

CONOCIMIENTOS Y CRITERIOS PARA LA EVALUACION DE LA CALIDAD Y CONCENTRACION ENERGETICA DE LOS FORRAJES ENSILADOS

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires, Área Ciencias Agropecuarias

Marisa Wawrzkievicz
Ingeniera Agrónoma - UBA - 1995

Lugar de trabajo: Cát. Nutrición Animal – Dpto. Producción Animal - FAUBA



FAUBA

Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis
Juan José Grigera Naón
Ingeniero Agrónomo (UNINCEN)
Doctor (UBA)

Consejero de Estudios
José Luis Danelón
Ingeniero Agrónomo (UNR)
Magister Scientiae (Wisconsin)

JURADO DE TESIS

Director de tesis
Juan José Grigera Naón
Ingeniero Agrónomo (UNINCEN)
Doctor (UBA)

JURADO
Francisco José Santini
Ingeniero Agrónomo (UNMDP)
M.Sci., Ph.D (Wisconsin)

JURADO
José Ignacio Arroquy
Ingeniero Agrónomo (UNS)
M.Sci., Ph.D (UNS y Kansas)

JURADO
Hugo Mario Arelovich
Ingeniero Agrónomo (UNS)
M.Sci., Ph.D (Oklahoma)

Fecha de defensa de la tesis: 23 de Noviembre de 2010

Dedicatoria

A mi mamá

Agradecimientos

En esta instancia quiero recordar que Gustavo y José fueron quienes me convocaron para trabajar junto a ellos en la cátedra y así, me guiaron en el comienzo del camino de la investigación en el área de nutrición animal. Es por ellos, que me brindaron el espacio no solo físico sino intelectual, que surgió este trabajo.

A los Ing. Agr. Juan José Grigera Naón y José Luis Danelón quienes apuntalaron mi trabajo y brindaron valiosas opiniones y sugerencias que me permitieron llegar al final de la tarea.

A la Cátedra de Nutrición Animal de la FAUBA que me brindó las instalaciones e infraestructura donde pude desarrollar todos los trabajos que fueron necesarios. Así como también el financiamiento del proyecto provisto por la misma cátedra, la Fundación Mosoteguy y la Universidad de Buenos Aires.

A lo largo de mi etapa de experimentación compartí muchos momentos de reflexión y esparcimiento, trabajo, oficina, laboratorio, galpón y mates con Diego, Alejandro, Gustavo, Romina, Pedro, Patricia y Paola a quienes les estoy infinitamente agradecida por la ayuda y el apoyo.

Los trabajos, las charlas, risas y bizcochitos que compartimos durante estos años sellaron esta amistad que me permite contar con tu ayuda permanente, gracias Ale!

La mención especial y eterno agradecimiento es para Diego que fue quien no solo me acompañó físicamente durante este trabajo, sino que fue y es mi pareja incondicional en todos los aspectos de la vida; también como mi cable a tierra que siempre está a mi lado iluminando el camino mientras lo transitamos juntos y ordena las piezas cuando parece que todo esta al revés.

Finalmente le doy las gracias a mi mamá Norma que siempre me apoyó e impulsó a continuar tanto en el trabajo como en la vida marcando los pasos.

Índice general

<i>Dedicatoria</i>	III
<i>Agradecimientos</i>	IV
Índice general.....	V
Índice de cuadros	VII
Índice de figuras	X
Declaración	XII
Abreviaturas	XIII
Resumen.....	XVI
Abstract	XVIII
Capítulo 1.....	1
Estado actual del conocimiento de la evaluación de los forrajes ensilados.....	1
1.1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.2. EVALUACIÓN DE FORRAJES ENSILADOS. LA PROBLEMÁTICA	5
1.3. HIPÓTESIS	8
1.4. OBJETIVOS	9
Capítulo 2.....	10
Efecto del procesamiento de ensilajes de maíz y pastura sobre la desaparición de sustrato y cinética de producción de gas <i>in vitro</i>	10
2.1. RESUMEN	10
2.2. INTRODUCCIÓN	12
2.3. MATERIALES Y MÉTODOS	15
2.3.1. <i>Forrajes experimentales</i>	15
2.3.2. <i>Experimento 1</i>	16
2.3.3. <i>Experimento 2</i>	17
2.3.4. <i>Incubación in vitro</i>	17
2.3.5. <i>Análisis químicos</i>	19
2.3.6. <i>Análisis estadístico</i>	19
2.4. RESULTADOS.....	21
2.4.1. <i>Composición de los forrajes ensilados</i>	21
2.4.2. <i>Experimento 1</i>	22
2.4.3. <i>Experimento 2</i>	29
2.5. DISCUSIÓN	36
2.6. CONCLUSIÓN	45
Capítulo 3.....	46

Contribución de los residuos insolubles en agua y detergente neutro a la desaparición <i>in vitro</i> de los forrajes ensilados	46
3.1. RESUMEN	46
3.2. INTRODUCCIÓN	47
3.3. MATERIALES Y MÉTODOS	52
3.3.1. <i>Forraje ensilado y sustrato incubado</i>	52
3.3.2. <i>Incubación in vitro</i>	53
3.3.3. <i>Análisis químicos</i>	55
3.3.4. <i>Análisis estadístico</i>	56
3.4. RESULTADOS	57
3.5. DISCUSIÓN	77
3.6. CONCLUSIÓN	91
Capítulo 4.....	92
Estimación del valor energético de los forrajes ensilados evaluados <i>in vitro</i>	92
4.1. RESUMEN	92
4.2. INTRODUCCIÓN	94
4.3. MATERIALES Y MÉTODOS	99
4.3.1. <i>Forraje ensilado</i>	99
4.3.2. <i>Experiencia in vivo</i>	99
4.3.3. <i>Producción de gas in vitro</i>	101
4.3.4. <i>Análisis de laboratorio</i>	101
4.3.5. <i>Análisis estadístico</i>	102
4.4. RESULTADOS	104
4.5. DISCUSIÓN	125
4.6. CONCLUSIÓN	135
Capítulo 5.....	137
Conclusiones generales	137
Bibliografía	142

Índice de cuadros

Cuadro 2.1	Composición química de los forrajes ensilados (g/kg MS, excepto la materia seca, g/kg MH).....	22
Cuadro 2.2	Caracterización de los tratamientos del experimento 1 para cada tipo de forraje ensilado según la distribución del tamaño de partícula (% p/p).....	23
Cuadro 2.3	Producción de gas acumulada a las 12, 24, 48 y 72 horas (PGA 12, PGA 24, PGA 48 y PGA 72, respectivamente; ml/g MS) durante la incubación <i>in vitro</i> de ensilaje de gramíneas con grano y pasturas base leguminosas (SGgr y SL) frescas y con distinto tamaño de partícula.....	24
Cuadro 2.4	Tasa horaria máxima de producción de gas <i>in vitro</i> (Tmax; ml/g MS.h ⁻¹) y tiempo de ocurrencia de Tmax (TTmax; h) de forraje ensilado fresco con diferente tamaño de partícula.....	25
Cuadro 2.5	Parámetros <i>a</i> , <i>b</i> y <i>c</i> del modelo exponencial que describe la cinética de producción de gas (PG) <i>in vitro</i> (Ørskov y McDonald, 1979) y tiempo de retardo hasta el comienzo de la misma (Lag, h).....	27
Cuadro 2.6	Desaparición de la materia seca (MSD), aFDN _{mo} (FDND) y FDA _{mo} (FDAD) a las 72 horas de incubación (g/kg MS, FDN ó FDA según corresponda).	28
Cuadro 2.7	Producción de gas acumulada a las 12, 24, 48 y 72 horas (PGA; ml/g MS) durante la incubación <i>in vitro</i> de muestras secas y frescas de forrajes ensilados de gramíneas con grano y pasturas base leguminosas.....	30
Cuadro 2.8	Tasa horaria máxima de producción de gas <i>in vitro</i> (Tmax; ml/g MS.h ⁻¹) y tiempo de ocurrencia de Tmax (TTmax; h) de sustrato seco y fresco (S y F) de forrajes ensilados.....	31
Cuadro 2.9	Parámetros <i>a</i> , <i>b</i> y <i>c</i> del modelo exponencial que describe la cinética de producción de gas (PG) <i>in vitro</i> (Ørskov y McDonald, 1979) y tiempo de retardo hasta el comienzo de la misma (Lag, h) del Experimento 2.....	32
Cuadro 2.10	Desaparición de la materia seca (MSD), aFDN _{mo} (FDND) y FDA _{mo} (FDAD) a las 72 horas de incubación (g/kg MS, FDN ó FDA según corresponda) durante la incubación <i>in vitro</i> de muestras secas y frescas de forrajes ensilados de gramíneas con grano y pasturas base leguminosas.....	33
Cuadro 2.11	Composición de ácidos grasos volátiles (AGV) producidos durante la incubación <i>in vitro</i> a 72 h de sustrato fresco y seco de ensilajes de gramínea con grano y en base a alfalfa.	35
Cuadro 3.1	Perfil fermentativo de los forrajes ensilados (g/kg MS) continuación del Cuadro 2.1.	58
Cuadro 3.2	Concentración (g/kg MS) de las fracciones analíticas de fibra y almidón de los sustratos completos y los residuos insolubles en agua y detergente neutro (RIA y RIDN, respectivamente) según el tipo de forraje ensilado.....	59
Cuadro 3.3	Desaparición de materia seca, fibra insoluble en detergente neutro y ácido y hemicelulosa (FDND, FDAD y HemiD; g/kg MS, FDN, FDA y Hemi, respectivamente) y MSD es base al sustrato completo (MSDc; g/kg MS) de los sustratos completos, residuos del lavado con agua y detergente neutro (C, RIA y RIDN) para los ensilajes de gramíneas con grano y pastura base leguminosas (SGgr y SL).....	61
Cuadro 3.4	Producción de gas acumulada a las 6, 12, 24, 48 y 72 horas de incubación <i>in vitro</i> (PGA 6, 12, 24, 48 y 72; ml/g MS de sustrato incubado) de los	

