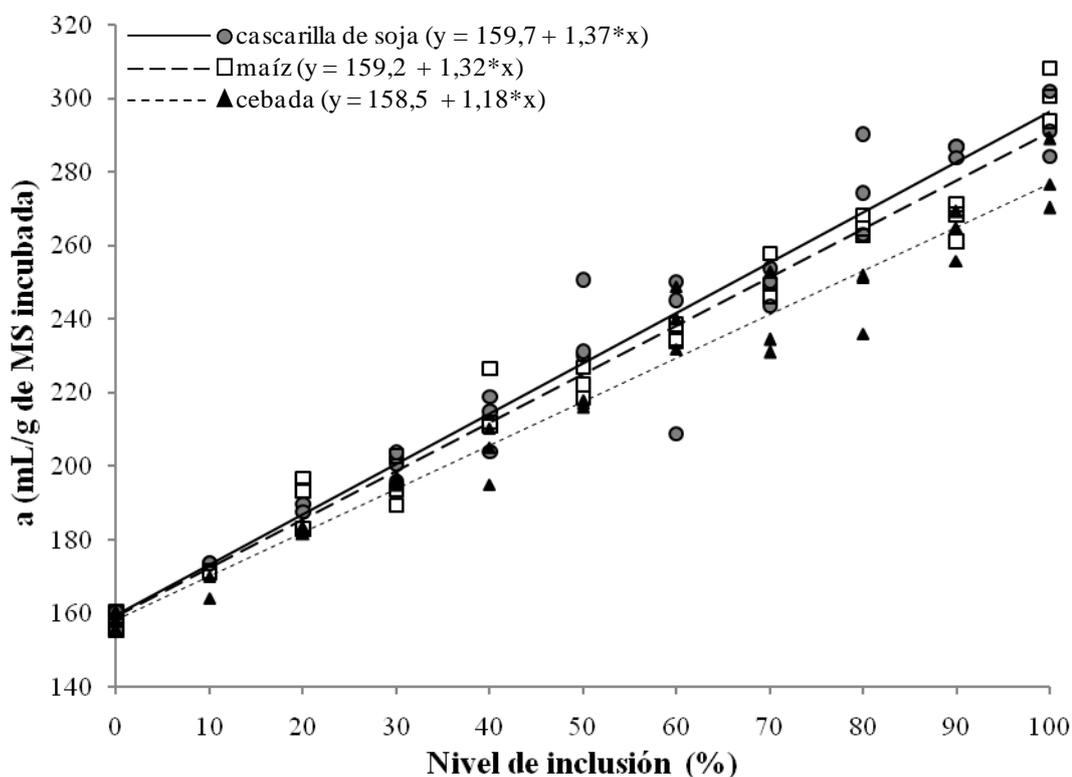
Los parámetros de producción de gas según el nivel de inclusión de cascarilla de soja, maíz y cebada se exponen en el cuadro V. El incremento de los niveles de inclusión de la cascarilla de soja y del maíz causó aumentos de las producciones de gas (a) a tasas crecientes, de forma lineal ( $P < 0,001$ ) y cuadrática ( $P < 0,001$ ). Pero las velocidades de producción de gas (kd) disminuyeron a tasas decrecientes, presentando efectos lineales ( $P < 0,001$ ) y cuadráticos ( $P < 0,001$ ). Mientras, el aumento del nivel de inclusión de la cebada provocó que la producción de gas (a) aumentara linealmente ( $P < 0,001$ ) y que la tasa fraccional de producción de gas (kd) disminuyera linealmente ( $P < 0,001$ ). El tiempo de latencia de la producción de gas (L) presentó sólo respuestas lineales al aumento de la inclusión de maíz y cebada ( $P < 0,001$ ).

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

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

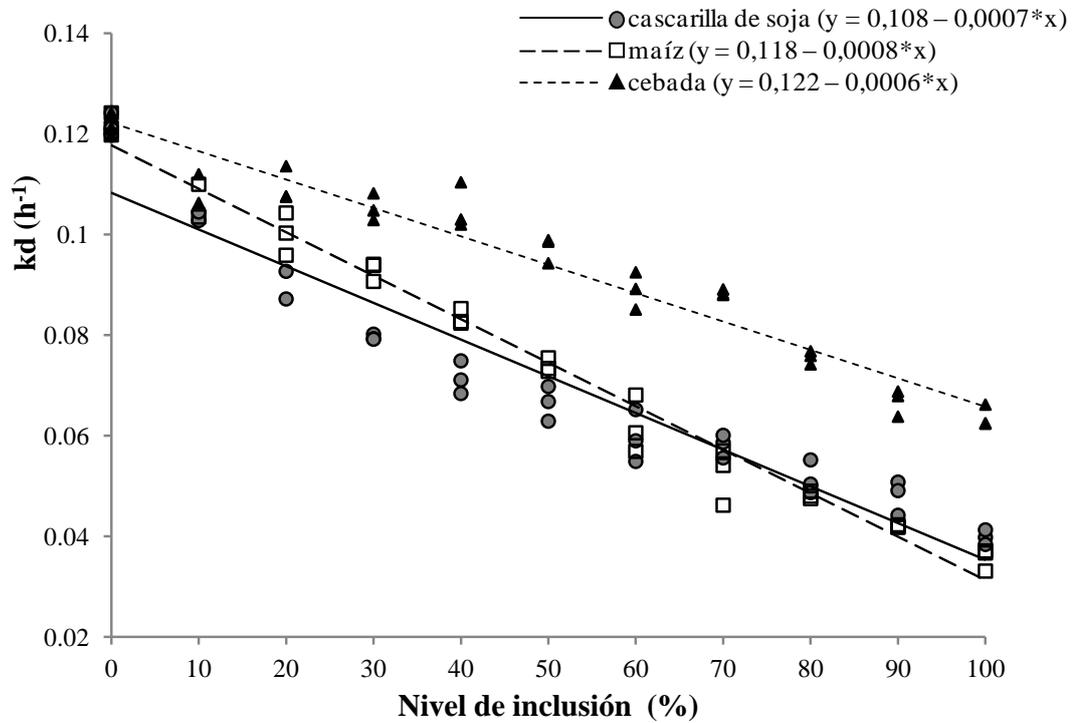
*a*: Producción potencial de gas (ml de gas /g MS incubada); *kd*: tasa fraccional de producción de gas (h<sup>-1</sup>); *L*: tiempo de retardo en la producción de gas (h); *P*: nivel de significación; *R*<sup>2</sup>: coeficiente de determinación; *DER*: desviación estándar de la regresión

