

EVALUACION NUTRITIVA DE LOS FORRAJES

ING. AGR. LUIS S. VERDE - Profesor de Nutrición
Presentado en la Estación Experimental de Paysandú el 15 de setiembre de 1965

Durante varias décadas los fitotecnistas han seleccionado e introducido numerosas especies y variedades forrajeras nuevas tratando de lograr una mayor producción de materia seca y una mejor distribución de esa materia seca a través del año. Sin embargo, en muchas circunstancias, el rendimiento de materia seca ha sido el único criterio usado en la evaluación de las especies en consideración.

Además de la disponibilidad de materia seca, la composición, palatabilidad y consumo son factores que también afectan la respuesta y la performance del animal y, por lo tanto, estos aspectos deben ser considerados en cualquier programa de evaluación forrajera. Es así que en los últimos años se ha desarrollado un extraordinario interés en el área de la evaluación de forrajes y se han efectuado numerosos trabajos tratando de obtener respuestas a los numerosos problemas que deben enfrentar los técnicos que trabajan en esta disciplina.

Cuando se está determinando el valor nutritivo de un forraje y el efecto que pueden tener diferentes sistemas de manejo sobre la performance del animal, es altamente deseable que se adopte un punto de vista conjunto entre el especialista forrajero y el nutricionista, a fin de obtener una información más completa de las especies en consideración.

Observando la bibliografía es posible decir que no hay un total acuerdo entre los diversos autores con respecto a lo que es calidad forrajera, muchos de los indicadores de calidad en los forrajes que han sido usados no han sido verificados a través de la respuesta del animal o no han sido correlacionados con la respuesta del animal. Es así que podemos decir que aún en el presente el término calidad forrajera es un término bastante oscuro. Mott⁵¹ considera la respuesta animal a un determinado forraje como una buena medida de la calidad de ese forraje. Este autor ha representado en forma esquemática los factores que pueden incidir en la respuesta del animal. Observando la figura 1 se puede notar que sin lugar a dudas el valor nutritivo y el consumo son las dos características de mayor importancia en la evaluación de forrajes a fin de determinar su calidad forrajera la que, finalmente, será la que determinará la respuesta del animal.⁴

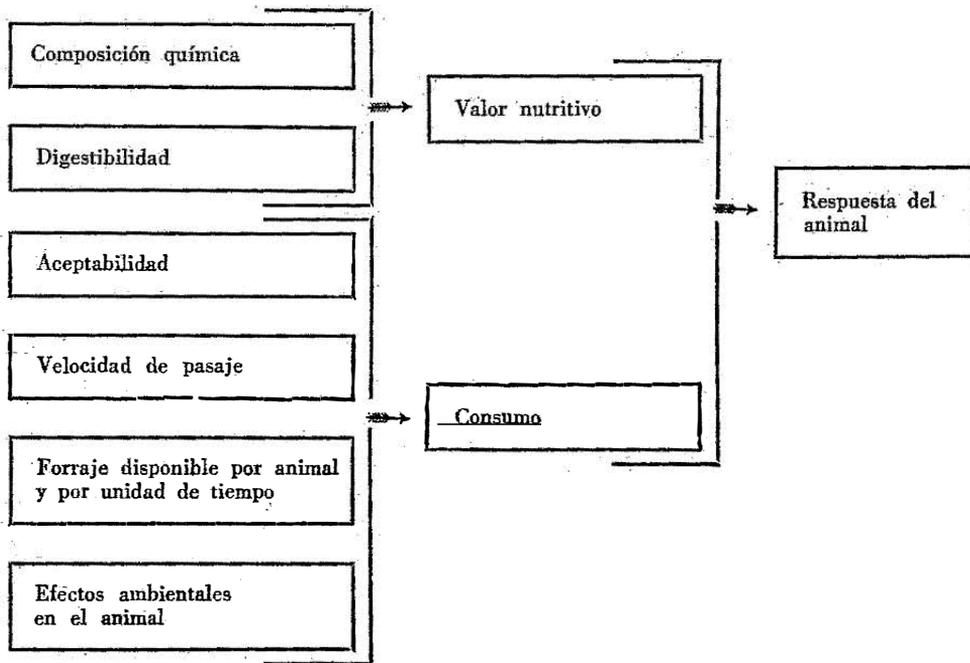


Figura 1. Adaptada de Mott⁶¹

EVALUACION QUIMICA

No hay duda que conjuntamente con todas las características agronomicas de la planta forrajera es muy importante el tener un conocimiento de la composición de la planta pues a través de ella puede ser posible estimar el valor nutritivo. Kennedy⁴⁰ ha establecido que cuando se usa el análisis químico para predecir la calidad de un forraje el investigador debe de tener presente dos limitaciones muy serias. Primero, que las muestras de forraje usadas para el análisis químico pueden no ser representativas del forraje consumido por el animal y, segundo, que el valor alimenticio y la composición química no están necesariamente relacionados estrechamente.

Es evidente que el análisis químico no mide el valor nutritivo total de un forraje, pero es posible decir que el valor nutritivo puede ser estimado, teniendo en cuenta ciertas restricciones, determinando materia seca, proteína bruta y fibra bruta. Es necesario recalcar, además, que el análisis químico es considerablemente más barato que los ensayos de digestibilidad o de alimentación y, por lo tanto, con una cuidadosa interpretación las determinaciones químicas pueden ser extremadamente útiles.

Durante muchos años el método de Wende, ideado por Henneberg y Stohman alrededor de 1890, ha sido el único procedimiento disponible para realizar el análisis químico de forrajes y de otros alimentos utilizados en la alimentación animal. Este método ha sido sometido a muy severas críticas, especialmente en los últimos años; entre las críticas más recientes y severas podemos mencionar las de Crampton y Maynard,²² Ellis *et al.*,²⁹ Nordfelt *et al.*,⁵² Paloheimo,⁵⁴ Morrison,⁵⁰ Paloheimo⁵⁵ y Van Soest.⁸¹

Las mayores críticas están basadas en: 1) que en la determinación de la fibra bruta, las sustancias de la pared celular son divididas, en una forma sumamente arbitraria, en dos porciones, una constituye la fibra bruta y la otra forma con-

juntamente con los azúcares y almidones, los extractivos no nitrogenados: y 2) que, en general, en la determinación de la fibra bruta un alto porcentaje de la lignina y una parte de la celulosa son disueltos y, por lo tanto caen dentro del extractivo no nitrogenado. Por lo tanto la mayor debilidad del análisis proximal está en el hecho que la mayor parte de la lignina, sin duda alguna la sustancia menos útil, nutritivamente hablando, de las sustancias de la membrana celular, cae dentro del extractivo no nitrogenado conjuntamente con los azúcares y almidones.

Recientemente ha habido considerable interés en la obtención de nuevos esquemas de análisis de forrajes, pero el delineamiento de un método que reúna a la vez las características de bajo costo y rapidez para la predicción del valor nutritivo de los forrajes y otros alimentos aún no ha podido ser obtenido.

De acuerdo a lo establecido por Van Soest⁸¹ la fibra es una entidad química que debe contener la celulosa y la lignina con el mínimo posible de contaminación de sustancias nitrogenadas. Evidentemente, es muy difícil definir precisamente la fracción fibra, sin embargo, los diferentes investigadores están en total acuerdo en el sentido de que el término fibra bruta debe denotar un residuo que está estrechamente asociado con la indigestibilidad de los alimentos.

De acuerdo con Van Soest⁸¹ cualquier método nuevo deberá ser "un buen indicador del valor nutritivo, al menos tan bueno o mejor, que el método de la fibra bruta".

Nordfelt *et al*⁵² han determinado que cuando se están efectuando experimentos para determinar la composición de los alimentos, dos tipos de análisis pueden ser realizados. En primer lugar está el tipo de análisis conducido de acuerdo a un esquema tipo a fin de obtener información práctica acerca de la calidad del alimento. Los autores han puntualizado que el método usado en este tipo de análisis debe llenar ciertos requerimientos en relación a simplicidad y reproducibilidad. El segundo tipo de análisis es aquel usado en una investigación más fundamental relacionada con la evaluación precisa de alimentos desde un punto de vista nutricional; este trabajo analítico deberá ser, por lógica, más complicado que el análisis de rutina. También ha sido puntualizado por estos autores que en ciertas circunstancias es prácticamente imposible obtener una evaluación segura del valor nutritivo de un alimento sin llevar a cabo un experimento con animales.