sustratos completo y residuos del lavado con agua y detergente neutro (C, RIA y RIDN, respectivamente).	63
Cuadro 3.5 Parámetros A, B, Q y Z modelo que describe la cinética de producción de gas (PG) <i>in vitro</i> (France y otros, 1993) de los sustratos completos, residuos del lavado con agua y detergente neutro (Completo, RIA y RIDN, respectivamente)...	65
Cuadro 3.6 Variables derivadas de los parámetros del modelo de France y otros (1993) de los sustratos completos, residuos del lavado con agua y detergente neutro (C, RIA y RIDN, respectivamente).	66
Cuadro 3.7 Tasa máxima de producción de gas (Tmax; ml/g MS.h) y tiempo de ocurrencia de Tmax (TTmax; h) de los sustratos completos, residuos del lavado con agua y detergente neutro (Completo, RIA y RIDN, respectivamente) para los ensilados de gramínea con grano y pastura en base alfalfa.....	68
Cuadro 3.8 Composición de ácidos grasos volátiles producidos hasta 72 horas de incubación <i>in vitro</i> de los sustratos completo y residuos del lavado con agua y detergente neutro (C, RIA y RIDN, respectivamente).	70
Cuadro 3.9 Coeficiente de correlación entre las desapariciones de sustrato del forraje ensilado completo y residuos en base al sustrato completo o al residuo.	73
Cuadro 3.10 Coeficiente de correlación entre las desapariciones de sustrato, variables de cinética de producción de gas (PG) y perfil fermentativo (PF) del forraje ensilado de gramíneas con grano (SGgr) completo con los residuos insolubles en agua y detergente neutro (RIA y RIDN).	74
Cuadro 3.11 Coeficiente de correlación entre las desapariciones de sustrato, variables de cinética de producción de gas (PG) y perfil fermentativo (PF) del forraje ensilado de pastura base leguminosas (SL) completo con los residuos insolubles en agua y detergente neutro (RIA y RIDN).	75
Cuadro 4.1 Composición química de los forrajes ensilados utilizados en el experimento <i>in vivo</i> (g/kg MS, excepto la materia seca, g/kg MH).	105
Cuadro 4.2 Digestibilidad <i>in vivo</i> de la materia seca y orgánica, fibra insoluble en detergente neutro y ácido, hemicelulosa y celulosa (DMS, DMO, DFDN, DFDA, DHemi y DCel; g/kg MS).....	106
Cuadro 4.3 Digestibilidad de la energía <i>in vivo</i> y concentración de energía digestible y metabolizable (Denerg, kcal/Mcal; ED y EM; Mcal/kg MS).	108
Cuadro 4.4 Análisis de colinearidad de las variables propuestas para estimar la DMS, DFDN y EM <i>in vivo</i> (g/kg MS, g/kg FDN y Mcal/kg MS) de forrajes ensilados de planta entera de maíz y pastura base leguminosas, a partir de variables derivadas de la composición química (Modelo 1) o de la producción de gas <i>in vitro</i> del forraje completo (Modelo 2, 3 y4).	112
Cuadro 4.5 Análisis de colinearidad de las variables propuestas para estimar la DMS, DFDN y EM <i>in vivo</i> (g/kg MS, g/kg FDN y Mcal/kg MS) de forrajes ensilados de gramínea con grano y pastura base leguminosas a partir de variables derivadas de la producción de gas <i>in vitro</i> del residuo insoluble en agua (Modelo 5 y 6) y en detergente neutro (Modelo 7 y 8).	113
Cuadro 4.6 Resultados de la selección de modelos para estimar la DMS, DFDN y EM (g/kg MS ó FDN; Mcal/kg MS) de forrajes ensilados de gramíneas con grano y de pastura base leguminosas a partir de la composición química (Modelo 1).	115
Cuadro 4.7 Resultados de la selección de modelos para estimar la DMS, DFDN y EM (g/kg MS ó FDN; Mcal/kg MS) de forrajes ensilados de gramínea con granos y de pastura base leguminosas a partir de la producción de gas <i>in vitro</i> del forraje completo (Modelo 4).	116

Cuadro 4.8	Resultados de la selección de modelos para estimar la DMS, DFDN y EM (g/kg MS ó FDN; Mcal/kg MS) de forrajes ensilados de gramíneas con grano y de pastura base leguminosas a partir de la producción de gas <i>in vitro</i> del residuo insoluble en agua (Modelo 5 y 6).	117
Cuadro 4.9	Resultados de la selección de modelos para estimar la DMS, DFDN y EM (g/kg MS ó FDN; Mcal/kg MS) de forrajes ensilados de gramíneas con grano y de pastura base leguminosas a partir de la producción de gas <i>in vitro</i> del residuo insoluble en detergente neutro (Modelo 7 y 8).	119
Cuadro 4.10	Análisis de colinearidad de las variables propuestas para estimar la DMS, DFDN y EM <i>in vivo</i> (g/kg MS, g/kg FDN y Mcal/kg MS) de forrajes ensilados de gramíneas con grano y pastura base leguminosas a partir de variables derivadas de la producción de gas <i>in vitro</i> del forraje completo, residuo insoluble en agua y en detergente neutro (C; RIA; RIDN) (Modelo 9) y adicionalmente fracción analítica (FA) (Modelo 10).	120
Cuadro 4.11	Resultados de la selección de modelos para estimar la DMS, DFDN y EM (g/kg MS ó FDN; Mcal/kg MS) de forrajes ensilados de gramíneas con grano y de pastura base leguminosas a partir de la producción de gas <i>in vitro</i> del forraje completo y de los residuos insolubles en agua y detergente neutro (C, RIA, RIDN) (Modelo 9). 121	
Cuadro 4.12	Modelos para estimar DMS, DFDN y EM (g/kg MS ó FDN; Mcal/kg MS) de ensilajes a partir de variables derivadas de la producción de gas <i>in vitro</i> del forraje completo y los residuos insolubles en agua y detergente neutro (C, RIA, RIDN) y de la fracción analítica (FA) (Modelo 10).	122
Cuadro 4.13	Ecuaciones de predicción de digestibilidad de la materia seca, orgánica y fibra insoluble en detergente neutro (DMS, DMO y DFDN) y contenido de energía metabolizable (EM) para forrajes ensilados publicadas por diversos autores.	127
Cuadro 4.14	Ecuaciones de transformación de los valores predichos por las ecuaciones de la bibliografía (x) a los observados <i>in vivo</i> (y) (n=18).	133
Cuadro 4.15	Ecuaciones de predicción desarrolladas en el presente trabajo.	135

Índice de figuras

- Figura 2.1** Relación entre los coeficientes de variación de los ensilajes enteros y molidos (E y M, respectivamente; n = 18) de la materia seca y fibra en detergente neutro desaparecidas (A: MSD; B: FDND)..... 37
- Figura 2.2** Relación entre la producción de gas acumulada a las 12 y 24 h de incubación (PGA 12; ml/g MS), tasa y tasa máxima de PG (c y Tmax; ml/g MS.h⁻¹) y la cantidad de materia seca con partículas menores a 1.19 mm en forrajes ensilados con grano y pasturas a base de leguminosas (♦, SGgr; □ SL, respectivamente)... 38
- Figura 2.3** Tasas horarias de producción de gas (ml/h) en función del tiempo de ensilaje de gramíneas con grano y pasturas base leguminosas (SGgr y SL) para sustrato fresco (□ F) y seco en estufa (—♦— S)..... 41
- Figura 2.4** Producción de gas acumulada (PGA) estimada por el modelo de Ørskov y McDonald (1979) en función del tiempo de incubación *in vitro* para forrajes ensilados de gramíneas con grano y pasturas base leguminosas con sustrato fresco y seco (SGgr y SL; F y S). 42
- Figura 2.5** Relación entre producción de gas acumulada a las 72 horas de incubación (PGA 72 h, ml/g MS) y la materia seca desaparecida (MSD, g/kg MS) de sustrato seco y fresco (S y F, respectivamente) de forrajes ensilados. 43
- Figura 3.1** Relación entre la producción de gas acumulada a la hora 1 (PGA 1) de incubación *in vitro* y la acidez total (AT) del forraje ensilado (n=18)..... 67
- Figura 3.2** Relación entre las desapariciones de FDN, FDA y Hemicelulosa (FDND, FDAD y HemiD) en el sustrato completo y los residuos en agua y detergente neutro (C, RIA y RIDN) del ensilaje de gramíneas con grano y pastura base leguminosas (SGgr ■; SL ▲). 80
- Figura 3.3** Relación entre la materia seca desaparecida de la diferencia entre el residuo insoluble en agua y en detergente neutro expresado en base completa en función de la concentración de almidón del forraje ensilado de gramíneas con grano y pastura en base leguminosas (SGgr y SL)..... 83
- Figura 3.4** Contribución de los residuos insolubles en agua y detergente neutro en base al sustrato completo (RIAc y RIDNc) a la materia seca desaparecida y la producción de gas acumulada a las 72 horas de incubación *in vitro* (MSDc y PGA72) para los forraje ensilados de gramíneas con grano y pasturas base leguminosas (SGgr y SL)..... 85
- Figura 3.5** Tasas horarias de producción de gas (ml/g MS.h⁻¹) en función del tiempo de incubación *in vitro* de sustrato completo, residuo insoluble en agua y en detergente neutro (C, ♦; RIAc, Δ; RIDNc, □ respectivamente) para ensilajes de gramíneas con grano (SGgr – A) y pasturas en base leguminosas (SL – B). Las barras verticales corresponden al error estándar de la media. 87
- Figura 3.6** Tasas horarias de producción de gas (PG) en función del tiempo de incubación *in vitro* de la fracción soluble en agua (◇, SAc), soluble en detergente neutro menos SA (■, (SDN-SA)c) y residuo insoluble en detergente neutro (▲, RIDNc) para forraje ensilado de gramíneas con grano (A) y pasturas base alfalfa (B). 88
- Figura 3.7** Origen del gas producido durante la incubación *in vitro* clasificado en dióxido de carbono directo de la fermentación e indirecto del buffer y metano de la fermentación (CO_{2ferm}, CO_{2buff} y CH_{4ferm}) del sustrato completo y residuos del lavado con agua y detergente neutro (C, RIAc y RIDNc) para ensilajes de gramínea con