En la Figura 4 se presentan las respuestas lineales de la producción potencial de gas (a) al incremento del nivel de inclusión de cada concentrado. La respuesta al incremento del nivel de concentrado difirió significativamente según el concentrado ( $P=0,007$ ), presentando la inclusión de cascarilla de soja y de maíz mayores tasas de incremento que la inclusión de cebada.



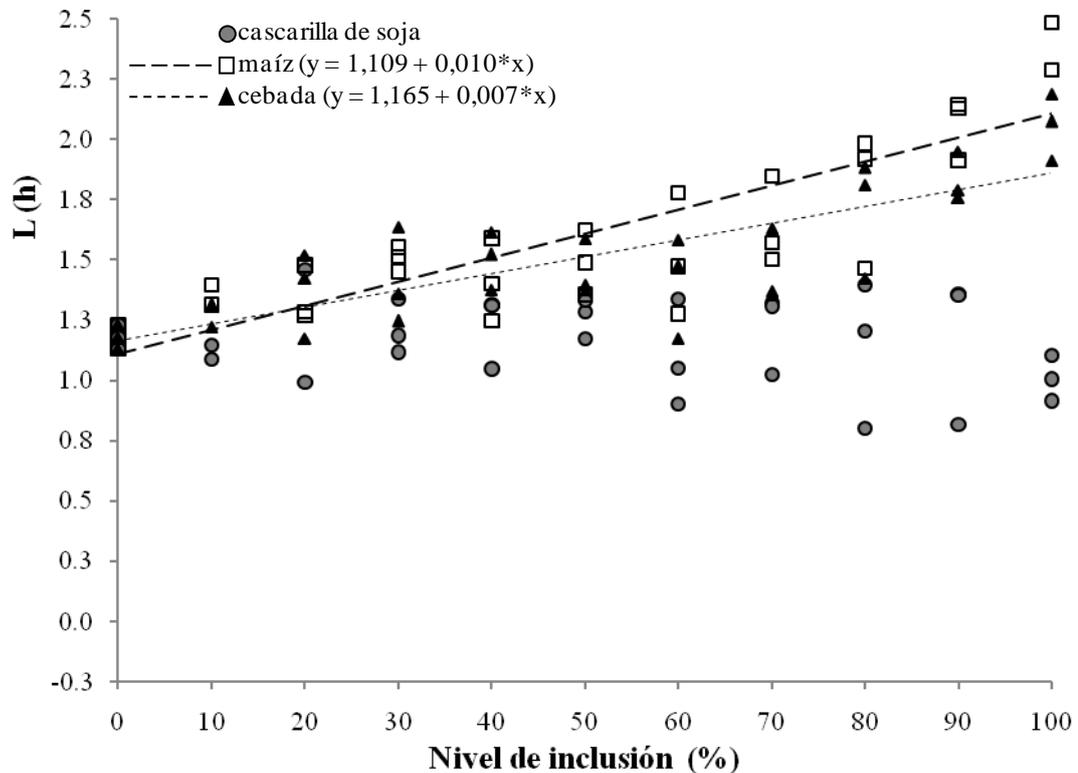
**Figura 4.** Respuestas lineales de la producción potencial de gas (a) al incremento del nivel de inclusión de cascarilla de soja, maíz o cebada a un ensilaje de pastura de alta calidad.

También fueron diferentes entre concentrados las pendientes de las curvas de regresión de la velocidad de producción de gas ( $P < 0,001$ ). Cuando se utilizó cebada la disminución de la velocidad fue menos pronunciada, seguida por la inclusión de cascarilla de soja y fue más acusada con el maíz (Figura 5).



**Figura 5.** Respuestas lineales de la tasa de producción de gas ( $kd$ ) al incremento del nivel de inclusión de cascarilla de soja, maíz o cebada a un ensilaje de pastura de alta calidad.

Las respuestas lineales del tiempo de latencia al incremento del nivel de inclusión del maíz y la cebada se muestran en la Figura 6, puesto que la inclusión de cascarilla de soja no presentó respuestas lineales ni cuadráticas. La extensión del tiempo de latencia con el incremento de nivel de cebada tendió a ser menor que para el maíz ( $P=0,052$ ).



**Figura 6.** Respuestas lineales del tiempo de latencia de la producción de gas (L) al incremento del nivel de inclusión de maíz o cebada a un ensilaje de pastura de alta calidad.

### 7.3. *Experimento III*

La actividad fermentativa de los líquidos ruminales fue diferente sobre los diferentes sustratos (Cuadro VI). En ese aspecto, se observaron interacciones significativas entre el tipo de alimento y el líquido ruminal para la producción de gas ( $a$ ;  $P < 0,001$ ), y para el tiempo de latencia ( $L$ ;  $P < 0,001$ ). Por lo tanto se estudiaron los efectos simples principales de los líquidos ruminales para cada tipo de alimento. De esa forma, las diferencias de actividades fermentativas entre líquidos ruminales fueron evidentes solo cuando los sustratos eran concentrados. Cuando se incubaron concentrados con líquido ruminal de los animales suplementados con cebada se observó menor producción de gas y menor tiempo de latencia. Mientras que el fluido ruminal del grupo no suplementado sobre los concentrados produjo mayor volumen de gas y mayor tiempo de latencia.