Es perfectamente sabido que la cantidad de fibra de las plantas aumenta a medida que la planta se aproxima a la madurez, esto es debido a una clara necesidad de más tejidos estructurales de sostén. Asimismo, a medida que la planta crece lo mismo sucede con la superficie foliar y con ella el poder de sintetizar carbohidratos también aumenta. Consecuentemente las cosechas forrajeras en general, tienden a hacerse más ricas en carbohidratos, tanto fibra bruta como extractivos no nitrogenados, a medida que avanza la madurez.

Muchos investigadores han establecido que el nivel relativo de carbohidratos totales y de lignina son los factores más importantes en la determinación de la digestibilidad.

Actualmente se acepta sin discusión que en la alimentación del ganado es muy importante el conocer el contenido de fibra de los diferentes alimentos que serán usados porque alimentos que tienen un alto contenido de fibra, son por lo general, de muy baja digestibilidad.

Muchos autores han dado considerable atención a todos estos aspectos y varios esquemas de análisis han sido propuestos, en los cuales se determina sistemáticamente lignina, celulosa, hemicelulosas, carbohidratos solubles, etc. Entre los más comprensivos esquemas de análisis podemos mencionar los propuestos por Waite y Gorrod,⁸⁴ Gaillard,^{31,32} Deriaz,²⁶ Paloheimo *et al*⁵⁵ y Harwood.³³

Una de las primeras tentativas de separación de las partes estructurales de las plantas de los componentes no estructurales, fue introducida por Norman y Jenkins,⁵³

Estos autores idearon un método para medir la parte celulósica de los forrajes, basándose para ello en un antiguo método usado para determinar celulosa en madera.

La determinación de la celulosa, lignina y otros carbohidratos para reemplazar al análisis de la fibra bruta en estudios nutricionales fue propuesta también por Crampton y Maynard.²² Esta modificación de los procedimientos clásicos fue considerada como un muy buen avance en la evaluación química de los forrajes porque la lignina ha sido reconocida como una sustancia cuya digestibilidad es prácticamente cero y por esto se la considera estrechamente relacionada con el valor nutritivo de los forrajes.

Después de la publicación de los trabajos de Norman y Jenkins⁵³ y de Crampton y Maynard²² numerosos investigadores han sugerido el reemplazo de la determinación de la fibra bruta por análisis separados para celulosa y lignina, Matrone *et al.*,⁴⁵ Ellis *et al.*²⁹ y Druce y Willcox.^{27,28}

Paloheimo y Paloheimo⁵⁷ desarrollaron un método para la determinación de las sustancias totales de la membrana vegetal y, separadamente, la fibra bruta en diferentes alimentos. Estos autores encontraron que en los alimentos usados para el ganado la cantidad de sustancias correspondientes a la membrana que permanecían junto a la fibra variaba, con unas pocas excepciones entre 42 y 64 por ciento.

De acuerdo a lo establecido por Pfander *et al.*⁶⁰ el método de Crampton y Maynard puede ser recomendado por su simplicidad y repetibilidad. Pero, debemos tener en cuenta, como ha sido sugerido por Miller⁴⁸ que ninguno de los métodos disponibles para la determinación de celulosa da una medida absolutamente segura del contenido de celulosa.

En consecuencia en los últimos años se ha comenzado a dar más consideración a otros constituyentes de la pared celular. Sosulki y Pattaerson⁷⁴ demostraron, trabajando con gramíneas que el contenido de lignina era la mejor medida simple de la digestibilidad aparente. Estos autores encontraron que cualquier relación entre la fibra cruda y la digestibilidad era debida a la alta correlación positiva existente entre la fibra cruda y la lignina.

Van Soest^{82,83} ha desarrollado un método para la determinación rápida de la fibra y la lignina en alimentos fibrosos. El método usa detergentes en lugar de hidróxido de sodio para disolver el nitrógeno del forraje en un intento de preservar la integridad de la lignina.

El problema de las necesidades proteicas es reconocido como uno de los más complejos en el campo de la nutrición animal. Investigadores de todo el mundo, conociendo el indispensable rol de las proteínas, han dado gran importancia a la determinación del valor proteico de los forrajes y otros alimentos.

De acuerdo a lo establecido por Sullivan⁷⁶ el contenido de proteína bruta de los forrajes, determinado por el método de Kyeldahl parece ser, dentro de límites razonables, un criterio aceptable de apreciación de la calidad forrajera. Este autor establece que el hecho de que la proteína cruda incluya nitrógeno no proteico y proteína verdadera no es un problema serio porque el término aminoácido esencial no tiene significación práctica para los rumiantes.

Es necesario especificar que el requerimiento del animal es por proteína cruda digestible en lugar de proteína cruda total pero, y de acuerdo a lo establecido por Reid *et al.*,⁷⁰ hay una alta correlación positiva entre la concentración de proteína total y la digestibilidad aparente de la proteína de los forrajes. En consecuencia se puede decir que los valores para la proteína cruda total pueden ser usados como una aceptable medida de la calidad del forraje.

Phillips *et al.*⁶² estudiando la composición química de varias gramíneas forrajeras encontraron que a medida que la madurez avanzaba el porcentaje de proteína dis-

minuía, lo mismo que los porcentajes de ceniza soluble al ácido y el extracto etéreo; la lignina, fibra cruda y celulosa presentaban una tendencia opuesta, o sea que con el avance de la madurez se observaba un aumento de los porcentajes respectivos. Estos autores concluyen que debido a los cambios progresivos en los contenidos de lignina y proteína y debido a que no hay fluctuaciones significativas en los extractivos ni nitrogenados o carbohidratos totales, no es posible recomendar un estado de crecimiento especial como óptimo para ensilaje o para heno, tomando como base la composición solamente.

En la actualidad es un hecho totalmente reconocido que la eficiencia de la digestión en el rumiante y la conversión del nitrógeno no proteico a proteína bacteriana depende de un suministro adecuado de energía a la flora del rumen. Arias *et al*¹ consideran que las bacterias requieren energía procedente de una fuente fácilmente atacable como ser glucosa, sucrosa o almidón antes de que ellas puedan romper la molécula de celulosa en moléculas de carbohidratos suficientemente pequeñas para que sean utilizadas como fuentes de energía.

Bondi y Tagari¹³ estudiaron los constituyentes solubles en agua de los forrajes y su influencia en la actividad metabólica del rumen. Estos investigadores establecieron la existencia de una relación linear entre el volumen de descomposición de la celulosa, el contenido de carbohidratos solubles y el nitrógeno no proteico contenido en el alimento.

También Pearson y Smith⁵⁸ demostraron que la conversión de urea a proteína bacteriana por la microflora del rumen fue mejorada por la adición de carbohidratos solubles a un sistema *in vitro*.

En consecuencia la importancia de los carbohidratos solubles en agua de los forrajes ha sido reconocida por un período considerable y, especialmente en los últimos tiempos, desde dos puntos de vista, primero por su valor energético en los forrajes frescos y conservados y, segundo, por su contribución en la elaboración de un buen silaje. En este último aspecto, cabe decir que el crecimiento rápido de las bacterias productoras de ácidos en el proceso del ensilaje es ayudado en forma considerable si el forraje a ensilar contiene cantidades apreciables de carbohidratos solubles.

En vista de la importancia de la fracción carbohidratos, se ha considerado esencial el obtener información acerca de las variaciones que sufren los carbohidratos solubles en agua como asimismo aquellos que forman la pared celular.

De acuerdo con Hansen *et al*³⁴ los azúcares primarios, que son los principales productos de la fotosíntesis, pueden ser transformados a: 1) polisacáridos, como ser el almidón y fructosanas los cuales sirven como sustancias energéticas de reserva para el crecimiento de las plantas; 2) sustancias que servirán para formar la estructura de la pared celular, tales como celulosa, hemicelulosas, lignina y pectina; 3) sustancias que pasarán a formar parte de las proteínas del protoplasma de las plantas y 4) grasas y ceras las cuales van a proveer de materiales de reserva y de protección de las hojas y otras superficies.