- grano (A) y pasturas base leguminosas (B). Letras diferentes para la misma leyenda en cada gráfico indican diferencias significativas ($\alpha = 0.05$). 90
- Figura 4.1** Relación entre el nivel de lignificación de la fibra insoluble en detergente neutro (Lig/FDN) y la digestibilidad de la hemicelulosa *in vitro* (DHemi; g/kg Hemi) en forrajes ensilados de gramíneas con grano (♦) y pasturas base leguminosas (□). 107
- Figura 4.2** Relación entre la digestibilidad de la celulosa *in vivo* (DCel; g/kg Cel) y el contenido de almidón de los ensilajes con más (♦; n=10) y menos (□; n=8) de 100 g/kg MS. 107
- Figura 4.3** Relación entre la digestibilidad *in vivo* de la materia seca y orgánica (♦, DMS y Δ, DMO; g/kg) con la digestibilidad de la energía (DE; kcal/Mcal). 109
- Figura 4.4** Relación entre la digestibilidad *in vivo* y la desaparición *in vitro* de la materia seca y la fibra insoluble en detergente neutro con sustrato incubado en seco y fresco (DMS y DFDN *in vivo*; **A**, sustrato fresco MSD y DFDN *fresco*; **B**, sustrato seco MSD y DFDN *seco*) de forrajes ensilados de gramíneas con grano (Δ) y pasturas en base leguminosas (■). 110
- Figura 4.5** Relación entre la desaparición de materia seca *in vitro* a 72 h de incubación (MSD_{*in vitro*}; ml/g MS) y la energía metabolizable *in vivo* (EM_{*in vivo*}; Mcal/kg MS) para forrajes ensilados. 111
- Figura 4.6** Relación entre la materia seca desaparecida (MSD) y la producción de gas acumulada a las 72 horas (PGA) para ensilajes de gramínea con grano (SGgr; ■) y pasturas base leguminosas (SL; Δ) incubadas en fresco en **A** y para los residuos insolubles en agua y detergente neutro de todos los ensilajes en **B** (□). 131
- Figura 4.7** Relación entre el contenido de energía metabolizable (EM) y la digestibilidad de la materia seca y orgánica *in vivo* (DMS, **A** y DMO, **B**) de forrajes ensilados con más (♦, n=10) y menos (□, n=8) de 100 g de almidón /kg MS o todos los datos (x, n=18). 133

Declaración

“Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original, producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución”

Abreviaturas

Ac	Ácido acético
Ac/Pro	Relación molar acético/propiónico
Alm	Almidón
${}_a\text{FDN}_{\text{mo}}$	Fibra insoluble en detergente neutro con α -amilasa y libre de cenizas
AGV	Acidos grasos volátiles
AT	Acidez total
But	Ácido butírico
C	Sustrato completo
CC	Contenido celular
CE	Carbohidratos estructurales
Cen	Cenizas
CHO	Carbohidratos
CHO_s	Carbohidratos solubles
CIEV	Criterio de inclusión y exclusión de variables
CL	Cuadrado latino
CNE	Carbohidratos no estructurales
CV	Coeficiente de variación
DCel	Digestibilidad de la celulosa
DE	Desvío estándar
DFDA	Digestibilidad de la fibra insoluble en detergente ácido
DFDN	Digestibilidad de la fibra insoluble en detergente neutro
DHemi	Digestibilidad de la hemicelulosa
DMS	Digestibilidad de la materia seca
DMO	Digestibilidad de la materia orgánica
E	Entero. Referido al forraje ensilado sin procesamiento alguno
EB	Energía bruta
ED	Energía digestible
Ec	Ecuación
EE	Extracto etéreo
EEM	Error estándar de la media
e.g.	“por ejemplo” del latín “ <i>exempli gratia</i> ”

EM	Energía metabolizable
F	Fresco. Referente al forraje ensilado tal cual
FA	Fracción analítica
FC	Fibra cruda
FDAD	Fibra insoluble en detergente ácido desaparecida
FDA _{mo}	Fibra insoluble en detergente ácido libre de cenizas
FDND	Fibra insoluble en detergente neutro desaparecida
FSDN	Fibra soluble en detergente neutro
Forr	Forraje
Frac	Fracción
Hemi	Hemicelulosa
HemiD	Hemicelulosa desaparecida
<i>i.e.</i>	“esto es” del latín “id est”
Lac	Ácido láctico
M	Molido. Referido al forraje ensilado molido en fresco
MH	Materia húmeda
MS	Materia seca
MSD	Materia seca desaparecida
NH ₃	Amoníaco
N-NH ₃	Nitrógeno amoniacal
P	Picado. Referido al forraje ensilado picado en fresco
PA	Producción animal
PB	Proteína bruta
PC	Pared celular
PG	Producción de gas
PGA	Producción de gas acumulada
Pro	Ácido propiónico
RI	Residuo insoluble
RIA	Residuo insoluble en agua
RIAc	Residuo insoluble en agua en base al sustrato completo
RIE	Residuo insoluble en etanol
RIDN	Residuo insoluble en detergente neutro
RIDNc	Residuo insoluble en detergente neutro en base al sustrato completo
S	Seco. Referente al forraje ensilado secado por algún método
SGgr	Silaje de gramíneas con grano

SL	Silaje de pastura base leguminosas
T	Tamiz
TGI	Tracto gastrointestinal
Tmax	Tasa máxima de producción de gas
TTmax	Tiempo de ocurrencia de la Tmax
UE	Unidad experimental
VI	Variable independiente
VN	Valor nutritivo

Resumen

El valor energético de los alimentos se determina mediante experimentos con animales pero que consumen gran cantidad de recursos económicos y humanos. La evaluación energética en la práctica rutinaria de laboratorio depende de la existencia de métodos de estimación basadas sobre parámetros químicos o valores de digestibilidad *in vitro* capaces de predecir adecuadamente la digestibilidad *in vivo*. El objetivo general fue generar conocimientos y criterios que mejoren la evaluación de la calidad de los forrajes ensilados y contribuir al desarrollo de ecuaciones de predicción de la digestibilidad de la materia seca (DMS) y de la energía metabolizable (EM) de los forrajes ensilados, utilizando como método de referencia a la digestibilidad obtenida *in vivo* con ovinos. Las fracciones analíticas como ${}_a\text{FDN}_{\text{mo}}$, Lig/FDA y almidón resultaron fundamentales para el desarrollo de las ecuaciones pero otras variables derivadas de la PG fueron necesarias para reducir la magnitud de los errores de la predicción. Las tasas de PG y los tiempos en que éstas ocurrieron fueron de mayor utilidad que las PGA (*i.e.* Tmax, $\mu 50$ y T50). Los parámetros de la cinética de PG de los residuos insolubles en agua y detergente neutro (*i.e.* RIA y RIDN) permitieron mejorar la precisión de la predicción de DMS y EM reduciendo los errores de los modelos hasta 21.3 g/kg MS y 0.10 Mcal/kg MS, respectivamente (*i.e.* $\text{DMS} = 450 + 10.8 \cdot \text{RIA}(\text{Tmax}) + 0.6 \cdot (\text{Lig}/\text{FDA})$, $R^2_{\text{aj}} = 0.94$; $\text{EM} = 2.97 - 0.022 \cdot \text{RIA}(\text{T50}) - 0.007 \cdot (\text{FDA}) + 0.008 \cdot (\text{Lig}/\text{FDA})$, $R^2_{\text{aj}} = 0.89$). Las ecuaciones para predecir DFDN presentaron pobres niveles de ajuste (*i.e.* $\text{RDS} > 40$ g/kg FDN). Sería necesario continuar explorando las razones de la variabilidad en los resultados obtenidos. La aplicación de las ecuaciones propuestas requiere la utilización de las fracciones analíticas en base seca corregida por liofilización así como la incubación de los ensilajes en fresco pero molidos con hielo seco.

Palabras clave: forraje ensilado, procesamiento de la muestra, secado en estufa, cinética de producción de gas, predicción de digestibilidad, predicción de energía metabolizable

Abstract

Feed energetic value can be assessed with animals which consume large amounts of human and financial resources. In routine laboratory practice, the energy evaluation depends on the availability of methods for estimating parameters based on chemical or *in vitro* digestibility values capable to adequately predict *in vivo* digestibility. The main objective was to generate knowledge and criteria to improve the quality assessment of ensiled forages and to contribute to develop prediction equations of dry matter digestibility (DMD) and metabolizable energy (ME) content using digestibility values obtained *in vivo* with sheep as a reference method. Analytical fractions like aNDF_{mo}, Lig/ADF and starch were fundamental in equations development although other variable coming from gas production (GP) were necessary in reducing the size of error prediction. Rate and time of GP occurrence were more useful than cumulative GP (*i.e.* T_{max}, μ₅₀ and T₅₀). Parameters of GP kinetics of water and detergent insoluble residues (*i.e.* NDIR, WIR) allowed the improvement of DMD and ME prediction accuracy by reducing the model error up to 21.3 g / kg DM and 0.10 Mcal / kg MS, respectively (*i.e.* $DMD = 450 + 10.8 * WIR (T_{max}) + 0.6 * (Lig / ADF)$, $R^2_{aj} = 0.94$, $ME = 2.97 - 0.022 * WIR (T_{50}) - 0.007 * (ADF) + 0.008 * (Lig / ADF)$, $R^2_{aj} = 0.89$). Equations of predicting NDFD did show poor level of adjustment (*i.e.* RDS > 40 g / kg NDF). To explain the variability of results ensure the need for further research. The utilization of the proposed equations make necessary the using of analytical fractions on a lyophilized DM basis and the incubation of silage samples milled fresh on dry-ice.