La tasa de producción de gas (kd) fue menor cuando el inóculo provino de animales no suplementados ( $P=0,001$ ) y cuando los concentrados fueron utilizados como sustratos ( $P=0,020$ ). Aunque la interacción entre tipo de alimento y líquido ruminal fue solo una tendencia ( $P=0,069$ ), cabe señalar la baja tasa de producción de gas

cuando se incubaron concentrados con líquido ruminal de animales no suplementados.

**Cuadro VI.** Efectos principales simples del líquido ruminal de vaquillonas alimentadas con ensilaje de pastura de alta calidad como único alimento o suplementadas con cascarilla de soja, cebada o maíz sobre los parámetros de producción de gas *in vitro* de forrajes o concentrados.

Parámetro	Sustrato: Forrajes				Sustrato: Concentrados				EEM	P inóculo	P sustrato	P inoc*sust
	P	P+CdeS	P+C	P+M	P	P+CdeS	P+C	P+M				
<b>a (ml/g DMi)</b>	192	205	206	203	298 <sup>a</sup>	263 <sup>bc</sup>	246 <sup>c</sup>	279 <sup>ab</sup>	4,3	<0,001	0,073	<0,001
<b>kd (h<sup>-1</sup>)</b>	0,07 <sup>z</sup>	0,08 <sup>yz</sup>	0,08 <sup>y</sup>	0,07 <sup>yz</sup>	0,04 <sup>z</sup>	0,07 <sup>yz</sup>	0,07 <sup>y</sup>	0,06 <sup>yz</sup>	0,004	0,001	0,020	0,069
<b>L (h)</b>	1,66	1,42	1,40	1,99	3,00 <sup>a</sup>	2,03 <sup>b</sup>	1,20 <sup>c</sup>	1,88 <sup>b</sup>	0,10	<0,001	0,002	<0,001

*a*: producción potencial de gas; *kd*: tasa fraccional de producción de gas; *L*: tiempo de latencia de la producción de gas; *P*: sólo ensilaje de pastura; *P+CdeS*: ensilaje de pastura suplementado con cascarilla de soja; *P+C*: ensilaje de pastura suplementado con cebada; *P+M*: ensilaje de pastura suplementado con maíz; *EEM*: error estándar de las medias.

<sup>abc</sup>Diferentes superscritos dentro de una fila( para cada sustrato)indican que las medias difieren a un nivel de  $P < 0,05$ .

<sup>yz</sup>Diferentes superscritos dentro de una fila indican que las medias difieren a un nivel de  $0,05 < P < 0,10$ .

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1. *Fermentescibilidad*

Es de destacar que la inclusión de concentrados en cantidades crecientes afectó la fermentescibilidad en los dos experimentos, mostrando los parámetros de producción de gas un comportamiento similar. Así, el incremento de las proporciones de los diferentes concentrados aumentó el volumen de gas y disminuyó la velocidad de producción de gas. También en ambos experimentos se prolongó el tiempo de latencia con el incremento de la inclusión de los cereales. Estos resultados son destacables, ya que el forraje utilizado en un caso era una pastura fresca y en otro un ensilaje de pastura, por ende el factor común que probablemente determinó el comportamiento fermentativo de las mezclas de alimentos fue la alta calidad de ambos forrajes. No obstante, el ensilaje de pastura presentó menor volumen de gas y mayor tiempo de latencia que la pastura fresca pero con variaciones más pronunciadas de los parámetros de producción de gas a medida que se incrementaban las proporciones de concentrados. Este fenómeno posiblemente se debe a la limitación de la fermentación por la baja concentración de azúcares solubles de los ensilajes, que fue superada por el suministro de energía fermentescible a partir de los carbohidratos de los concentrados.

Si bien el aumento del volumen de gas según aumentaba el nivel de concentrados es consistente con una mayor proporción de compuestos más fermentescibles en los sustratos incubados, inesperadamente la velocidad de producción de gas disminuyó. Este último hecho puede ser atribuido a los orígenes del líquido ruminal, que en los dos casos procedió de vacas en lactación alimentadas exclusivamente con forraje y por lo tanto con una microbiota ruminal más adaptada a la degradación de la fibra que a la de otras fuentes de carbohidratos. Sin embargo, la inclusión de los concentrados fibrosos también redujo la velocidad de producción de gas; evidenciando que estos subproductos tienen efectos similares a los concentrados altos en almidón, aunque de distinta magnitud. La inclusión de maíz mostró la disminución más acusada, en el mismo sentido de lo reportado por Lanzas *et al.* (2007), que observaron que el maíz presentó una tasa fraccional de producción de gas menor que la cebada y el trigo incubados puros. Este fenómeno probablemente es debido a la lenta degradación ruminal de su almidón (Offner *et al.*, 2003).

El tiempo de latencia de la producción de gas en los dos experimentos fue más largo con el incremento de la inclusión de los cereales, indicando que la adhesión a las partículas por la microbiota de los líquidos ruminales estaría afectada por el incremento de las proporciones de almidón. Este efecto también puede ser atribuido al origen del líquido ruminal, ya que la adhesión y colonización bacteriana y la formación del biofilm microbiano son afectadas por cambios en el sustrato (McAllister *et al.*, 1994). No obstante, el uso de los concentrados fibrosos (pulpa de citrus y cascarilla de soja) no provocó ese efecto, probablemente debido al aumento de sustratos para las bacterias celulolíticas que provoca una mayor adherencia a las paredes celulares. En ese sentido, Barrios-Urdaneta *et al.* (2000) reportó mayor adherencia bacteriana a paredes celulares de paja a las 8 y 12 h de incubación en un medio suplementado con pectina comparado con medios suplementados con almidón o azúcares.