Desde que Crampton y Maynard²² sugirieron que la división de los carbohidratos de los forrajes en lignina, celulosa y otros carbohidratos podría ser de gran utilidad en la predicción de los valores nutritivos, muchos estudios extensivos han sido hechos a fin de determinar la composición y la distribución de los mono y oligosacáridos en gramíneas y leguminosas. Sin embargo, hasta el advenimiento de la cromatografía en papel, muchas de las investigaciones en el análisis de las plantas se vieron frustradas debido a la ausencia de un método eficaz de separar en sus componentes una mezcla compleja de azúcares. La adaptación de la cromatografía en papel al análisis de los diferentes azúcares presentes en gramíneas y leguminosas ha sido considerada en forma extensa por Laidlaw y Reid^{41,42} y por Bell.¹¹

Percival⁵⁹ ha establecido que dentro de los carbohidratos solubles de los forrajes, las fructosanas son los componentes de mayor importancia. Esto se debe primeramente a que son los carbohidratos de reserva por excelencia y en segundo lugar porque son los más fácilmente hidrolizables, característica ésta de suma importancia para asegurar una buena utilización por el animal o para obtener un buen ensilaje.

Las fructosanas son marcadamente afectadas por el estado vegetativo de la planta, de aquí que algunos autores usen el contenido en fructosanas a fin de predecir la calidad de un determinado forraje, Waite y Boyd.⁸⁵

En adición a la energía rápidamente utilizable y disponible suministrada por el almidón y los carbohidratos solubles, debemos considerar la energía proveniente de la fermentación de la celulosa y otros carbohidratos estructurales. Es necesario tener en cuenta que la celulosa y hemicelulosa constituyen una parte muy sustancial en la gran mayoría de los forrajes y que estos elementos a través de la fermentación microbiana que tiene lugar en el rumen darán origen a los ácidos grasos volátiles (acético, propiónico y butírico) y al ácido láctico que son las principales fuentes de energía para el rumiante.

A manera de resumen podemos decir que desde el punto de vista de medir el valor nutritivo de un forraje utilizando la composición química, muchos autores están en total acuerdo en que los más importantes valores a usar son los porcentajes de proteína bruta, carbohidratos estructurales y lignina. Sin embargo, en la actualidad se está dando gran importancia a la obtención de información acerca de otros constituyentes químicos que pudieran contribuir a dar un índice del valor nutritivo de los forrajes.

EVALUACION A TRAVES DE LA DIGESTIBILIDAD *IN VITRO*

El ensayo de digestibilidad *in vivo* ha sido el procedimiento standard usado para estudiar la calidad de los forrajes, pero estos ensayos son costosos y llevan un tiempo considerable y asimismo se requieren grandes cantidades de forraje, esto hace que la digestibilidad *in vivo* no sea aplicable a pequeñas cantidades de forraje como las que dispondría el fitotecnista, o las procedentes de pequeñas parcelas experimentales.

Por lo tanto, en los últimos tiempos se ha desarrollado un extraordinario interés en el uso de la técnica de la fermentación *in vitro* a fin de tratar de estimar a través de ella la calidad forrajera.

Desde el año 1947 hasta el presente, se ha realizado una enorme cantidad de trabajos y sería largo y tedioso tratar de hacer una revisión de todos los muchos métodos que se han ideado. Para aquellos que deseen profundizar en estos aspectos podríamos mencionar las excelentes revisiones realizadas por: Johnson,³⁷ Bentley,¹² Marston,⁴⁴ Phillipson,⁶¹ Barnes⁴ y Shelton y Reid.⁷³

La técnica de la fermentación *in vitro* simula, hasta cierto punto, el proceso digestivo que sucede en el rumen, por el cual los carbohidratos estructurales son digeridos y convertidos en productos solubles por enzimas de los microorganismos del rumen.

Básicamente el procedimiento comprende tres ingredientes fundamentales: 1) el forraje en consideración, 2) la saliva artificial, que es más propiamente una solución buffer que provee de nutrientes y 3) el inóculo de líquido de rumen.

Sin lugar a dudas, uno de los avances más importantes obtenidos en esta técnica fue la publicación de la composición de la saliva de la oveja por McDougall,⁴⁷ y podemos decir sin temor a cometer un error serio que prácticamente todos los

sistemas desarrollados desde ese entonces usan una mezcla mineral basada directamente en la "solución de McDougall" o en una modificación de ella.

Es necesario puntualizar que la gran mayoría de los procedimientos ideados hasta el momento no son verdaderos rumenes artificiales sino que son meramente fermentaciones *in vitro* que usan microorganismos del rumen.

El criterio que se debe sustentar creo que sea el establecido por Warner⁸⁵ y por Davey *et al*²⁵ por el cual se deberá llamar rumen artificial a aquellos sistemas que reproduzcan la situación *in vivo* exactamente. Por lo tanto se deberán cumplir las siguientes premisas: 1) mantenimiento de proporciones y número normal de bacterias y protozoarios; 2) mantenimiento de una digestión normal de la celulosa, almidón y proteína y observar una interacción normal entre estas digestibilidades y 3) poder predecir con un buen grado de seguridad resultados cuantitativos *in vivo*.

Diversos criterios han sido usados por diferentes investigadores a fin de evaluar la digestibilidad *in vitro*. En general, la gran mayoría de los trabajos realizados hasta el presente han estudiado en forma principal la digestión de la celulosa y la han usado como criterio para juzgar la calidad de los forrajes. Esto aparece sumamente lógico si consideramos que la celulosa es un constituyente fundamental en los forrajes, el cual puede ser utilizado por los rumiantes a través de la acción microbiana simbiótica.

Otro criterio sumamente usado para evaluar la digestibilidad *in vitro* ha sido la digestibilidad de la materia seca; recientemente investigadores ingleses han hecho mucho énfasis en este aspecto, Tilley *et al*⁷⁸ y Tilley y Terry.⁷⁷

La síntesis proteica que ocurre en el rumen ha sido otro de los criterios usados en forma muy principal a fin de evaluar la digestibilidad *in vitro*, así como la utilización del nitrógeno no proteico.

Otros criterios que han sido usados a fin de determinar la digestibilidad *in vitro* han sido la producción de ácidos volátiles, método usado como criterio principal en los trabajos de Barnett y Reid^{6,7,8} y también la producción de gas.

Pero, como se ha mencionado anteriormente, la mayoría de las contribuciones han sido hechas en relación con los factores que afectan la digestibilidad de la celulosa.

Burroughs *et al*^{15,16,17} han realizado una serie muy interesante de trabajos en los cuales se estudiaron los efectos de la adición de carbohidratos rápidamente utilizables por la flora microbiana (glucosa o almidón), la adición de nitrógeno no proteico y la adición de diversos minerales.

Una comprobación de sumo interés, que cabe mencionar en especial con relación a la utilización de la melaza en las raciones para ganado, es la realizada por Arias *et al*¹ que observaron el efecto estimulador de pequeñas cantidades de carbohidratos rápidamente utilizables sobre la digestibilidad de la celulosa y a la vez el efecto inhibitorio que tenían grandes cantidades de esos mismos carbohidratos sobre la digestión de la celulosa.

El-Shazly *et al*³⁰ determinaron que este efecto era debido primariamente a la competencia por nutrientes, especialmente nitrógeno. La adición de nitrógeno no proteico no soluciona esta situación y este es un aspecto que debe ser tenido muy en cuenta en el uso de mezclas de melaza con urea pues, como es sugerido por Johnson³⁷ los microorganismos celulolíticos son mucho más susceptibles a la toxicidad debida a nitrógeno no proteico que lo que lo son los microorganismos que atacan el almidón. Por lo tanto puede suceder que se observe, en determinados niveles de nitrógeno no proteico, una pobre performance de los animales sin observarse todavía síntomas de intoxicación.

Otra técnica de evaluación es la usada por Belazco *et al*¹⁰ que ha sido denominada la técnica *in vivo*; en esta técnica el forraje se expone a la acción digestiva de la población microbiana en el rumen de un animal fistulado, dentro de una bolsita de nylon o de dacron.

Esta, que también tiene matices y modificaciones diversas, tiene la ventaja de exponer la muestra a una flora totalmente normal, en tanto que en la técnica *in vitro* se puede estar favoreciendo a alguna determinada fracción de la flora. Sin embargo, estudios realizados por Hopson *et al*³⁶ han demostrado que este método no se adapta a la estimación de resultados *in vivo* y que, en general, las curvas de digestión que se obtienen son similares a las curvas de digestión obtenidas usando la técnica de fermentación *in vitro*.

Lógicamente, una vez obtenidos los valores de digestibilidad *in vitro* el siguiente paso es tratar de establecer la relación que ese valor tiene con la digestibilidad *in vivo* y de esta manera poder predecir la digestibilidad de un determinado forraje. Burroughs *et al*¹⁸ han puntualizado las limitaciones del método *in vitro* en cuanto a la evaluación de forrajes. Sin embargo, en la revisión de la bibliografía, se pueden encontrar correlaciones razonablemente altas entre la digestibilidad *in vitro* e *in vivo*.