Key words: ensiled forage; sample processing; oven dry; gas production kinetic; digestibility prediction; metabolizable energy prediction

Capítulo 1.

Estado actual del conocimiento de la evaluación de los forrajes ensilados

1.1. Introducción general

Organizar un correcto racionamiento de los animales en función de sus requerimientos nutricionales no es solo importante para la salud de los mismos y la optimización de los resultados económicos de la empresa, sino que también contribuye a reducir el impacto ambiental de la excretas. La nutrición de los animales está relacionada con los contenidos de energía, proteína, minerales y vitaminas y también con la estructura física de los alimentos. Para cubrir las necesidades animales, la calidad de los forrajes debe ser conocido con la máxima precisión posible.

Se suele definir calidad como "superioridad de una cosa sobre otras de la misma especie". Esta definición asume que el objeto en cuestión es considerado superior por algún mérito particular. Sin embargo la definición normalizada de calidad es, según Taverna (1997) el conjunto de propiedades y características de un producto o servicio que le confieren la aptitud para satisfacer necesidades explícitas o implícitas. Esto implica que calidad se asocia a la función y aptitud y no específicamente a un producto. En el marco de la valoración de los alimentos, la evaluación realizada está asociada al efecto que produce dicho alimento en el destinatario o consumidor.

La evaluación de los alimentos para animales permite conocer su valor nutritivo (**VN**). La definición del VN corresponde al resultado de la interacción entre

la digestibilidad de la materia seca (**DMS**), el nivel de consumo y la eficiencia con que es utilizado por el animal. De acuerdo con Van Soest (1963) la producción animal (**PA**) que permite lograr representa la mejor expresión del VN de los alimentos ingeridos. Sin embargo, debido a la variabilidad de condiciones en las cuales se desarrolla la PA y que afectan la respuesta animal (e.g. tipo y nivel de producción, especie animal, biotipo, ambiente) resulta difícil estimar un VN característico de cada alimento. La evaluación de alimentos requiere métodos estandarizados, rápidos y económicos que permitan predecir la respuesta animal con el objeto de programar sistemas de alimentación, evaluar costos y decidir compras e inversiones.

Las evaluaciones *in vivo* son utilizadas como método de referencia para el desarrollo y validación de otros métodos que las reemplacen debido a su elevado costo, alta demanda de mano de obra, tiempo e infraestructura. Las metodologías de laboratorio, tanto las clásicas (química húmeda) como las biológicas *in vitro*, pretenden estimar el VN de los alimentos a través de técnicas que resulten reproducibles y de bajo costo.

Los dos procedimientos químicos más utilizados mundialmente son el proximal o de Wendee (1898) y el denominado sistema Van Soest (Goering y Van Soest, 1970). La diferencia fundamental entre ambos reside en la forma en que caracterizan a la fracción fibra de los forrajes, a partir de las cuales se desarrollaron ecuaciones que pretenden predecir el valor energético de los mismos o más aun, la respuesta animal. Las metodologías de laboratorio empleadas con forrajes henificados, alimentos concentrados y subproductos, han logrado predecir o explicar con bastante aproximación la respuesta animal (Nataraja y otros, 1998). Sin embargo, hasta el momento no se dispone de un modelo único de predicción del VN

aplicable a un amplio espectro de forrajes que además incluya a los ensilajes (McLeod y Minson, 1976; Van Soest, 1994).

Las evaluaciones químicas clásicas constituyen medidas estáticas de la composición de los alimentos; es decir que solo describen las proporciones de las entidades químicas que forman parte del mismo (e.g. proteína bruta, **(PB)**; extracto etéreo **(EE)**; cenizas **(Cen)**; fibra cruda **(FC)**; fibra insoluble en detergente neutro **(FDN)** y ácido **(FDA)**) en un momento y condición determinados. Dichas proporciones, al ser independientes del animal que habrá de consumirlo, no permiten inferir ni entender la naturaleza de las interacciones alimento-animal que son esencialmente dinámicas.

Los métodos químicos fueron usados para estimar la digestibilidad potencial de los alimentos. Esta se encuentra determinada por la disponibilidad de nutrientes y la dinámica de los procesos de solubilización e hidrólisis de los mismos en el tracto digestivo de los animales. Así también, el proceso de degradación ruminal de los alimentos resulta de la combinación de las tasas de degradación y de pasaje, que actúan en forma conjunta (Van Soest, 1994; Mertens, 1996; Mertens, 2000).

Por otro lado las metodologías biológicas utilizadas en laboratorio simulan lo que ocurre en el tracto gastrointestinal **(TGI)** de los animales, estudiando la cantidad de sustancia desaparecida en el tiempo de digestión o describiendo la cinética de degradación. Las primeras se denominan técnicas *in vitro* de punto final y las más difundidas son la de Tilley y Terry (1963) y Goering y Van Soest (1970); en cuanto a las segundas se encuentran las descritas por Menke y otros, (1979) y Theodorou (1993) conocidas como técnica de producción de gas **(PG)**. Las técnicas *in vitro* permiten la evaluación rutinaria de la DMS usando líquido ruminal o alternativamente usando enzimas específicas (e.g. celulasas; Aufrère, 1982). Las

técnicas de PG reemplazaron parcialmente la técnica *in situ* (biológico) que permite describir la cinética fermentativa y estimar la degradabilidad a tiempo infinito en el retículo-rumen con la posibilidad adicional de caracterizar el ambiente ruminal (Ørskov y McDonald, 1979). Esta metodología de características dinámicas, si bien constituyó un avance sobre las técnicas de punto final, conservó las restricciones de los estudios *in vivo*.

En la PG el sustrato es incubado a 39°C en botellas estancas en condiciones anaeróbicas con un medio de cultivo que contiene un sistema buffer, macro y macrominerales y un inóculo. El inóculo más utilizado es el licor ruminal obtenido de bovinos u ovinos fistulados de rumen (Schofield, 2000). El gas liberado durante la incubación puede ser producto neto de la fermentación (*i.e.* contribución directa de CO₂ y el CH₄) o CO₂ liberado por el desplazamiento del equilibrio buffer que producen los ácidos grasos volátiles (**AGV**) liberados por la fermentación y/o aportados por el alimento (*e.g.* ensilajes, pulpa de cítrico), dando lugar a una liberación extra de gas (*i.e.* contribución indirecta; Chamberlain y Choung, 1995). Entre los factores que pueden afectar la PG se encuentran: forma de secado de la muestra, molienda, tamaño de partícula, composición del buffer, relación inóculo/buffer, espacio libre en la botella de incubación, pH, temperatura, presión atmosférica y agitación (Russell y Dombrowski, 1980; Pell y Schofield, 1993; Cone y otros, 1997; Sanderson y otros, 1997; Deaville y Givens, 1998; Lowman y otros, 1998; Rymer y otros, 1998; Theodorou y otros, 1998; Schofield, 2000; Williams, 2000).

La relación que existe entre sustrato desaparecido y el volumen total de gas producido permitió avanzar sobre la predicción del VN de los alimentos. Blümmel y Ørskov (1993) encontraron buena correspondencia entre la desaparición de sustrato

in vitro y las determinaciones realizadas *in situ* utilizadas como referencia. Sin embargo, en la evaluación de forrajes frescos y/o ensilados se producen disturbios que alteran dicha correlación y que hasta el momento no han sido completamente aclarados.

Menke y Steingass (1988) lograron estimar el contenido de energía metabolizable (**EM**) de concentrados energéticos a partir del gas total producido en 24 horas de incubación y de las distintas fracciones del esquema de Wendee. Pero hallaron especiales dificultades con el grupo de los alimentos voluminosos frescos y ensilajes, para los que no lograron alcanzar un nivel de predicción similar al resto de los grupos. Sobre la base de la técnica de producción de gas y con ecuaciones que incluyen como única variable la producción de gas acumulada, no se ha conseguido hasta el momento predecir aceptablemente la DMS o EM de los ensilajes (Menke y Steingass, 1988; Mould y otros, 1999).

1.2. Evaluación de forrajes ensilados. La problemática

Los métodos convencionales de evaluación aplicados a los ensilajes, no resultan completamente satisfactorios debido a las características particulares de estos alimentos. Adesogan y otros, (1998) citan que la composición química de los forrajes ensilados tiene un valor predictivo sustancialmente menor que para otro tipo de alimentos. Esto puede ser explicado en parte, porque los ensilajes poseen compuestos que no son comúnmente cuantificados por dichos métodos (e.g. AGV y amoníaco (NH_3)). Sin embargo, los AGV son fuente de energía para el rumiante y el NH_3 es sustrato para la síntesis de proteína microbiana en rumen. Por lo tanto, deberían ser tenidos en cuenta en el momento de predecir el VN de los estos alimentos.

La PG ha mostrado una aceptable capacidad predictiva de la digestibilidad y del consumo para algunos alimentos (Menke *y otros*, 1979; Blümmel y Becker, 1997). En cambio, en la evaluación de forrajes ensilados se han encontrado numerosas dificultades. Parte de ellas podrían ser consecuencia de la contribución directa e indirecta del gas producido. Beuvink (1993) y Jaurena (1996) reportaron que parte de la producción de gas de los forrajes ensilados derivaba de la acidez aportada por el sustrato pero sin valorar esa contribución.