La similitud de las respuestas lineales del volumen de gas a la inclusión de pulpa de citrus, maíz o cebada a una pastura de alta calidad (experimento I) es coincidente con lo reportado por Ariza *et al.* (2001), que no encontraron diferencias en la digestión de la MO y en la producción de AGV *in vitro* entre dietas con pulpa de citrus o una fuente de almidón. Sin embargo, Barrios-Urdaneta *et al.* (1997) observaron que el volumen de gas producido por una paja de cebada no fue afectado por la inclusión de cantidades crecientes de pectina, pero la adición de almidón o celulosa lo deprimió de forma lineal; probablemente ese resultado se debe a la muy baja calidad del forraje que los autores utilizaron en contraste con este trabajo. En el experimento II la inclusión de cascarilla de soja produjo un incremento del volumen de gas similar al causado por el maíz, mientras que la adición de cantidades crecientes de cebada provocó un incremento menos acusado. La diferencia entre los dos cereales coincide con lo descrito por Lanzas *et al.* (2007), que observó mayor volumen de gas *in vitro* producido por el maíz que por la cebada. El pronunciado incremento de la producción de gas con el uso de cascarilla de soja puede ser debido a su alta proporción de FDN fermentable. Este hecho puede llevar a una mayor producción de CH<sub>4</sub> así como también a una mayor proporción relativa de ácido acético. En ese sentido, Getachew *et al.* (1998) indican que si la fermentación ruminal *in vitro* produce mayor proporción de ácido acético habrá concomitantemente una mayor producción de gas. Además, se ha reportado en otros trabajos, que la producción ruminal de AGV totales se incrementa a expensas del aumento de la proporción de ácido acético cuando se aumentó la proporción de cascarilla de soja en una dieta totalmente mezclada para vacas en lactación (Ipharraguerre *et al.*, 2002).

## **8.2. Actividad fermentativa**

Inesperadamente, cuando los diferentes líquidos ruminales fueron incubados sobre forrajes no se expresaron diferencias entre ellos. Este resultado es imprevisto ya que el efecto negativo de la suplementación con concentrados sobre la fermentación de la fibra de los forrajes es bien conocido. En ese sentido, Mould *et al.* (1983) trabajando con ovejas, observaron depresiones de la degradación ruminal de un rango de forrajes al suplementarlos con varios concentrados, y determinó que esa disminución depende del pH ruminal y de la tasa de solubilización del concentrado. Es más, el uso de líquidos ruminales de vacas suplementadas con trigo o maíz presentó diferencias en la digestión *in vitro* (IVTD) de varios alimentos; con la suplementación de un concentrado más soluble (trigo) se observó menor digestibilidad de los forrajes (Cajarville *et al.*, 2006). Por añadidura, en nuestro trabajo, el líquido ruminal de animales no suplementados, que teóricamente debería poseer mayor proporción de bacterias celulolíticas, no presentó mayor actividad fermentativa sobre los forrajes. En ese sentido, Dehority y Tirabasso (1998) indicaron que los factores intrínsecos de los forrajes son más importantes para su degradación ruminal que la concentración de bacterias celulolíticas. Así, la respuesta obtenida puede estar relacionada a la alta calidad de los forrajes utilizados como sustrato, con niveles de FDN y FDA en torno al 50% y 30%, respectivamente. En consecuencia, cuando se usan forrajes de alta calidad, el tipo de concentrado suplementado no afectaría la actividad fermentativa, al menos un nivel de suplementación del 1% del PV.

Cuando se incubaron concentrados las diferencias obtenidas entre inóculos fueron llamativas. No sólo existieron diferencias entre líquidos ruminales de animales suplementados y no suplementados, como reportó Trei *et al.* (1970), que al incubar

*in vitro* cebada y sorgo observó mayor volumen de gas con líquido ruminal de animales suplementados, también el tipo de concentrado suplementado afectó la actividad fermentativa. Aún más, el tipo de almidón consumido por los animales donantes influyó sobre los perfiles de producción de gas. De hecho, el inóculo de los animales que consumieron cebada, el concentrado más fermentescible, inició rápidamente su ataque a los concentrados usados como sustratos pero produjo menor volumen de gas. Esto sugiere una importante actividad microbiana, pero también que el ambiente ruminal es afectado negativamente en poco tiempo. De todas formas, es necesario considerar que esta respuesta también podría estar asociada con la técnica *in vitro* utilizada, ya que es de tipo “batch-culture”. Mientras, la suplementación con maíz o con cascarilla de soja produjo líquidos ruminales que fermentaron los concentrados incubados luego de tiempos de latencia similares y con similar magnitud, a pesar de las grandes diferencias en la composición de carbohidratos entre estos concentrados.

## 9. CONCLUSIONES

El uso de diferentes concentrados como suplementos de pastura fresca y de ensilaje de pastura provocó respuestas similares de los parámetros de fermentación aunque con valores diferentes.

La inclusión de cantidades crecientes de concentrados a forrajes de alta calidad causó una fermentación de mayor magnitud pero disminuyó su velocidad. La inclusión de cascarilla de soja a un ensilaje de alta calidad causó un mayor incremento de la fermentación que la cebada.

La suplementación con diferentes concentrados generó ecosistemas ruminales que expresaron diferentes actividades fermentativas sobre concentrados. La suplementación no modifica el comportamiento fermentativo de los forrajes de alta calidad.