Existen muchos factores que pueden afectar la reproducibilidad de los métodos *in vitro* y por lo tanto la magnitud de la digestibilidad y su relación con la digestibilidad verdadera. Entre estos factores podríamos mencionar: la concentración del sustrato, fineza de molienda, composición y capacidad buffer del medio nutriente, cantidad y forma de preparar el líquido de rumen para inocular las muestras, dieta del animal del que se extrae el líquido de rumen y período de almacenamiento de las muestras.

Baumgardt *et al*⁹ usando 11 forrajes comparó algunos de los métodos de laboratorio propuestos y encontró que la digestibilidad *in vitro* de la celulosa tenía una alta correlación con las determinaciones *in vivo*. Barnett⁸ ha encontrado, estudiando 27 silajes, una muy buena relación entre la digestibilidad *in vitro* de la celulosa y la digestibilidad de la fibra cruda medida en ensayos con ovinos. Similares resultados obtuvieron Quicke *et al*⁶³ trabajando con diversos forrajes.

Desgraciadamente pocos investigadores han intentado la comparación de resultados *in vivo* e *in vitro* desde un punto de vista estrictamente comparable. Por ejemplo una falla común que se observa es la de usar sustratos que difieren en composición del alimento con el cual se está alimentando al animal dador del líquido de rumen. Con respecto a este punto los diversos investigadores y escuelas que se encuentran trabajando sobre este aspecto aún no han llegado a un total acuerdo. La diversidad de métodos experimentales y procedimientos que es dable observar en la actualidad es totalmente lógica si consideramos que los procedimientos *in vitro* están aún en estado experimental y de desarrollo. Shelton y Reid⁷³ sugieren que se hagan los máximos esfuerzos a fin de uniformizar los métodos experimentales y, de esta manera, poder relacionar resultados obtenidos por distintos laboratorios.

En nuestras condiciones, en que se está pensando en la iniciación de estudios *in vitro*, no contando con ninguna experiencia previa, creo que debemos ser sumamente cuidadosos en la elección del método y no embarcarnos con métodos en los cuales ni los mismos autores de las técnicas han llegado a un total acuerdo. El método que elijamos deberá ser sumamente sencillo, que tenga una muy buena reproducibilidad y precisión y, por sobre todas las cosas, que dé respuestas concretas a los problemas que queremos solucionar. En este sentido uno de los métodos que ha resultado más promisorio es el que ha sido ideado y desarrollado recientemente por Tilley y Terry⁷⁷ y que consta de dos etapas: una fermentación *in vitro* y una digestión enzimática por medio de pepsina.

La importancia de los estudios de digestibilidad como proveedores de datos que permitan medir la calidad de diferentes forrajes y alimentos ha sido altamente jerarquizada en los últimos años. Es así que un gran número de trabajos científicos ha sido publicado suministrando información sobre un variado número de plantas forrajeras y de alimentos usados por los animales.

Brevemente y a manera de introducción sobre este punto consideraremos los factores que afectan la digestibilidad:

a) *Estado de madurez del forraje.* Ha sido definitivamente probado que durante el crecimiento de las plantas suceden ciertos cambios en la composición química que llegan a afectar marcadamente la digestibilidad. De estos cambios el que tiene mayor significación es, sin lugar a dudas, el aumento del porcentaje de lignina. También se observan marcados cambios en las proporciones de los distintos polisacáridos, es así que a medida que la planta se aproxima a la madurez el contenido de celulosa se hace mayor y los carbohidratos solubles disminuyen, trayendo, todos estos cambios, como consecuencia la producción de un alimento más fibroso y lignificado, de una digestibilidad considerablemente reducida en relación a estados vegetativos más tempranos. Un resultado típico claramente demostrativo de todo este proceso ha sido el encontrado por Phillips *et al.*⁶²

b) *Composición botánica.* Los efectos beneficiosos de suministrar mezclas de leguminosas y gramíneas son muy evidentes y han sido remarcados en forma continuada durante los últimos años. Sólo cabe decir aquí que, salvo algunas excepciones, la digestibilidad de los componentes individuales aumenta cuando son suministrados en mezclas.

c) *Consumo de materia seca.* Ha sido demostrado por Raymond *et al.*⁶⁵ que cuando el nivel de consumo de forraje aumenta la digestibilidad aparente disminuye y que cuando la digestibilidad se determina con consumos restringidos se sobreestima el valor real de la digestibilidad. El efecto más inmediato de un aumento en el consumo es un aumento en la velocidad de pasaje a través del tubo digestivo y esto resulta en una disminución de la digestibilidad.

d) *Adición de suplementos.* La adición de suplementos tiene como principal efecto la alteración de la relación nutritiva y esto puede tener un marcado efecto sobre la digestibilidad. Por ejemplo, la adición de fuentes que suministran carbohidratos altamente digeribles puede afectar en forma considerable la digestibilidad de la materia seca y de la celulosa.

Determinación de la digestibilidad. La técnica convencional o método directo de medir la digestibilidad a través de la determinación de los nutrientes ingeridos por el animal y las cantidades respectivas excretadas en las heces ha sido descrita por varios autores, Morrison,⁵⁰ Maynard y Loosli⁴⁶ y Raymond *et al.*⁶⁴ Para aquellos que deseen una revisión comprensiva de la técnica, con especial referencia a las pasturas, la revisión realizada por Raymond *et al.*⁶⁴ puede serles muy útil.

En la actualidad hay considerable divergencias de opinión en relación a la aplicación de resultados de digestibilidad obtenidos con ovinos a fin de calcular raciones para vacunos y viceversa. Muchos investigadores han considerado que la eficiencia con que tanto vacunos como ovinos digieren diversos alimentos es esencialmente la misma. Es así que coeficientes de digestibilidad de alimentos que han sido determinados en ensayos con ovinos son usados para vacunos asumiendo que ambas especies tienen la misma digestibilidad.

Como un resultado de todo esto, la información que aparece en muchas tablas constituye un promedio de coeficientes de digestión que se aplica en forma indistinta a ambas especies.

En una recopilación realizada por Schneider⁷¹ se especifica que el 71.5 % de los ensayos de digestibilidad en rumiantes fueron hechos con ovinos, 27.5% con vacunos y 1 % con caprinos.

Cipolloni *et al*¹⁹ hacen énfasis en la importancia de investigar críticamente hasta qué punto los coeficientes de digestibilidad para las dos especies son intercambiables.

Después de una cuidadosa revisión de la bibliografía es posible decir que las diferencias existen pero no es posible establecer si la dirección y la magnitud de la diferencia son funciones del alimento usado o del nutriente en consideración. Cipolloni *et al*¹⁹ estudiaron estadísticamente y basándose en los datos de Schneider,⁷¹ un gran número de trabajos que permitían la comparación de ovinos y vacunos. Los alimentos fueron clasificados en: voluminosos secos, ensilajes y concentrados y además se consideró el análisis proximal y los coeficientes de digestibilidad para proteína bruta, fibra bruta, extractivos no nitrogenados y extracto etéreo. La principal conclusión a la que arriban estos autores es que para obtener una evaluación ajustada del valor nutritivo sería necesario usar coeficientes de digestión obtenidos con la especie que utilizará el alimento en cuestión.

Schneider y Lucas⁷² han demostrado que una parte substancial de la variación en los coeficientes de digestión está asociada con la composición proximal. Por lo tanto, cuando se comparan resultados obtenidos con ovinos con resultados obtenidos para vacunos ó cuando resultados de una especie quieren ser aplicados a la otra será necesario hacer una corrección en relación a la composición.

Jordan y Staples³⁹ han establecido, a través de una serie de ensayos para comparar digestibilidad de henos por novillitos y borregos, que trabajando con vacunos se obtiene un mínimo de variación con un número mínimo de animales. Pero asimismo estos autores recalcan que el costo y la facilidad de manipuleo hacen del ovino un animal muy útil, especialmente si existe la posibilidad de utilizar mayor número de animales.