La mayoría de los trabajos de producción de gas documentados en la bibliografía se han realizado con muestras secadas en estufa y molidas (e.g. malla de 1 mm) tal como describen las técnicas originales. Si bien para la evaluación de alimentos se recomiendan esas dos condiciones mínimas (AOAC, 1990; NFTA 2008) no existe un protocolo único de preparación de muestras para los análisis biológicos de calidad. En algunos trabajos se informan variaciones en los resultados de las evaluaciones químicas, *in situ* e *in vitro* debido al empleo de distintos procedimientos de preparación (Alomar *y otros*, 1999). También Valentin *y otros*, (1999) encontraron que el tamaño de partícula (molienda) de las muestras de ensilaje de maíz afectaba la magnitud de la fracción soluble del forraje (*i.e.* a del modelo de Ørskov y McDonald, 1979). Al mismo tiempo observó que al incubar forraje fresco y molido a partículas de 5 mm disminuía la fracción soluble respecto de la molienda a 3 mm, al tiempo que aumentaba la fracción potencialmente degradable. Así mismo, encontraron diferencias en la degradabilidad efectiva, siendo mayor en el material molido a menor tamaño (*i.e.* 3 vs 5 mm). Por su parte, Jaurena *y otros*, (1997) observaron que el secado en estufa de muestras frescas de alfalfa, afecto la tasa (%/h) de producción de gas y sugirieron que en los estudios de cinética de producción de gas los sustratos deberían utilizarse frescos.

La utilización de material seco y molido, sustancialmente diferente al forraje ensilado original, se sustenta en el propósito básico de asegurar la máxima homogeneidad de la muestra para obtener resultados consistentes y representativos. En el caso de los forrajes ensilados, durante el secado a 65 °C se pierden los compuestos volátiles (AGV y NH₃), transformándose entonces la muestra que no representa el alimento original. Además, deben ser tenidos en cuenta los potenciales cambios que puede sufrir la fracción de almidón o pared celular durante la exposición a altas temperaturas. Al incubar *in vitro* los ensilajes así procesados, es posible que no se reproduzcan los efectos que se observan *in vivo*, siendo probablemente ésta otra de las causas de las dificultades encontradas entre los valores predichos y los observados *in vivo*. Un tratamiento alternativo es liofilizar esta clase de materiales, pero como el método es costoso y lento no ha sido masivamente adoptado para las evaluaciones comerciales de rutina.

1.3. Hipótesis

- El procesamiento físico de las muestras, previo a su análisis, afecta la cinética de producción de gas *in vitro* y por lo tanto la tasa de liberación de la energía de los ensilajes incubados. El secado en estufa elimina los compuestos volátiles del forraje ensilado y disminuye la digestibilidad de la fracción fibrosa. La molienda de la muestra aumenta la superficie de contacto con los microorganismos ruminales y disminuye la variabilidad de los resultados.
- La producción de gas de las fracciones de los ensilajes (azúcares solubles, FSDN, FDN y FDA) aportará información acerca de la interacción que entre ellas ocurre durante el proceso de degradación y permitirá valorar la importancia de cada uno de ellos sobre el VN. Así como también, cuantificar las correlaciones que entre ellas existen y que modifican la desaparición de sustrato.
- La incubación *in vitro* de los ensilajes y sus fracciones insolubles en agua y detergente neutro (RIA y RIDN) aportan información que permitirá elaborar ecuaciones de predicción del aporte energético de los forrajes. La producción de gas y las variables derivadas que describen la cinética permitirán desarrollar ecuaciones de mayor precisión que aquellas que utilizan la composición química del forraje.

1.4. Objetivos

Fueron objetivos generales del presente trabajo:

1.- Generar conocimientos y criterios que mejoren la evaluación de la calidad de los forrajes ensilados.

2.- Desarrollar ecuaciones de predicción de la digestibilidad de la materia seca (DMS) y de la energía metabolizable (EM) de los forrajes ensilados, utilizando como método de referencia a la digestibilidad obtenida *in vivo* con ovinos.

Fueron objetivos específicos:

- 1.- Estudiar *in vitro* el efecto de las formas de procesamiento de las muestras sobre la cinética de producción de gas.
- 2.- Examinar la interacción entre las fracciones de la materia orgánica (MO) de los ensilajes durante el proceso de fermentación *in vitro*.
- 3.- Cuantificar la contribución de las fracciones de la MO de los ensilajes a la producción total de gas *in vitro*.
- 4.- Desarrollar modelos para estimar la digestibilidad de la materia seca y la fibra insoluble en detergente neutro y contenido de energía metabolizable (DMS, DFDN y EM) de forrajes ensilados utilizando la información obtenida por química húmeda y producción de gas *in vitro* ajustadas a los resultados de obtenidos *in vivo* con ovinos.

Capítulo 2.

Efecto del procesamiento de ensilajes de maíz y pastura sobre la desaparición de sustrato y cinética de producción de gas *in vitro*

2.1. Resumen

En el presente estudio se consideró que el tamaño de partícula y el modo de presentación fresco y seco (F y S) del forraje ensilado modifica la cinética de producción de gas *in vitro* así como la desaparición de sustrato. Fueron usados 11 ensilajes de gramíneas con grano y 7 de pastura en base alfalfa (**SGgr** y **SL**). Se analizó la producción de gas acumulada (PGA) y su cinética y las desapariciones de materia seca, fibra insoluble en detergente neutro y ácido (MSD, FDND y FDAD). El sustrato molido con 60% de partículas menores de 1.19 mm tuvo una PGA a las 12 y 24 horas 1.3 veces mayor que los otros tratamientos con 11 y 5 %; 1.3 veces mayor T_{max} y tasa de PG y un promedio de 1.2 veces mas MSD, FDND y FDAD. El sustrato fresco tuvo 100g/kg menos de FDND y FDAD para SGgr, sin cambios en MSD para SGgr y ninguno para SL. La PGA en F fue en promedio 2 veces mayor que S en SL, mientras que para SGgr solo se registró los mismo a las 12 h. Esto provocó que la cinética de PG para F fuera más rápida con 1.2 mas T_{max} y 4 horas antes (9.7 y 5.6 horas de TT_{max}), 1.3 veces mayor c y 0.5 horas menos de fase *Lag*; pero menos a+b (189 y 205 ml/g MS; P<0.05) coincidente por la menor proporción de Ac/Pro que en S (1.9 y 3.1, respectivamente) que reduce la producción de gas indirecto e igual AGVs totales. Se concluye que para el estudio y

comparación de forrajes ensilados mediante la técnica de producción de gas y desapariciones de sustrato *in vitro* sería recomendable el uso de sustrato fresco y garantizar la reducción del tamaño de partícula con la molienda.

2.2. Introducción

El procedimiento recomendado para realizar análisis de muestras de alimentos en laboratorio debe asegurar primero un contenido de humedad máximo de 15% para luego reducir el tamaño de partícula con la molienda (Undersander y *otros*, 1993). Como resultado de este proceso todas las muestras se presentan secas y molidas asegurando que las pequeñas alícuotas tomadas para cada análisis resulten representativas de una cantidad ampliamente superior (*i.e.* 0.1 a 0.5 g de alícuota de una muestra de 300 a 500 g). En numerosas técnicas de evaluación de alimentos para animales ampliamente difundidas se recomienda el secado y molienda a 1 mm de las muestras (*e.g.* determinación de fracción fibrosa por Van Soest y *otros*, 1991; métodos *in Vitro* de Tilley y Terry, 1963; Goering y Van Soest, 1970; Theodorou y *otros*, 1994 y Pell y Schofield, 1993).

Los forrajes ensilados son alimentos húmedos que contienen entre 80 y 60% de agua en su composición y que poseen compuestos volátiles como ácido láctico, acético y propiónico y amoníaco (NH₃) y en menor medida ácido butírico y alcoholes (McDonald y *otros*, 1991a). Los compuestos volátiles se pierden en proporciones variables durante el secado de la muestra en estufa modificando así la composición del ensilado (Fox y Fenderson, 1978). A pesar de las diferencias mencionadas el secado en estufa es el procedimiento mas difundido. Deinum y Maassen (1993) encontraron para ensilajes de maíz que a 70 °C ocurren mínimas alteraciones en la cantidad de carbohidratos solubles y en la digestibilidad de la materia seca (DMS) en comparación al material liofilizado pero no estudiaron el efecto de los ácidos grasos volátiles (AGVs). Tanto Beuvink y Spoelstra (1994) como Jaurena (1998) mencionaron la influencia de la acidez propia del ensilaje sobre la producción de gas pero sin cuantificar su magnitud. Danley y Vetter (1971) reportaron para

ensilajes de maíz y de sorgo forrajero una mayor concentración de azúcares solubles, total de nutrientes digestibles, nitrógeno soluble en materiales frescos respecto de los secados en estufa. Mientras que los componentes de pared celular (e.g. lignina, ${}_a\text{FDN}_{\text{mo}}$ y FDA_{mo}) fueron significativamente menores. Los forrajes ensilados en húmedo han sido poco utilizados como una alternativa para evitar los cambios que provoca el secado del material en estudios con el método de producción de gas *in vitro*.

El tamaño de partícula fue identificado como un factor que también afecta la exactitud de la técnica de producción de gas *in vitro* (Adesogan, 2002). Valentin y otros (1999) encontraron en ensilajes de maíz secado en estufa de 1 mm mayor tasa de PG (h^{-1} ; parámetro *c* del modelo de Ørskov y McDonald, 1979) respecto de 3 mm a causa de una mayor PG entre las 24 y 48 horas de incubación. También observaron que al incubar *in situ* material fresco molido a partículas de 5 mm disminuía la fracción soluble, al tiempo que aumentaba la fracción potencialmente degradable respecto material seco de 3 mm. Asimismo, reportaron mayor degradabilidad efectiva para los 3 mm respecto de 5 mm. Por su parte Jaurena y otros (1997) encontraron que el secado en estufa de muestras frescas de alfalfa, afectaba la tasa (h^{-1}) de producción de gas (PG) y sugirieron que en los estudios donde se requiere analizar la cinética de producción de gas, las muestras deberían utilizarse húmedas.