A pesar de que se necesitan más trabajos *in vivo* para una aproximación más completa del problema, la suplementación con concentrados fibrosos podría causar los mismos efectos a nivel ruminal que los concentrados con alto contenido de almidón y podrían sustituirlos. Aunque la suplementación con concentrados fibrosos no afecte la adherencia *in vitro* de los microorganismos en la misma medida que los cereales, deberían tomarse las mismas precauciones al momento de suministrarlos a los animales.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Aguerre M., Cajarville C., Repetto J.L. (2011) Response to increased sorghum grain supplementation levels: comparison between cattle and sheep. *J Anim Sci* 89 (E-suppl. 1):764-765.
- 2) Aikman P.C., Beever D.E., Humphries D.J. (2006). The effect of incremental replacement of wheat with soya hulls in diets for Jersey cows on lactational performance, diet digestibility and feeding behaviour. *Livest Sci* 104:23-32.
- 3) Anderson S.J., Klopfenstein T.J., Wilkerson V.A. (1988). Escape protein supplementation of yearling steers grazing smooth brome pastures. *J Anim Sci* 66:237-242.
- 4) Ariza P., Bach A., Stern M.D., Hall M.B. (2001). Effects of carbohydrates from citrus pulp and hominy feed on microbial fermentation in continuous culture. *J Anim Sci* 79:2713-2718.
- 5) Arroquy J.I., Cochran R.C., Nagaraja T.G., Titgemeyer E.C., Johnson D.E. (2005). Effect of types of non-fiber carbohydrate on in vitro forage fiber digestion of low-quality grass hay. *Anim Feed Sci Technol* 120:93-106.
- 6) Asadi Alamouti A., Alikhania M., Ghorbania G.R., Zebeli Q. (2009). Effects of inclusion of neutral detergent soluble fibre sources in diets varying in forage particle size on feed intake, digestive processes, and performance of mid-lactation Holstein cows. *Anim Feed Sci Technol* 154:9-23.
- 7) Bach A., Calsamiglia S., Stern M.D. Nitrogen metabolism in the rumen. (2005) *J Dairy Sci* 88 (E. Suppl.): E9-E21.
- 8) Bach A., Yoon I.K., Stern M.D., Jung H. G., Chester-Jones H. (1999). Effects of type of carbohydrate supplementation to lush pasture on microbial fermentation in continuous culture. *J Dairy Sci* 82:153-160.
- 9) Bampidis V.A., Robinson P.H. (2006). Citrus by-products as ruminant feeds: a review. *Anim Feed Sci Technol* 128:175-217.
- 10) Bargo F., Muller L.D., Delahoy J.E., Cassidy T.W. (2002). Milk response to concentrate supplementation of high producing dairy cows grazing at two pasture allowances. *J Dairy Sci* 85:1777-1792.
- 11) Bargo F., Muller L.D., Kolver E.S., Delahoy J.E. (2003) Production and digestion of supplemented dairy cows on pasture. *J Dairy Sci* 86:1-42.
- 12) Bargo F., Rearte D.H., Santini F.J., Muller L.D. (2001) Ruminant digestion by dairy cows grazing winter oats pasture supplemented with different levels and sources of protein. *J Dairy Sci* 84:2260-2272.
- 13) Barrios-Urdaneta A., Fondevila M., González-Ronquillo M., Castrillo C. (1997). Fermentación *in vitro* de forrajes lignocelulósicos suplementados con distintos tipos y niveles de carbohidratos. *Arch Latinoam Prod Anim* 5(1):199-201.
- 14) Barrios-Urdaneta A., Fondevila M., Balcells J., Dapoza C., Castrillo C. (2000) *In vitro* microbial digestion of straw cell wall polysaccharides in response to supplementation with different sources of carbohydrates. *Aust J Agric Res* 51(3): 393-400.

- 15) Beauchemin K.A., Yang W.Z., Rode L.M. (2001). Effects of barley grain processing on the site and extent of digestion of beef feedlot finishing diets. *J Anim Sci* 79:1925-1936.
- 16) Berzaghi P., Herbein J.H., Polan C.E. (1996). Intake, site, and extent of nutrient digestion of lactating cows grazing pasture. *J Dairy Sci* 79:1581-1589.
- 17) Cajarville C., Aguerre M., Repetto J.L. (2006). Rumen pH, NH<sub>3</sub>-N concentration and forage degradation kinetics of cows grazing temperate pastures and supplemented with different sources of grain. *Anim Res* 55:511-520.
- 18) Cantalapiedra-Hijar G., Yáñez-Ruiz D.R., Martín-García A.I., Molina-Alcaide E. (2009). Effects of forage:concentrate ratio and forage type on apparent digestibility, ruminal fermentation, and microbial growth in goats. *J Anim Sci* 87:622-631.
- 19) Carey D.A., Caton J.S., Biondini M. (1993). Influence of energy source on forage intake, digestibility, *in situ* forage degradation, and ruminal fermentation in beef steers fed medium-quality brome hay. *J Anim Sci* 71:2260-2269.
- 20) Caton J.S., Dhuyvetter D.V. (1997) Influence of energy supplementation on grazing ruminants: requirements and responses. *J Anim Sci* 75:533-542.
- 21) Dehority B. A., Tirabasso P.A. (1998). Effect of ruminal cellulolytic bacterial concentrations on *in situ* digestion of forage cellulose. *J Anim Sci* 76:2905-2911.
- 22) Delahoy J.E., Muller L.D., Bargo F., Cassidy T.W., Holden L.A. (2003) Supplemental carbohydrate sources for lactating dairy cows on pasture. *J Dairy Sci* 86:906-915.
- 23) De Veth M.J., Kolver E.S. (2001) Digestion of ryegrass pasture in response to change in pH in continuous culture. *J Dairy Sci* 84:1449-1457.
- 24) Dixon, R.M., Stockdale C.R. (1999). Associative effects between forages and grains: consequences for feed utilization. *Aust J Agric Res* 50:757-773.
- 25) Elizalde J.C., Merchen N.R., Faulkner D.B. (1999). Supplemental cracked corn for steers fed fresh alfalfa I: effects on digestion of organic matter, fiber, and starch. *J Anim Sci* 77:457-466.
- 26) Kellaway R., Harrington T. (2004). Feeding concentrates: supplements for dairy cows. Ed. CSIRO Publishing, 2<sup>a</sup> edición revisada, Melbourne.
- 27) Galloway Sr. D.L., Goetsch A.L., Forster Jr. L.A., Brake A.C., Johnson Z.B. (1993). Digestion, feed intake, and live weight gain by cattle consuming bermudagrass and supplemented with different grains. *J Anim Sci* 71:1288-1297.
- 28) García S.C., Santini F.J., Elizalde J.C. (2000). Sites of digestion and bacterial protein synthesis in dairy heifers fed fresh oats with or without corn or barley grain. *J Dairy Sci* 83:746-755.
- 29) Getachew G., Blümell M., Makaar H.P.S., Becker K. (1998) *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Anim Feed Sci Technol* 72:261-281.