Otro aspecto que ha dado origen a alguna controversia en la longitud del período de recolección de muestras en el ensayo de digestibilidad. Es comprensible que el alargamiento del período de recolección aumente el trabajo, lleva más tiempo y hace más caro el experimento; asimismo se limita el número de ensayos y el número de raciones o tratamientos que pueden ser probados se hace menor. Por otro lado, el acortar el período puede acarrear el riesgo de inexactitudes debido a que se puede dificultar la obtención de muestras claramente representativas de la digestibilidad y de la composición química del alimento en cuestión. Staples y Dinusson⁷⁵ estudiaron con considerable detalle el grado de seguridad obtenido a través de ensayos de digestibilidad con 7 y 10 días de períodos de recolección. Los resultados han demostrado que, con una posible excepción en el caso de los extractivos no nitrogenados, los coeficientes de digestibilidad fueron totalmente comparables en seguridad. Finalmente, cabe decir en este aspecto que, salvo que la naturaleza del experimento así lo requiera, es suficiente con un período de recolección de muestras de 7 días.

CONSUMO

Como ya se ha mencionado, el segundo factor de mayor importancia en determinar la respuesta del animal es el consumo. Existen un gran número de factores que pueden afectar y controlar el consumo, pero entre los más importantes podemos mencionar: palatabilidad; forraje disponible por animal y por unidad de tiempo o sea lo que podríamos llamar presión de pastoreo; competencia de los animales dentro de una pradera; velocidad de digestión o pasaje del alimento y efectos ambientales sobre el animal.

En términos generales es posible definir el nivel deseado de consumo como aquel que es suficiente para sostener el nivel deseado de producción. Es necesario puntualizar que el animal tiene una predeterminada capacidad para forraje y que cualquier factor que tienda a disminuir la velocidad de movimiento del alimento a través del tracto digestivo o que resulte en un uso subóptimo de la capacidad del animal, se reflejará en una disminución del consumo de forraje.

Podríamos agrupar los factores que afectan el consumo en tres categorías fundamentales: 1) los factores inherentes al animal, 2) los factores inherentes al forraje y 3) manejo del forraje y de los animales.

El animal contribuye por lo menos con tres fuentes fundamentales de variación en el consumo, ellas son: individualidad, nivel de producción y tamaño. Es fundamental remarcar aquí, para un mejor entendimiento de la regulación del consumo, que éste no es una variable independiente y, por lo tanto, puede ser afectado por diversas funciones fisiológicas como ser: crecimiento, deposición de grasa, producción de leche y producción de calor o de trabajo.

Los factores inherentes al forraje son: estado de madurez, cantidad disponible por unidad de superficie, densidad; composición botánica y palatabilidad.

Balch y Campling³ han realizado una cuidadosa revisión de la literatura y de ella se desprende que la alteración de la digestibilidad, por el agregado de cualquier elemento, altera el consumo máximo de alimento. Otro factor mencionado por estos autores es la distensión del retículo-rumen, y se señala una experiencia en la cual se ofrecían diferentes forrajes ad-libitum a ganado vacuno, comprobándose que los animales llenaban el rumen siempre hasta un nivel similar. Esto parece tener estrecha relación con la manifestación de hambre y, según Crampton,²⁴ el que un animal sienta hambre está en estrecha relación con la velocidad con que disminuye la carga del rumen.

No es el propósito de esta revisión entrar a considerar los aspectos fisiológicos de la regulación del consumo, sólo mencionaremos que diversas teorías hacen énfasis en la regulación nerviosa central, ejercida por el hipotálamo, y en diversos mecanismos de regulación química. A aquellos que deseen profundizar en estos aspectos sólo me cabe referirlos a la excelente revisión ya mencionada de Balch y Campling.

Otro de los factores inherentes al forraje que puede afectar el consumo de forraje o de alimentos es la palatabilidad. Observando la bibliografía se puede ver que, muy comúnmente, este término tiene diversos sentidos y que es, la mayoría de las veces, definido muy vagamente. Una definición que puede considerarse bastante ajustada es la dada por Jones³⁸ que establece que "la palatabilidad está indicada por la rapidez con que un alimento es elegido y comido". Otra definición muy aceptada es la de Young³⁹ que define palatabilidad como "las características y condiciones de las plantas que estimulan una respuesta selectiva por parte de los animales". Son muchos los factores que pueden afectar la palatabilidad pero hasta el presente solamente la composición química ha recibido la atención de los investigadores, habiéndose comprobado que existe una alta correlación entre la composición química y la palatabilidad.

Los requerimientos nutritivos de un animal específico, para cumplir una determinada función pueden ser establecidos a tres niveles de consumo: 1) el nivel mínimo en el cual habrá una respuesta del animal; 2) el nivel óptimo que asegurará la máxima respuesta por un período prolongado, y 3) el nivel máximo que puede ser tolerado sin crear una deficiencia de otros nutrientes o sin crear condiciones de toxicidad. En la práctica esto se refleja en un aumento de producción cuando una ración cambia de un nivel deficitario a un nivel óptimo, una nivelación en la producción cuando se pasa de un óptimo a un máximo y una declinación

cuando, una vez alcanzado el máximo, comienza a haber interferencia entre los nutrientes. Estos tres niveles de consumo de nutrientes han sido ilustrados muy claramente por Axellson² en una representación gráfica (Fig. 2).

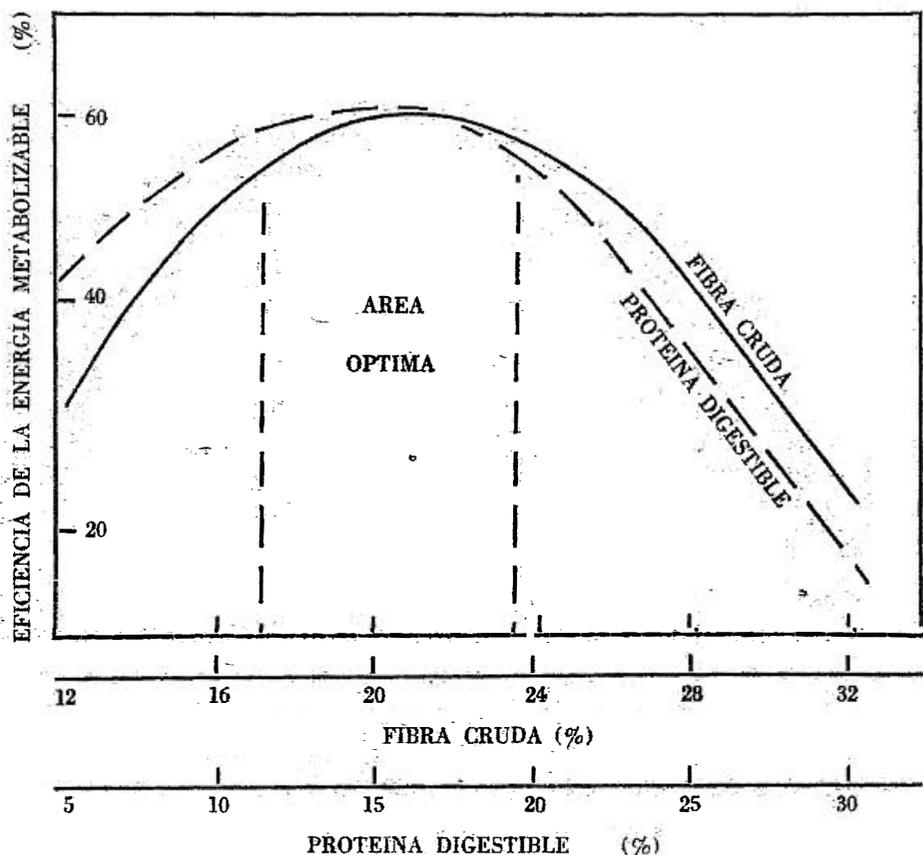


Fig. 2. Efecto de la fibra cruda y de la proteína digerible sobre el uso de la energía del alimento.

El consumo es una medida sumamente útil puesto que ella refleja el total de los nutrientes ingeridos por el animal. La materia seca consumida puede ser medida en dos formas: 1) por pesada directa del forraje consumido, esto se puede realizar solamente con animales estabulados, y con ello se está introduciendo una fuente de error pues los animales estabulados consumen menos alimentos que cuando están en pastoreo libre; 2) por el uso de indicadores externos indigeribles.

Los métodos que usan indicadores han adquirido considerable desarrollo en el presente y, por lo general, se les agrupa bajo la denominación común de métodos indirectos. Es necesario tener presente que el propósito del indicador externo es la estimación de la cantidad de heces producida, pudiendo hacerse esto también por el uso de bolsas o harneses especiales.