La técnica de PG *in vitro* permite evaluar la desaparición de sustrato a un tiempo específico (e.g. 48 horas) así como la cinética de desaparición del mismo. La metodología asume que el gas liberado durante la incubación está directamente relacionado a la cantidad de sustrato degradado (Theodorou, 1993; Theodorou y otros, 1994). Dado que el tamaño de partícula y el modo de presentación de la

muestra (*i.e.* fresco vs. seco) afectan a la velocidad y cantidad desaparecida de sustrato la técnica de PG *in vitro* resulta apropiada para el estudio de estos factores.

El objetivo planteado en este capítulo fue estudiar el efecto del tamaño de partícula y el modo de presentación fresco y seco del forraje ensilado sobre la cinética de producción de gas *in vitro* y la desaparición de sustrato.

2.3. Materiales y Métodos

2.3.1. Forrajes experimentales

Las muestras de ensilaje utilizadas fueron recolectadas en establecimientos comerciales localizados en las provincias de Buenos Aires (Cañuelas y Urubelarrea) y Santa Fe (El Trebol y Rafaela) durante los años 2002 y 2003. El origen de los ensilados desde diferentes establecimientos comerciales, así como la inclusión de diferentes zonas productivas permitió encontrar una amplia variabilidad en VN. Los forrajes ensilados fueron retirados del almacenamiento en su lugar de origen una vez que habían alcanzado la fase de estabilidad y re-ensilados en bolsones de plastillera de un metro cúbico de capacidad recubiertos en su interior con una bolsa de polietileno de 200 μ de espesor. El forraje fue compactado para eliminar la mayor cantidad de aire de la masa de ensilaje del interior del bolsón y cerrado para transportarlo hacia la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires – CABA. Cada uno de los bolsones pesó entre 400 y 500 kg de materia húmeda.

Se utilizaron 11 forrajes ensilados de gramíneas con presencia de grano (**SGgr**) y 7 de pasturas a base de alfalfa (**SL**), siendo los ensilajes estudiados un total de 18 unidades experimentales (**UE**). Los SGgr fueron 9 ensilajes de planta entera de maíz, 1 de planta entera de sorgo y 1 de verdeo de avena granada. Este grupo fue descripto como proveniente de cultivo de gramíneas anuales con grano. Mientras que los SL fueron de pasturas mixtas (gramíneas y leguminosas) con alfalfa como especie predominante. Los ensilajes fueron obtenidos mediante muestreo compuesto a bolsones de plastillera de un metro cúbico de capacidad donde se encontraban almacenadas las muestras para experimentos *in vivo*. La muestras fueron preservadas en freezer a -18 ° C hasta su utilización.

2.3.2. Experimento 1

El objetivo del experimento fue analizar el efecto del tamaño de partícula del ensilaje fresco sobre la desaparición de materia seca (**MSD**) y fibras insolubles en detergente neutro y ácido (**FDND** y **FDAD**) así como sobre la cinética de producción de gas *in vitro*.

De las 18 muestras se obtuvieron tres porciones para asignar aleatoriamente los tratamientos experimentales que fueron diferentes tamaño de partícula de los ensilajes presentados en fresco para someter las muestras al análisis *in vitro*. Fueron asegurados un mínimo de 500 gramos de forraje húmedo en cada una de las porciones. Los tratamientos aplicados a las muestras frescas fueron sin procesamiento o entero (**E**), picado (**P**) y molido (**M**).

La reducción del tamaño de partícula de P y M se realizó con un homogenizador Foss Tecator® (Modelo 2096) con previa adición de hielo seco (forraje fresco y hielo seco con 15 minutos de reposo) para asegurar la acción de las cuchillas del molino y la preservación de la muestra de forraje ensilado. El tratamiento P se logró con 3 pulsos de 30 segundos, mientras que el M se sometió a 3 pulsos adicionales de 1 minuto. Todas las muestras fueron reservadas en freezer hasta su uso.

La caracterización de los tratamientos (E, P y M) se realizó mediante la distribución del tamaño de partícula con la separación de las muestras en tres tamices. Los tamices fueron circulares de 20 cm de diámetro y 7 cm de alto; cada uno encastrado dentro del otro para minimizar la pérdida de material. El tamaño de partículas retenido por cada tamiz (**T**) fue: T1, > 2.38 mm; T2 entre 2.38 y 1.19 mm; T3, < 1.19 mm. El procedimiento de separación fue realizado bajo una suave circulación de agua. Luego de separados T1, T2 y T3 se secaron en estufa a 65 ° C

durante 48 horas y finalmente pesados para calcular la proporción de material remanente en cada bandeja.

2.3.3. Experimento 2

El objetivo del experimento fue analizar el efecto de la incubación en fresco o seco de los forrajes ensilados sobre la desaparición de materia seca (**MSD**) y fibras insolubles en detergente neutro y ácido (**FDND** y **FDAD**) así como sobre la cinética de producción de gas *in vitro*.

Una alícuota de aproximadamente 500 gramos de forraje húmedo fue molido con hielo seco según fue descrito el procesamiento M del Experimento 1 y dividido luego en dos partes iguales. Los tratamientos aplicados fueron: secado en estufa a 65 °C (**S**) y fresco (**F**).

2.3.4. Incubación in vitro

La incubación *in vitro* se efectuó siguiendo la técnica de (Brooks y Theodorou, 1997) modificada por (Wawrzkievicz y Danelon, 2004). Se utilizó como inóculo el contenido ruminal de dos ovinos castrados provistos de fistula ruminal estabulados y alimentados a nivel de mantenimiento con una dieta de heno de alfalfa y grano de maíz (70:30) ofrecida en dos raciones diarias (*i.e.* mañana y tarde) (NRC, 1985). El contenido ruminal se recolectó por la mañana antes de la oferta de alimento, recogiendo las fases sólida y líquida en proporción 50:50. El licor fue amasado durante 3 - 5 minutos para favorecer el desprendimiento de los microorganismos adherentes. Luego se filtró para separar la fase sólida por cuatro capas de gasa. Durante todo el procedimiento de manipulación del inóculo se aseguraron las condiciones de anaerobiosis bajo manto de dióxido de carbono y temperatura a 39 ° C.

Las muestras de los experimentos 1 y 2 se incubaron por triplicado en tres oportunidades independientes en el tiempo (*i.e.* repeticiones) durante 72 horas. La relación sustrato / inóculo en las botellas de incubación fue 1 g MS incubada / 10 ml licor ruminal. Las mediciones se realizaron a intervalos regulares (*i.e.* 1, 3, 5, 7, 9, 11, 14, 18, 23, 28, 36, 47, 60 y 72 horas) con un transductor de presión (tipo T443A®, Bailey y Mackey Ltd., Birmingham, Gran Bretaña) conectado a un panel digital (Data Track®, Christchurch, Gran Bretaña). En cada incubación en el 30 % de las botellas se midió la presión y el volumen correspondiente para construir la relación lineal correspondiente entre dichas variables utilizadas para transformar todos los resultados.

Los residuos no digeridos fueron recuperados en bolsitas filtrantes ANKOM® F57 para la determinación de la MS, FDN y FDA desaparecidas (**MSD**, **FDND** y **FDAD**, respectivamente). Los resultados de producción de gas (**PG**) y de desaparición de sustrato de las muestras en estudio fueron corregidos por blanco (*i.e.* botellas sin sustrato).

La cinética de PG fue ajustada según la ecuación $PGA = a + b (1 - e^{-ct})$ (Ørskov y McDonald, 1979) donde los parámetros del modelo se interpretan como: *a*, PG de la fracción soluble; *b*, PG de la fracción potencialmente degradable, *c*, tasa de degradación de *b* y *t* es el tiempo de incubación. El tiempo de retardo (*Lag*) hasta el comienzo de la PG fue despejado de la mencionada ecuación asumiendo $t = 0$ ($Lag\ time = \ln(1 - (-a/b)) / -c$).

Se analizaron las variables producción de gas acumulada (**PGA**; ml/g MS) a las 12, 24, 48 y 72 h, parámetros *a*, *b* y *c*, *Lag time*, tasa horaria máxima de producción de gas (**Tmax**; ml/g MS.h⁻¹) y el tiempo al que ésta se produce (**TTmax**) y MSD, FDND y FDAD.

2.3.5. Análisis químicos

La caracterización de las 18 muestras de ensilajes obtenidas se realizó mediante los análisis de materia seca liofilizada (**MS**; (Givens, 1986) y cenizas (AOAC, 1990; Nro. 942.05). La proteína bruta (**PB** = $N_{total} \times 6,25$) se determinó por el método de Kjeldahl (AOAC, 1990; Nro. 984.13) en un equipo Pro-Nitro® (J.P. Selecta, Barcelona, España). Las fracciones de fibra insoluble en detergente neutro (**aFDN_{mo}**) y ácido (**FDA_{mo}**) y la lignina en detergente ácido con ácido sulfúrico (**Lig_{as}**) se determinaron de acuerdo a Van Soest y otros (1991) con un equipo ANKOM® (modelo 220) y se informaron libres de cenizas. El contenido de almidón se determinó con un kit enzimático (Megazyme®; AOAC, 2000; Nro. 996.11).

Se determinaron ácidos grasos volátiles (**AGV**) a las muestras luego de la incubación *in vitro* por cromatografía gaseosa. Fueron identificados los ácidos acético, propiónico y butírico (**Ac**, **Pro** y **But**, respectivamente). Se utilizó un equipo Konik-3000® con inyección manual y una columna semi-capilar BP-20 (marca SGE®) con nitrógeno como carrier (10 ml N₂/min) y según protocolo recomendado por el fabricante de la columna. La purificación de las muestras para AGV se realizó con ácido sulfúrico (25 % en ácido sulfúrico 0.5M) a razón de 0.5 ml por cada 2 ml de muestra y luego centrifugadas por 10 minutos a 5000 x g (Friggens y otros, 1998).