- 30) Grasser L.A., Fadel J.G., Garnett I., DePeters E.J. (1995). Quantity and economic importance of nine selected by-products used in California dairy rations. *J Dairy Sci* 78:962-971.
- 31) Hernández N., Félix A., Saavedra K., Rosano K., Pérez-Ruchel A., Aguerre M., Brambillasca S., Cajarville C., Repetto J.L. (2011) Effect of time of access to food on fermentation capacity of rumen fluid in heifers consuming temperate pastures. *J Anim Sci* 89 (E-Suppl 1): 381.
- 32) Hess B.W., Krysl L.J., Judkins M.B., Holcombe D.W., Hess J.D., Hanks D.R., Huber S.A. (1996). Supplemental cracked corn or wheat bran for steers grazing endophyte-free fescue pasture: effects on live weight gain, nutrient quality, forage intake, particulate and fluid kinetics, ruminal fermentation, and digestion. *J Anim Sci* 74:1116-1125.
- 33) Ipharraguerre I.R., Shabi Z., Clark J.H., Freeman D.E. (2002). Ruminal fermentation and nutrient digestion by dairy cows fed varying amounts of soyhulls as a replacement for corn grain. *J Dairy Sci* 85:2890-2904.
- 34) Ipharraguerre I.R., Clark J.H. (2003) Soyhulls as an alternative feed for lactating dairy cows: a review. *J Dairy Sci* 86:1052-1073.
- 35) Khalili H., Sairanen A. (2000). Effect of concentrate type on rumen fermentation and milk production of cows at pasture. *Anim Feed Sci Technol* 84:199-212.
- 36) Khorasani G.R., Okine E.K., Kennelly J.J. (2001). Effects of substituting barley grain with corn on ruminal fermentation characteristics, milk yield, and milk composition of Holstein cows. *J Dairy Sci* 84:2760-2769.
- 37) Lanzas C., Fox D.G., Pell A.N. (2007). Digestion kinetics of dried cereal grains. *Anim Feed Sci Technol* 136:265-280.
- 38) Leddin C.M., Stockdale C.R., Hill J., Heard J.W., Doyle P.T. (2009) Increasing amounts of crushed wheat fed with pasture hay reduced dietary fiber digestibility in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 92:2747-2757.
- 39) Leddin C.M., Stockdale C.R., Hill J., Heard J.W., Doyle P. T. (2010). Increasing amounts of crushed wheat fed with Persian clover herbage reduced ruminal pH and dietary fibre digestibility in lactating dairy cows. *Anim Prod Sci* 50:837-846.
- 40) Liu J.X., Susenbeth A., Sudekum K.H. (2002) In vitro gas production measurements to evaluate interactions between untreated and chemically treated rice straws, grass hay, and mulberry leaves.
- 41) Loy T.W, MacDonald J.C., Klopfenstein T.J., Erickson. T.J. (2007). Effect of distillers grains or corn supplementation frequency on forage intake and digestibility. *J Anim Sci* 85:2625-2630.
- 42) McAllister T.A., Bae H.D., Jones G.A., Cheng K.J. (1994). Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *J Anim Sci* 72:3004-3018.
- 43) Mackie R.I., White B.A. (1990). Recent advances in rumen microbial ecology and metabolism: potential impact on nutrient output. *J Dairy Sci* 73:2971-2995.
- 44) Majdoub L., Vermorel M., Ortigues-Marty I. (2003). Ryegrass-based diet and barley supplementation: partition of energy-yielding nutrients among splanchnic tissues and hind limbs in finishing lambs. *J Anim Sci* 81:1068-1079.

- 45) Matejovsky K.M., Sanson D.W. (1995). Intake and digestion of low-, medium-, and high-quality grass hays by lambs receiving increasing levels of corn supplementation. *J Anim Sci* 73:2156-2163.
- 46) Meijs J. A. C. (1986). Concentrate supplementation of grazing dairy cows. 2. Effect of concentrate composition on herbage intake and milk production. *Grass Forage Sci* 41:229-235.
- 47) Moore J.E., Brant M.H., Kunkle W.E., Hopkins D.I. (1999). Effects of supplementation on voluntary forage intake, diet digestibility, and animal performance. *J Anim Sci* 77:122-135.
- 48) Mould F.L., Ørskov E.R., Mann S.O. (1983). Associative effects of mixed feeds. I. Effects of type and level of supplementation and the influence of the rumen fluid pH on cellulolysis *in vivo* and dry matter digestion of various roughages. *Anim Feed Sci Technol* 10:15-30.
- 49) Naragaja T.G., Titgemeyer E.C. (2007). Ruminant acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook. *J Dairy Sci* 90 (E.Suppl): E17-E38.
- 50) Offner A., Bach A., Sauvant D. (2003). Quantitative review of *in situ* starch degradation in the rumen. *Anim Feed Sci Technol* 106:81-93.
- 51) Pérez-Ruchel A. (2010) Tiempo y forma de acceso al forraje y uso de buffers o levaduras: efecto sobre el aprovechamiento digestivo de la dieta en ovinos. Tesis de Maestría. Universidad de la República. Facultad de Veterinaria. Montevideo, Uruguay.
- 52) Ramos S., Tejido M.L., Martínez M.E., Ranilla M.J., Carro M.D. (2009) Microbial protein synthesis, ruminal digestion, microbial populations, and nitrogen balance in sheep fed diets varying in forage-to-concentrate ratio and type of forage. *J Anim Sci* 87:2924-2934.
- 53) Reis R.B., Combs D.K. (2000). Effects of increasing levels of grain supplementation on rumen environment and lactation performance of dairy cows grazing grass-legume pasture. *J Dairy Sci* 83:2888-2898.
- 54) Richards C.J., Pugh R.B., Waller J.C. (2006). Influence of soybean hull supplementation on rumen fermentation and digestibility in steers consuming freshly clipped, endophyte-infected tall fescue. *J Anim Sci* 84:678-685.
- 55) Robertson J.B., Van Soest P.J. (1981). The detergent system of analysis. En: James, W.P.T., Theander, O. (Eds.), *The Analysis of Dietary Fibre in Food*. Marcel Dekker, New York, pp. 123-158.
- 56) Robinson P.H., Getachew G., Cone J.W. (2001) Evaluation of the extent of associative effects of two groups of four feeds using an *in vitro* gas production procedure. *Anim Feed Sci Technol* 150:9-17.
- 57) 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.
- 58) Russell J.B. (1993) Glucose toxicity in *Prevotella ruminicola*: methylglyoxal accumulation and its effect on membrane physiology. *Appl Environ Microbiol* 59:2844-2850.