Excelentes revisiones sobre los métodos para la determinación del consumo y la digestibilidad por animales en pastoreo han sido preparadas por Harris *et al.*,³⁵ Witke,⁸⁷ Valentine⁸⁰ y Woolfolk.⁸⁸

La digestibilidad aparente de un forraje por animales en pastoreo se puede determinar por dos técnicas; la primera requiere un indicador "interno", indigestible, que ocurra naturalmente en el forraje y la determinación de ese indicador tanto en el forraje como en las heces; en la segunda técnica, llamada del índice fecal, el indicador no necesita ser indigestible y es medido solamente en las heces, luego de haber establecido ecuaciones de regresión.

Los indicadores "internos" que están presentes en la planta y que son usados en estos métodos incluyen: lignina, cromógenos, nitrógeno, etc. Entre los indicadores externos, los cuales son suministrados al animal para determinar las heces producidas, se pueden mencionar el óxido crómico, óxido de hierro, etc.

Si es posible tomar muestras del forraje consumido y si el indicador interno es totalmente indigestible el consumo de materia seca puede ser calculado de la siguiente manera:

$$\text{Materia seca consumida} = \frac{\text{Peso de las heces} \times \% \text{ de indicador en las heces}}{\% \text{ de indicador en el forraje}}$$

El coeficiente de digestibilidad aparente (CDA) para cada nutriente puede ser calculado de la siguiente manera:

$$\text{CDA (en \%)} = 100 \% - 100 \times \frac{\% \text{ indicador en el forraje}}{\% \text{ indicador en las heces}} \times \frac{\% \text{ nutriente en las heces}}{\% \text{ nutriente en el forraje}}$$

Los inconvenientes de este método serían: 1) que algunos de los indicadores internos usados, en algunas circunstancias, no son totalmente indigestibles, y 2) la obtención de muestras totalmente representativas del forraje consumido por el animal. Con respecto a este último punto el método de la fistula esofágica desarrollado por Torrell¹⁹ y modificado por Cook *et al*²⁰ aparece como bastante seguro en la mayoría de las condiciones.

A fin de salvar las dificultades del método descripto anteriormente, se ha desarrollado la técnica del índice fecal. Para obtener información básica por este método es necesario cortar el forraje y suministrarlo a animales en un ensayo convencional de digestibilidad, en el cual el forraje y las heces son medidos cuantitativamente. El alimento y las heces son también analizados a fin de determinar un indicador interno que podría ser, lo mismo que en el método anterior, lignina, cromógenos o nitrógeno. Al mismo tiempo, animales equipados con bolsas para heces o animales a los cuales se les ha suministrado un indicador fecal externo a fin de determinar la producción total de heces son pastoreados en la pradera. Con los datos obtenidos en el ensayo de digestibilidad se establece una ecuación de regresión e inmediatamente, se determina el indicador interno en las heces del animal en pastoreo y de esa manera la digestibilidad del forraje puede ser calculada por la ecuación de regresión.

El consumo de materia seca puede ser calculado por este método en la siguiente forma:

$$\% \text{ indigestibilidad de la materia seca} = 100 \% - \% \text{ digestibilidad de la materia seca}$$

$$\text{Consumo de materia seca} = \frac{\text{Materia seca en las heces}}{\% \text{ indigestibilidad de la materia seca}}$$

Con respecto a estos métodos indirectos Brisson¹⁴ y Corbett²¹ han remarcado que a pesar de que estos métodos solucionan las dificultades de la recolección total, ellos introducen errores que pueden ser debidos a una recuperación incompleta del indicador o a las dificultades en la obtención de muestras representativas debido a fluctuaciones diurnas en la excreción del indicador.

Como se ha mencionado anteriormente los indicadores "internos" que han sido usados en mayor escala han sido: lignina, nitrógeno y cromógenos. La lignina está siendo dejada de lado, pues en la generalidad de las veces ha dado resultados extremadamente variables. Esta variabilidad puede ser debida a tres causas fundamentales: 1) los métodos de determinación de la lignina están sujetos a grandes errores; 2) en determinadas circunstancias un cierto porcentaje de la lignina puede ser digerida (en algunas circunstancias hasta el 10 %), y 3) la lignina por sí misma es una fuente de interferencia en la digestibilidad.

El uso del nitrógeno fecal como un indicador ha sido preferentemente usado en los trabajos de Raymond^{66,67} y de Lancaster⁴³ y constituye un método bastante aceptable, pero cuando existe la posibilidad de usar los cromógenos se debe preferir estos últimos.

El método de los cromógenos fue introducido por Reid *et al*^{68,69} y ha constituido un importante progreso en la evaluación de forrajes en condiciones de pastoreo. La simplicidad y precisión de esta técnica hacen de ella un procedimiento sumamente recomendable en los ensayos de digestibilidad y de determinación de consumo con la mayoría de los forrajes en condiciones de pastoreo.

El consumo de forraje también puede ser determinado, en forma directa, por los métodos de corte, consistiendo, casi todos ellos, en cortar un número de muestras en la superficie pastoreada para estimar la cantidad de forraje utilizada y la disponible. Linehan *et al*, citados por Wittke,⁸⁷ han preparado una fórmula que permite una buena estimación del consumo.

Minson⁴⁹ llega a conclusiones de sumo interés en relación al uso de los métodos indirectos en la determinación del valor forrajero de una determinada especie, estas conclusiones son las siguientes: 1) siempre que un método indirecto se desarrolle o perfeccione, su precisión deberá ser determinada por comparación con una determinación que utilice directamente animales y se deberá calcular el error standard de la estimación; 2) cuando se utilicen ecuaciones de regresión para predecir el valor nutritivo de un forraje, el error standard de la estimación debe ser aplicado a todas las demás estimaciones a menos que se pueda probar que un error más pequeño es válido; 3) puesto que grandes errores están asociados, por lo general, con la mayoría de los métodos indirectos de evaluación, cualquier resultado obtenido por su uso deberá ser considerado con precaución, y 4) toda vez que pequeñas diferencias sean esperadas, se deberán usar métodos directos de evaluación con animales.

INDICE DEL VALOR NUTRITIVO

Una de las contribuciones más útiles e interesantes de los últimos tiempos, a fin de estimar el valor nutritivo de los forrajes ha sido, sin lugar a dudas, el "Índice del valor nutritivo" desarrollado por Crampton *et al*.²³ Este índice está basado en el nivel de consumo voluntario de forraje cuando éste constituye la totalidad de la ración. La base para el desarrollo de este índice fue el considerar que la velocidad de consumo de un alimento estaba influenciada por su digestibilidad. El índice del valor nutritivo se determina por la siguiente fórmula:

$$N. V. I. = \text{Consumo relativo} \times \text{digestibilidad}$$

El consumo relativo se determina por medio de la siguiente fórmula:

$$R. I. = \text{Consumo observado} \times \frac{100}{80 (W \text{ kg } 0.75)}$$

Para determinar el consumo relativo se usa lo que los autores han designado como un forraje standard, (heno de leguminosa, picado y procedente de cortes realizados en estados vegetativos tempranos).

Crampton²⁴ ha sugerido que la variabilidad asociada con el consumo es alrededor del 70 % y la variabilidad asociada con la digestibilidad es alrededor del 30 %. De esto podemos deducir que un valor aproximado para la digestibilidad no va a afectar grandemente el N. V. I., sin embargo, determinaciones incorrectas del consumo pueden afectar en forma considerable este índice.