2.3.6. Análisis estadístico

El estudio del tamaño de partículas se realizó siguiendo un diseño completamente aleatorizado para cada forraje según el modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + Tamiz_i + Trat_j + (Tamiz \times Trat)_{ij} + E_{ijk}$$

Modelo 1

donde, Y_{ijk} = porcentaje de MS; μ = media general; Tamiz_i = tamiz (i=3); Trat_j= tratamiento (Exp. 1, j=3); (Tamiz x Trat)_{ij} = interacción; E_{ijk} = error experimental.

Las variables en estudio fueron sometidos a un análisis de varianza con un diseño completamente aleatorizados de dos factores con interacción según el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + \text{Forr}_i + \text{Trat}_j + (\text{Forr} \times \text{Trat})_{ij} + E_{ijk} \quad \text{Modelo 2}$$

donde, Y_{ijk} = variable en estudio; μ = media general; Forr_i = tipo de forraje ensilado (i=2); Trat_j= tratamiento (Exp. 1, j=3; Exp. 2 j=2); (Forr x Trat)_{ij} = interacción; E_{ijk} = error experimental (k=3).

2.4. Resultados

La sección de los resultados se organizó siguiendo la estructura de los experimentos 1 y 2 presentada en el punto de Materiales y Métodos. Sin embargo, como los sustratos usados en los dos experimentos fueron los mismos la caracterización química de los ensilados se informará en forma independiente ya que será utilizada en todos los puntos siguientes.

2.4.1. Composición de los forrajes ensilados

La composición química de los ensilajes utilizados en el estudio se observa en el Cuadro 2.1. La variación encontrada dentro de SGgr y de SL con el número de ensilajes analizado en cada caso resultó satisfactoria ya que se alcanzaron coeficientes de variación (CV) mínimos de 17 % en las características de composición química analizadas. En este sentido, la variabilidad encontrada sugiere que a las muestras fueron representativas de los grupos SGgr y SL. (Shaver, 2004; Guaita y Fernández, 2005; Jaurena y Danelón, 2006) reportaron valores similares de composición química promedio para ensilajes SGgr y SL de la región pampeana a los reportados en el Cuadro 2.1.

La cantidad de almidón de los SGgr varió entre 38 y 365 g/kg MS. Esto sugiere que los forrajes fueron cosechados en distintos momentos del llenado de los granos. En el mismo sentido, tanto el contenido de pared celular ($aFDN_{mo}$) como su composición (e.g. hemicelulosa, celulosa y lignina) también resultaron muy variables (CV promedio para composición química de SGgr fue 32%). En Lig_{as} fue donde se detectaron las diferencias mas importantes (64% CV) siendo los valores extremos 14 y 70 g/kg MS. Los SL presentaron un CV promedio de 21.5% algo inferior a SGgr si se excluye la determinación de almidón que tuvo un CV de 123%, muy diferente

de lo registrado en los otros análisis. Los resultados de Lig_{as} se presentaron entre 55 y 115 g/kg MS, siendo este el indicador más importante al respecto del estado de madurez de las pasturas al momento de la cosecha.

Cuadro 2.1 Composición química de los forrajes ensilados (g/kg MS, excepto la materia seca, g/kg MH).

	Fracciones analíticas ¹						
	MS	Cen	PB	aFDN _{mo}	FDA _{mo}	Lig _{as}	Alm
Forrajes ensilados de gramíneas con grano (n = 11)							
Media	368	75	71	509	264	29	219
Máximo	435	117	100	799	498	70	365
Mínimo	299	58	56	378	184	14	38
DE ²	43.5	21.6	13.8	125.7	93.6	18.5	87.8
CV ³	12	29	19	25	35	64	40
Forrajes ensilados de pastura consociada base alfalfa (n = 7)							
Media	298	130	130	562	367	83	10
Máximo	411	177	168	695	484	115	34
Mínimo	220	94	88	420	307	55	1
DE ²	66.9	32.1	27.0	93.3	62.7	22.3	12.2
CV ³	22	25	21	17	17	27	123

¹ MS: materia seca; Cen: cenizas; PB: proteína bruta; aFDN_{mo}: fibra insoluble en detergente neutro libre de cenizas y con alfa-amilasa; FDA_{mo}: fibra insoluble en detergente ácido; Lig_{as}: lignina en detergente ácido con ácido sulfúrico; Alm: almidón. ² DE = desvío estándar de la media. ³ CV = coeficiente de variación (%).

2.4.2. Experimento 1

EL procedimiento usado en la molienda en fresco no resulto completamente satisfactorio. El proceso de disminución de tamaño de partícula realizado con los ensilados frescos permitió diferenciar los tratamientos E y P de M tanto para SGgr como SL (Cuadro 2.2). La disminución del material con partículas > 2.38 mm (T1) de E a M fue de 88 % en SGgr y de 96 % en SL. En SGgr la disminución de la fracción encontrada en T1 fue recuperada en el T3 (< 1.19 mm; 65 puntos porcentuales) y en el T2 (2.38-1.19 mm; 16 puntos porcentuales). Finalmente, los tratamientos E y P de los SGgr resultaron similares con solo 8 puntos porcentuales de reducción (93 a 85 %) de la cantidad de partículas de mayor tamaño y un

aumento similar para las menores (< 1.19 mm; 5 a 12 %). Por lo tanto la mayor diferencia se observó entre M y los E y P.

Cuadro 2.2 Caracterización de los tratamientos del experimento 1 para cada tipo de forraje ensilado según la distribución del tamaño de partícula (% p/p).

	Tamaño de partícula (mm) ¹		
	> 2.38	2.38 – 1.19	< 1.19
Forraje ensilado gramíneas con grano			
Entero	93 a	3 b	5 c
Picado	85 b	3 b	11 b
Molido	11 c	19 a	70 a
EE ²	1.4	1.3	1.6
F _{2, 52}	1036	45	649
Significancia ¹	***	***	***
Forraje ensilado pasturas consociada base alfalfa			
Entero	92 a	3 b	5 c
Picado	87 b	4 b	9 b
Molido	4 c	34 a	62 a
EE ²	0.9	0.7	1.1
F _{2, 52}	3172	409	1303
Significancia	***	***	***

¹ NC: no corresponde; NS: no significativo; †, P<0.10; *, P<0,05; **, P<0.01; ***, P<0.001. ² EE = error estándar de la media. Letras diferentes en la misma columna difieren estadísticamente P<0.05, Tukey.

Para SL se detectó un comportamiento similar entre E, P y M respecto de SGgr. Cabe destacar que las diferencias entre los tratamientos fueron mayores, encontrándose aumentos de mas de 10 veces en M para los tamices T2 y T3 respecto de E con la consecuente reducción en T1.

La PG se detalla en el Cuadro 2.3. La interacción Tratamiento x Forraje no fue significativa para la PGA a las 12, 24, 48 y 72 h (P > 0.05). Por lo tanto a continuación se analizarán los efectos principales. Las PGA de los SGgr resultaron 35, 20, 25 y 24% mayores para 12, 24, 48 y 72 h a los de SL. Estos resultados fueron coincidentes con la composición promedio antes descrita para estos forrajes. Los SGgr mostraron menor concentración de aFDN_{mo}, FDA_{mo} y Lig_{as}

(Cuadro 2.1) lo que sugiere una mayor degradabilidad respecto de SL y esto coincide con la mayor PG observada.

Cuadro 2.3 Producción de gas acumulada a las 12, 24, 48 y 72 horas (PGA 12, PGA 24, PGA 48 y PGA 72, respectivamente; ml/g MS) durante la incubación *in vitro* de ensilaje de gramíneas con grano y pasturas base leguminosas (SGgr y SL) frescas y con distinto tamaño de partícula.

		PGA 12	PGA 24	PGA 48	PGA 72
Tratamiento					
	Entero	61 b	101 b	146	174
	Picado	59 b	100 b	145	172
	Molido	78 a	121 a	159	181
	EEM ¹	2.4	3.4	4.5	4.9
Forraje ensilado					
	Gramíneas con grano	74	112	163	190
	Pastura base alfalfa	55	93	130	153
	EEM ¹	1.7	1.8	2.0	2.1
Estadístico					
Tratamiento	F _{2, 154}	12.2	8.2	2.5	1.0
Forraje	F _{1, 154}	32.8	30.8	40.6	44.4
Tratamiento x Forraje	F _{2, 154}	1.4	1.2	0.5	0.1
Significancia²					
Tratamiento		***	***	†	NS
Forraje		***	***	***	***
Tratamiento x Forraje		NS	NS	NS	NS

¹ EEM = error estándar de la media. ² NC: no corresponde; NS: no significativo; †, P<0.10; *, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001. Letras diferentes en la misma columna difieren estadísticamente P<0.05, Tukey.

Las PGA a las 12 y 24 horas de E y P no resultaron diferentes (P>0.05), mientras que M fue un 30 y 20 % mayor a las 12 y 24 h, respectivamente. Las diferencias observadas en PGA entre los tratamientos durante las primeras 24 horas se diluyeron a las 48 y 72 h (P>0.05) aunque se mantuvo la diferencia numérica con 9 y 5 % mas de gas producido en M respecto de E y P.

La cinética de PG fue estudiada a través de los parámetros estimados del modelo de (Ørskov y McDonald, 1979) y de la Tmax y TTmax. En el análisis de la Tmax y TTmax se estudiaron los efectos principales ya que la interacción

Tratamiento x Forraje no fue significativa (Cuadro 2.4). SL mostró una menor Tmax que SGgr (6 vs. 8 ml/g MS.h⁻¹, respectivamente; P < 0.001) y con 2 horas de retraso. Los resultados podrían ser explicados a partir de la composición de los forrajes, aquellos que poseen fracciones más lábiles se fermentan más rápido y en mayor cantidad (*i.e.* almidón vs. pared celular (PC)). Lo dicho coincide con las diferencias que presentan SGgr respecto de SL, menor contenido de PC y mayor cantidad de almidón (Cuadro 2.1).