- 59) Russell J.B., Baldwin R.L. (1978) Substrate preferences in rumen bacteria: evidence of catabolite regulatory mechanisms. *Appl Environ Microbiol* 36:319-329.
- 60) 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.
- 61) Sairanen A., Khalili H., Nousiainen J.I., Ahvenjärvi S., Huhtanen P. (2005). The effect of concentrate supplementation on nutrient flow to the omasum in dairy cows receiving freshly cut grass. *J Dairy Sci* 88:1443-1453.
- 62) Sandoval-Castro C.A., Capetillo-Leal C., Cetina-Góngora R., Ramirez-Avilés L. (2002). A mixture simplex design to study associative effects with an *in vitro* gas production technique. *Anim Feed Sci Technol* 101:191-200.
- 63) Sayers, H. J. (1999). The effect of sward characteristics and level and type of supplement on grazing behaviour, herbage intake and performance of lactating dairy cows. Tesis de Doctorado. Queen's University of Belfast. The Agricultural Research Institute of Northern Ireland. Hillsborough.
- 64) Schwarz F. J., Haffner J., Kirchgessner M. (1995). Supplementation of zero-grazed dairy cows with molassed sugar beet pulp, maize or a cereal-rich concentrate. *Anim Feed Sci Technol* 54:247-258.
- 65) Tebot I., Cajarville C., Repetto J.L., Cirio A. (2012) Supplementation with non-fibrous carbohydrates reduced fiber digestibility and did not improve microbial protein synthesis in sheep fed fresh forage of two nutritive values. *Animal* 6:617-623.
- 66) Theodorou M.K., Williams B.A., Dhanoa M.S., McAllan A.B., France J. (1994) A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim Feed Sci Technol* 48:185-197.
- 67) Trei J., Hale W.H., Theurer B. (1970) Effect of grain processing on *in vitro* gas production. *J Anim Sci* 30:825-831.
- 68) Van Soest P.J. (1994). Nutritional ecology of the ruminant. Cornell University Press, 2a edición. Ithaca, New York.
- 69) Wales W.J., Kolver E.S., Egan A.R. (2009). Digestion during continuous culture fermentation when replacing perennial ryegrass with barley and steam-flaked corn. *J Dairy Sci* 92:189-196.
- 70) Weiss W.P., Shockey W.L. (1991). Value of orchardgrass and alfalfa silages fed with varying amounts of concentrates to dairy cows. *J Dairy Sci* 74:1933-1943.
- 71) Williams B.A, Bosch M.W., Boer H., Verstegen M.W.A., Tamminga S. (2005) An *in vitro* batch culture method to assess potential fermentability of feed ingredients for monogastric diets. *Anim Feed Sci Technol* 123-124:445-462.
- 72) Zebeli Q., Mansmann D., Steingass H., Ametaj B.N. (2010). Balancing diets for physically effective fibre and ruminally degradable starch: a key to lower the risk of sub-acute rumen acidosis and improve productivity of dairy cattle. *Livest Sci* 127:1-10.

- 73) Zorrilla-Rios J., Horn G.W., McNew R. W. (1989). Effect of ammoniation and energy supplementation on the utilization of wheat straw by sheep. *Anim Feed Sci Technol* 22:305-320.