1. ARIAS, S., W. BURROUGHS, P. GERLAUGH and R. M. BETHKE. The influence of different amounts and sources of energy upon *in vitro* urea utilization by rumen microorganisms. *Journal of Animal Science* 10:683-692. 1951.
2. AXELLSON, J. Relationships between contents of metabolizable energy, total digestible nutrients, scandinavian feed units and starch units in the foodstuffs. *Annals of the Royal College of Sweden* 19:145-160. 1953.
3. BALCH, C. C. and R. C. CAMPLING. Regulation of voluntary food intake in ruminants. *Nutrition Abstracts and Reviews* 32:669-686. 1962.
4. BARNES, R. F. Use of *in vitro* rumen fermentation techniques for estimating forage digestibility and intake. *Agronomy Journal* 57:213-216. 1965.
5. BARNETT, A. J. G. and R. L. REID. Studies on the production of volatile fatty acids from grass by rumen liquor in an artificial rumen. I. The volatile fatty acid production from fresh grass. *Journal of Agricultural Science* 48:315. 1957.
6. BARNETT, A. J. G. and R. L. REID. Studies on the production of volatile fatty acids from grass by rumen liquor in an artificial rumen. II. The volatile fatty acid production from dried grass. *Journal of Agricultural Science* 49:171-179. 1957.
7. BARNETT, A. J. G. and R. L. REID. Studies on the production of volatile fatty acids from grass by rumen liquor in an artificial rumen. III. A note on the volatile fatty acid production from crude fiber and grass cellulose. *Journal of Agricultural Science* 49:180. 1957.
8. BARNETT, A. J. G. Studies on the digestibility of the cellulose fraction of grassland products. Part I. The relation between the digestibility of silage cellulose as determined *in vitro* and silage crude fiber digestibility by feeding trial. *Journal of Agricultural Science* 49:467-474. 1957.
9. BAUMGARDT, B. R., J. L. CASON and M. W. TAYLOR. Evaluation of forages in the laboratory. I. Comparative accuracy of several methods. *Journal of Dairy Science* 45:59-61. 1962.
10. BELASCO, J., F. GRIBBONS and D. W. KOLTERMAN. The response of rumen microorganisms to pasture grasses and prickly pear cactus following foliar application of urea. *Journal of Animal Science* 17:209-217. 1958.
11. BELL, D. J. Mono- and oligosaccharides and acidic monosaccharide derivatives. En Paech, K. and M. V. Tracey, editores. *Modern methods of plant analysis*. Vol. 2. pp. 1-54. Springer-Verlag, Berlin. 1955.
12. BENTLEY, O. G. A comparison of artificial rumen techniques. Oklahoma Conference. Radioisotopes in Agriculture. Report TID- 7578, p. 181. 1959
13. BONDI, A. and H. TAGARI. Water soluble forage constituents and their influence on the metabolic activity of the rumen. *Research Council of Israel Bulletin, Sec. A*, 9:143-148. 1960.
14. BRISSON, G. J. Indicator methods for estimating amount of forage consumed by grazing animals. *International Grassland Congress Proceedings* 8:435-438. 1960.
15. BURROUGHS, W., A. LATONA, P. DE PAUL, P. GERLAUGH and R. M. BETHKE. Mineral influences upon urea utilization and cellulose digestion by rumen microorganisms using the artificial rumen technique. *Journal of Animal Science* 10:693-705. 1951.
16. BURROUGHS, W., C. ARIAS, P. DE PAUL, P. GERLAUGH and R. M. BETHKE. *In vitro* observations upon the nature of protein influences upon urea utilization by rumen microorganisms. *Journal of Animal Science* 10:672-682. 1951.
17. BURROUGHS, W., G. HEADLEY, R. M. BETHKE and P. GERLAUGH. Cellulose digestion in good and poor quality roughages using an artificial rumen. *Journal of Animal Science* 9: 513-522. 1950.
18. BURROUGHS, W., N. A. FRANK, P. GERLAUGH and R. M. BETHKE. Preliminary observations upon factors influencing cellulose digestion by rumen microorganisms. *Journal of Nutrition* 40: 9-24. 1950.
19. CIPOLLONI, MARY ANN, B. H. SCHNEIDER, H. L. LUCAS and HELEN M. PAVLECH. Significance of the differences in digestibility of feeds by cattle and sheep. *Journal of Animal Science* 10: 337-343. 1951.
20. COOK, C. W., J. L. THORNE, J. T. BLAKE and J. EDLEFSEN. Use of an esophageal-fistula cannula for collecting forage samples by grazing sheep. *Journal of Animal Science* 17: 189-193. 1958.
21. CORBETT, J. L. Faecal-index techniques for estimating herbage consumption by grazing animals. *International Grassland Congress Proceedings* 8: 438-442. 1960.
22. CRAMPTON, E. W. and L. A. MAYNARD. The relation of cellulose and lignin content to nutritive value of animal feeds. *Journal of Nutrition* 15: 383-395. 1938.

23. CRAMPTON, E. W., E. DONEFER and L. E. LLOYD. A nutritive value index for forages. *Journal of Animal Science* 19: 538-544. 1960.
24. CRAMPTON, E. W. Interrelationships between digestible nutrient and energy content, voluntary dry matter intake and the overall feeding value of forages. *Journal of Animal Science* 16: 546-552. 1957.
25. DAVEY, L. A., G. C. CHEESEMAN and C. A. E. BRIGGS. Evaluation of an improved artificial rumen designed for continuous control during prolonged operation. *Journal of Agricultural Science* 55: 155-160. 1960.
26. DERIAZ, R. E. Routine analysis of carbohydrates and lignin in herbage. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 12: 152-160. 1961.
27. DRUCE, E. and J. S. WILLCOX. The determination of cellulose in nutritional studies. I. A new method for the determination of cellulose. *Journal of Agricultural Science* 39: 145-152. 1949.
28. DRUCE, E. and J. S. WILLCOX. The determination of cellulose in nutritional studies. II. A comparison of the applicability of three methods for the determination of cellulose. *Journal of Agricultural Science* 39: 153-155. 1949.
29. ELLIS, G., G. MATRONE and L. A. MAYNARD. A 72 percent H₂SO₄ method for the determination of lignin and its use in animal nutrition studies. *Journal of Animal Science* 5: 285-290. 1946.
30. EL-SHAZLY, K., B. A. DEHORITY and R. R. JOHNSON. Effect of Starch on the digestion of cellulose *in vitro* and *in vivo* by rumen microorganisms. *Journal of Animal Science* 20: 268-273. 1961.
31. GAILLARD, BLANCHE D. E. A detailed summative analysis of the crude fibre and nitrogen-free extractives fractions of roughages. I. Proposed scheme of analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 9: 170-177. 1958.
32. GAILLARD, BLANCHE D. E. A detailed summative analysis of the crude fibre and nitrogen-free extractive fraction of roughages. II. The analysis of straw, hay, grass and mangold. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 9: 346-353. 1958.
33. HARWOOD, V. D. Analytical studies on the carbohydrates of grasses and clovers. V. Development of a method for the estimation of cell-wall polysaccharides. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 5: 270-275. 1954.
34. HANSEN, R. G., R. M. FORBES and D. M. CARLSON. A review of the carbohydrates constituents of roughages. *Illinois Agricultural Experiment Station Bulletin* 634. 1958.
35. HARRIS, L. E., C. W. COOK and J. E. BUTCHER. Symposium on forage utilization: V. Intake and digestibility techniques and supplemental feeding in range forage evaluation. *Agronomy Journal* 51: 226-234. 1959.
36. HOPSON, J. D., R. R. JOHNSON and B. A. DEHORITY. Evaluation of the dacron bag technique as a method for measuring cellulose digestibility and rate of forage digestion. *Journal of Animal Science* 22: 448-453. 1963.
37. JOHNSON, RONALD R. Symposium on microbial digestion in ruminants: *in vitro* rumen fermentation techniques. *Journal of Animal Science* 22: 792-800. 1963.
38. JONES, L. I. Measurement of palatability. *International Grassland Congress Proceedings* 6:1348. 1952.
39. JORDAN, R. M. and G. E. STAPLES. Digestibility comparisons between steers and lambs fed prairie hays of different quality. *Journal of Animal Science* 10: 236-243. 1951.
40. KENNEDY, W. K. Chemical composition of pasture herbage. En Mott, G. O., H. L. Lucas, W. K. Kennedy, J. T. Reid, M. L. Peterson and D. E. McCloud, editores. *Pasture and range research techniques*, pp. 59-65. Cornell University Press, Ithaca, New York. 1962.
41. LAIDLAW, R. A. and S. G. REID. Analytical studies on the carbohydrates of grasses and clovers. I. Development of methods for the estimation of the free sugar and fructosan contents. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 3: 19-25. 1952.
42. LAIDLAW, R. A. and S. G. REID. Filter-paper chromatography: extraction of sugars from the paper at room temperature. *Nature* 166: 476-477. 1950.
43. LANCASTER, R. J. The measurement of feed intake by grazing cattle and sheep. Part I. A method of calculating the digestibility of pastures based on the nitrogen content of feces derived from the pasture. *New Zealand Journal of Science and Technology, Sec. A*, 31: 31-38. 1949.
44. MARSTON, H. R. The fermentation of cellulose *in vitro* by organisms from the rumen of the sheep. *Biochemical Journal* 42: 564-1948.
45. MATRONE, G., G. H. ELLIS and L. A. MAYNARD. A modified Norman-Jenkins method for the determination of cellulose and its use in the evaluation of feedingstuffs. *Journal of Animal Science* 5: 306-312. 1947.
46. MAYNARD, L. A. and J. K. LOOSLI. *Animal Nutrition*. 5^a Edición. McGraw-Hill Book Company, Inc. New York. 1962.

47. McDOUGALL, E. I. Studies on ruminant saliva. I. The composition and output of sheep's saliva. *Biochemical Journal* 43: 99-109. 1948.
48. MILLER, T. B. Recent advances in studies of the chemical composition and digestibility of herbage. *Herbage Abstracts* 31: 81-84. 1961.
49. MINSON, D. J. Methods of assessing herbage feeding value. *New Zealand Society of Animal Production Proceedings* 23:63-78. 1963.
50. MORRISON, F. B. Feeds and feeding, 22a. Edición. The Morrison Publishing Company, Clinton, Iowa. 1956.
51. MOTT, G. O. Evaluating forage production. En Hughes, H. D., M. E. Heath and D. S. Metcalfe, editores. *Forages*. pp. 108-118. The Iowa State University Press, Ames, Iowa. 1962.
52. NORDFELT, S., O. SVANBERG and O. CLAESSON. Studies regarding the analysis of crude fibre. *Acta Agriculture Suecana* 3: 135-177. 1946.
53. NORMAN, A. G. and S. H. JENKINS. A new method for the determination of cellulose based upon observations on the removal of lignin and other encrusting materials. *Biochemical Journal* 27: 818-831. 1933.
54. PALOHEIMO, LAURI. Some persistent misconceptions concerning the crude fibre and the nitrogen-free extract. *Maataloustieteellinen Aikakauskirja: the Journal of the Scientific Agricultural Society of Finland* 25: 16-22. 1953.
55. PALOHEIMO, LAURI. Food analysis and the evaluation of foods. *Nordisk Jordbrugsforskning* 44: 78-86. 1962.
56. PALOHEIMO, L., K. A. VAINIO, M. L. KERO and EINE HERKOLA. Analysis of plant products in greater detail. *Maataloustieteellinen Aikakauskirja: the Journal of the Scientific Agricultural Society of Finland* 33: 51-56. 1961.
57. PALOHEIMO, L. and I. PALOHEIMO. On the estimation of the total of vegetable membrane substance. *Maataloustieteellinen Aikakauskirja: the Journal of the Scientific Agricultural Society of Finland* 21: 1-16. 1949.
58. PEARSON, R. M. and J. A. B. SMITH. The utilization of urea in the bovine rumen. III. The synthesis and breakdown of protein in rumen ingesta. *Biochemical Journal* 37: 153-154. 1943.
59. PERCIVAL, E. G. V. The carbohydrates constituents of herbage. *British Journal of Nutrition* 6: 104-110. 1952.
60. PFANDER, W. H., R. W. KELLEY, C. W. GERHKE and D. T. LYONS. Cellulose analysis for digestion trials. Effect of two cellulose methods on cellulose content of feed and feces and the coefficients of digestibility of cellulose. *Missouri Agricultural Experiment Station Research Bulletin* 761. 1960.
61. PHILLIPSON, A. T. The role of the microflora of the alimentary tract of herbivora with especial reference to ruminants. II. Fermentation in the alimentary tract and the metabolism of the derived fatty acids. *Nutrition Abstracts and Reviews* 17: 12-17. 1947.
62. PHILLIPS, T. G., J. T. SULLIVAN, M. E. LOUGHLIN and V. G. SPRAGUE. Chemical composition of some forage grasses. I. Changes with plant maturity *Agronomy Journal* 46: 361-369. 1954.
63. QUICKE, G. V., O. G. BENTLEY, H. W. SCOTT and A. L. MOXON. Cellulose digestion *in vitro* as a measure of the digestibility of forage cellulose in ruminants. *Journal of Animal Science* 18: 275. 1959.
64. RAYMOND, W. F., C. E. HARRIS and V. G. HARKER. Studies on the digestibility of herbage. I. Technique of measurement of digestibility and some observations affecting the accuracy of digestibility data. *British Grassland Society Journal* 8: 301-314. 1953.
65. RAYMOND, W. F., C. E. HARRIS and C. D. KEMP. Studies on the digestibility of herbage. V. The effect of level of herbage intake on the digestibility of herbage by sheep. *British Grassland Society Journal* 10: 19-26. 1955.
66. RAYMOND, W. F. Evaluation of herbage for grazing. *Nature (London)* 16: 937-938. 1948.
67. RAYMOND, W. F. The nutritive value of herbage. *University of Nottingham, Easter School Proceedings* 6: 156-164. 1959.
68. REID, J. T., P. G. WOOLFOLK, C. R. RICHARDS, R. W. KAUFMAN, J. K. LOOSLI, K. L. TURK, J. I. MILLER and R. E. BLASER. A New indicator method for the determination of digestibility and consumption of forages by ruminants. *Journal of Dairy Science* 33: 60-71. 1950.
69. REID, J. T., P. G. WOOLFOLK, W. A. HARDISON, C. M. MARTIN, A. L. BRUNDAGE and R. W. KAUFMAN. A procedure for measuring the digestibility of pasture forage under grazing conditions. *Journal of Nutrition* 46: 255-269. 1952.
70. REID, J. T., W. K. KENNEDY, K. L. TURK, S. T. SLACK, G. W. TRIMBERGER and R. P. MURPHY. Effect of growth stage, chemical composition and physical properties upon the nutritive value of forages. *Journal of Dairy Science* 42: 567-571. 1959.

71. SCHNEIDER, B. H. Feeds of the world; their digestibility and composition. West Virginia Agricultural Experiment Station Bulletin, 1947.
72. SCHNEIDER, B. H. and H. L. LUCAS. The magnitude of certain gross sources of variability. *Journal of Animal Science* 9: 504-509. 1950.
73. SHELTON, D. C. and R. L. REID. Measuring the nutritive value of forages using *in vitro* rumen techniques. *International Grassland Congress Proceedings* 8: 524-528. 1960.
74. SOSULSKY, F. W. and J. K. PATTERSON. Correlations between digestibility and chemical constituents of selected grass varieties. *Agronomy Journal* 53: 145-149. 1961.
75. STAPLES, G. E. and W. E. DINUSSON. A comparison of the relative accuracy between seven-day and ten-day collection periods in digestion trials. *Journal of Animal Science* 10: 244-250. 1951
76. SULLIVAN, J. T. Evaluation of forage crops by chemical analysis. A critique. *Agronomy Journal* 54: 511-515. 1962.
77. TRILLEY, J. M. A. and R. A. TERRY. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *British Grassland Society Journal* 18: 104-111. 1963.
78. TRILLEY, J. M. A., R. E. DERIAZ and R. A. TERRY. The *in vitro* measurement of herbage digestibility and assessment of nutritive value. *International Grassland Congress Proceedings* 8: 533-537. 1960.
79. TORREL, D. T. An esophageal fistula for animal nutrition studies. *Journal of Animal Science* 13: 878-884. 1954.
80. VALENTINE, J. E. Use of indicator methods in range digestion trials. A review. *Journal of Range Management* 9: 235-239. 1956.
81. VAN SOEST, P. J. Symposium on nutrition and forage and pastures: new chemical procedures for evaluating forages. *Journal of Animal Science* 23: 833-845. 1964.
82. VAN SOEST, P. J. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. I. Preparation of fiber residues of low nitrogen content. *Association of Official Agricultural Chemists Journal* 46: 825-829. 1963.
83. VAN SOEST, P. J. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *Association of Official Agricultural Chemists Journal* 46: 829-835. 1963.
84. WAITE, R. and A. R. N. GORROD. The comprehensive analysis of grasses. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 10: 317-326. 1959.
85. WAITE, R. and J. BOYD. The water-soluble carbohydrates of grasses. I. Changes occurring during the normal life-cycle. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 4: 197-204. 1953.
86. WARNER, A. C. I. Criteria for establishing the validity of *in vitro* studies with rumen microorganisms in so-called artificial rumen systems. *Journal of General Microbiology* 14: 733-748. 1956.
87. WITTKE, E. G. Uso del nitrógeno y cromógenos como índices fecales en combinación con el óxido de cromo, para determinar el valor nutritivo de praderas en condiciones de pastoreo. Tesis Magister Scientiae, no publicada. Biblioteca, Instituto Alberto Boerger, La Estanzuela, Colonia, Uruguay. 1965.
88. WOOLFOLK, P. G. Development and evaluation of the cromogen method for determining digestibility and consumption of feeds by ruminants. Tesis Doctor of Philosophy, no publicada. Biblioteca, Cornell University, Ithaca, New York. 1950.
89. YOUNG, P. T. Psychologic factors regulating the feeding process. *American Journal of Clinical Nutrition* 5: 154-161. 1957.