## 11. ANEXOS

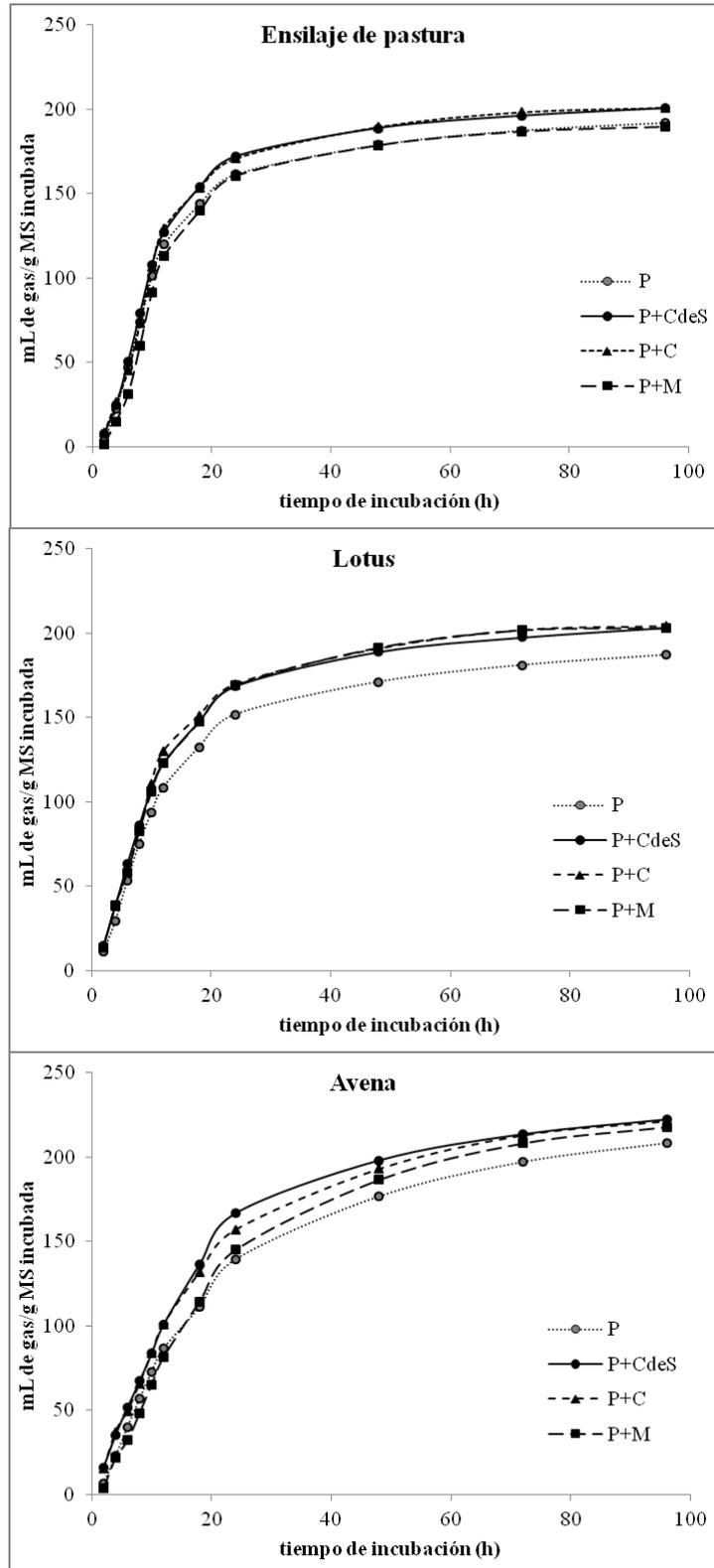


Figura 7: Producción de gas *in vitro* observada de forrajes incubados con líquidos ruminales procedentes de bovinos alimentados con ensilaje de pastura exclusivamente (P) o suplementados con 1% del PV de cascarilla de soja (P+CdeS), de cebada (P+C) o de maíz (P+M).

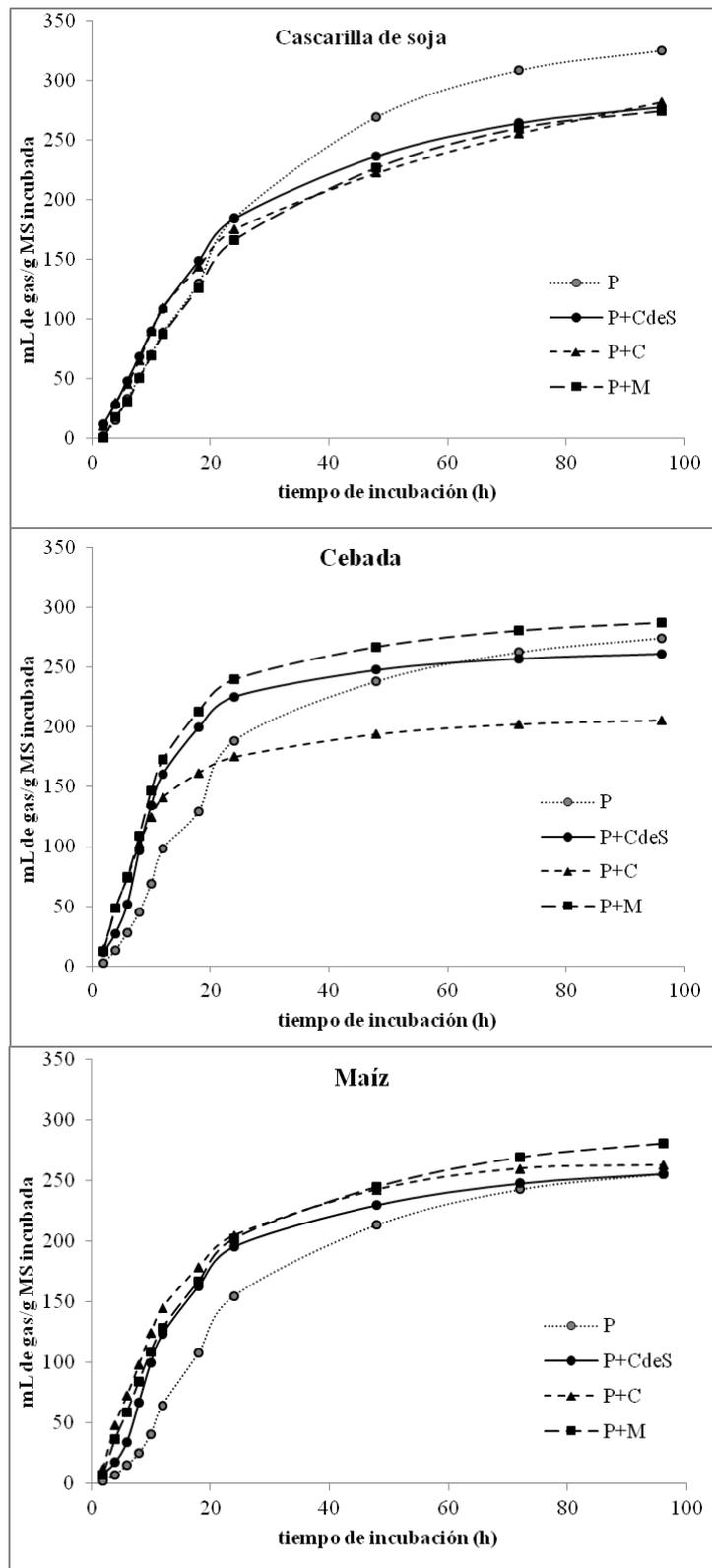


Figura 8: Producción de gas *in vitro* observada de concentrados incubados con líquidos ruminales procedentes de bovinos alimentados con ensilaje de pastura exclusivamente (P) o suplementados con 1% del PV de cascarilla de soja (P+CdeS), de cebada (P+C) o de maíz (P+M).