Cuadro 2.4 Tasa horaria máxima de producción de gas *in vitro* (Tmax; ml/g MS.h⁻¹) y tiempo de ocurrencia de Tmax (TTmax; h) de forraje ensilado fresco con diferente tamaño de partícula.

		Tmax	TTmax
Tratamiento			
	Entero	6.8 b	5.7
	Picado	6.8 b	6.6
	Molido	8.9 a	5.6
	EEM ¹	0.42	0.40
Forraje ensilado			
	Gramíneas con grano	8.4	5.2
	Pastura base alfalfa	6.1	7.2
	EEM ¹	0.27	0.37
Estadístico			
Tratamiento	F _{2, 154}	15.8	2.7
Forraje	F _{1, 154}	48.7	22.1
Tratamiento x Forraje	F _{2, 154}	3.0	0.8
Significancia ²			
Tratamiento		***	†
Forraje		***	***
Tratamiento x Forraje		NS	NS

¹ EEM = error estándar de la media. ² NC: no corresponde; NS: no significativo; †, P<0.10; *, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001. Letras diferentes en la misma columna difieren estadísticamente P<0.05, Tukey.

E y P no mostraron diferencias significativas en Tmax, mientras que M fue un 31% mayor (Cuadro 2.4). La Tmax de M fue mayor que la de E y P, las que no mostraron diferencias significativas (Cuadro 2.4). Sin embargo, no se encontraron

diferencias en TTmax entre los tratamientos ($P>0.05$). Aunque P presentó 1 hora de retraso en Tmax respecto de E y M ($P<0.10$).

En el Cuadro 2.5 se observan los parámetros del modelo de (Ørskov y McDonald, 1979) que describen la cinética de PG. Solo el parámetro c de la modelación de la cinética de PGA mostró diferencia significativa entre los tratamientos ($P<0.001$), siendo la interacción entre los efectos principales no significativa. M fue 0.11 ml/h, superior a E y P ($P<0.001$; Cuadro 2.5). Al respecto del parámetro b del modelo de ajuste solo el efecto del tipo de forraje fue significativo, resultando mayor la PG de la fracción potencialmente degradable de SGgr respecto de SL. Resultados coincidentes a los analizados de la PGA 72 (Cuadro 2.3).

Cuadro 2.5 Parámetros *a*, *b* y *c* del modelo exponencial que describe la cinética de producción de gas (PG) *in vitro* (Ørskov y McDonald, 1979) y tiempo de retardo hasta el comienzo de la misma (Lag, h).

		<i>a</i> ¹	<i>b</i> ²	<i>A + b</i>	<i>c</i> ³	<i>Lag</i>	
Tratamiento							
	Entero (E)	1	208	204	0.03 b	-0.1 b	
	Picado (P)	-2	200	193	0.03 b	0.3 a	
	Molido (M)	-3	194	187	0.04 a	0.3 a	
	EEM ⁴	0.6	7.2	5.4	0.001	0.11	
Forraje ensilado							
	Gramíneas con grano (SGgr)	-1	217	216	0.04	0.1	
	Pastura base alfalfa (SL)	-2	175	174	0.03	0.4	
	EEM ⁴	0.5	4.8	4.9	0.001	0.10	
Estadístico							
	Tratamiento	F _{2, 154}	7.2	1.7	2.6	30.6	4.6
	Forraje	F _{1, 154}	0.2	42.7	45.2	1.9	6.3
	Tratamiento x Forraje	F _{2, 154}	5.9	0.1	0.01	2.2	3.8
Significancia⁵							
	Tratamiento	**	NS	†	***	*	
	Forraje	NS	***	***	NS	*	
	Tratamiento x Forraje	* ⁶	NS	NS	NS	NS	

¹ PG de la fracción soluble (ml/g MS) ² PG de la fracción potencialmente degradable (ml/g MS). ³ tasa de degradación de *b* (ml/h). ⁴ EEM = error estándar de la media. ⁵ NS: no significativo; †, P<0.10; *, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001. Letras diferentes en la misma columna difieren estadísticamente P<0.05, Tukey. ⁶ Análisis por Forraje: dentro de SGgr: 2_a, -1_b y -4_b para E, P y M, respectivamente (P<0.05, Tukey); dentro de SL no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (P>0.05).

Cuadro 2.6 Desaparición de la materia seca (MSD), aFDN_{mo} (FDND) y FDA_{mo} (FDAD) a las 72 horas de incubación (g/kg MS, FDN ó FDA según corresponda).

		MSD	FDND	FDAD	
Tratamiento					
	Entero	568 b	333 b	327 b	
	Picado	582 b	357 b	355 b	
	Molido	634 a	443 a	438 a	
	EEM ¹	13.3	11.5	13.7	
Forraje ensilado					
	Gramíneas con grano	616	371	355	
	Pastura base alfalfa	561	389	404	
	EEM ¹	7.3	9.6	11.5	
Estadístico					
	Tratamiento	F _{2, 154}	5.9	12.9	18.2
	Forraje	F _{1, 154}	13.3	1.1	10.8
	Tratamiento x Forraje	F _{2, 154}	1.6	1.5	1.6
Significancia ²					
	Tratamiento	**	***	***	
	Forraje	***	NS	**	
	Tratamiento x Forraje	NS	NS	NS	

¹ EEM = error estándar de la media. ² NC: no corresponde; NS: no significativo; †, P<0.10; *, P<0,05; **, P<0.01; ***, P<0.001. Letras diferentes en la misma columna difieren estadísticamente P<0.05, Tukey.

La interacción Tratamiento x Forraje fue significativa al 10% para el parámetro *a* debido a que para SL los tratamientos no mostraron diferencias, mientras que si las hubo en SGgr. El EEM de los SL fue de la misma magnitud que la media de los tratamientos; esto explica la igualdad entre ellos. En cambio, para los SGgr *a* fue mayor en E respecto de P y M que no presentaron diferencias entre sí (2, -1 y -4 ml/g MS para E, P y M, respectivamente; Cuadro 2.5). Estos resultados sugerirían la pérdida de algunos compuestos solubles y rápidamente fermentescibles durante el procedimiento de molienda. En coincidencia con esto, la fase *Lag* fue mayor en P y M respecto de E (P<0.05). Así mismo, los SL tuvieron una fase *Lag* 4 veces mayor que los SGgr como consecuencia de los menores *a* y *c*

(0.4 y 0.1 h, respectivamente; $P < 0.05$). La PG potencial estimada como $a+b$ no mostró diferencias entre E, P y M en coincidencia a lo ya mencionado para PGA 72h (Cuadro 2.3); del mismo modo, se detectaron las diferencias entre forrajes, $a+b$ y PGA 72h fueron un 24% mayores en SGgr ($P < 0.001$).

Se estudiaron los efectos principales sobre MSD, FDND y FDAD ya que la interacción Tratamiento x Forraje no fue significativa ($P > 0.05$, Cuadro 2.6). Los SGgr tuvieron mayor MSD que los SL, pero no se debió a una mayor FDND y DFAD, sino probablemente a la presencia del almidón en el contenido celular que se asume como completamente fermentable. Los tratamientos E y P no mostraron diferencias entre ellos y tuvieron menores MSD, FDND y FDAD que M (10% menos, $P < 0.05$ para MSD; 20% menos, $P < 0.01$ para FDND y FDAD). Los resultados concluyen en el mismo sentido que lo observado para PGA a las 12 y 14 horas.

2.4.3. Experimento 2

La interacción Tratamiento x Forraje resultó significativa para PGA a las 12, 24, 48 y 72 horas y se detalla en el Cuadro 2.8. Sin embargo la PGA del SGgr fue siempre numéricamente mayor que en SL, tanto para S como F. La PGA 12 h de SGgr y 12, 24, 48 y 72 h de SL fue inferior para S respecto de F aunque con una importante variación (e.g. desde 50 hasta 80% menos, PGA 12h SL y SGgr, respectivamente; Cuadro 2.7). Hasta las 24 horas en SL se observó que F fue 2.1 y 3.5 veces mayor que S (12 y 24 horas, respectivamente; $P < 0.001$) y a partir de las 48 horas la magnitud de las diferencias disminuyó a 1.2 veces pero aún fueron significativas ($P < 0.01$). Las diferencias observadas para SGgr entre F y S a las 12 horas (1.2 veces F respecto de S) se fueron reduciendo a tiempos mayores de incubación. A las 24, 48 y 72 h SGgr no presentó diferencias entre los tratamientos,

aunque F a las 24 horas fue numéricamente superior a S con 10% más de PGA (P=0.112).

La interacción Tratamiento x Forraje para las variables de cinética de PG no fue significativa (P>0.10); a diferencia de los medido en PGA 72h donde F fue mayor que S para SL, mientras que para SGgr no hubo diferencias. Los *b* y *a+b* de los dos grupos de forrajes fueron diferentes, SGgr fue mayor a SL (P<0.05) y consistente con lo mencionado para PGA 72 h.

Cuadro 2.7 Producción de gas acumulada a las 12, 24, 48 y 72 horas (PGA; ml/g MS) durante la incubación in vitro de muestras secas y frescas de forrajes ensilados de gramíneas con grano y pasturas base leguminosas.

		PGA 12 ³	PGA 24	PGA 48	PGA 72
Forraje ensilado de gramíneas con grano (SGgr)					
	Seco	72	122	172	199
	Fresco	89	134	175	197
	EEM ¹	4.1	5.2	5.9	6.2
	Significancia	**	NS	NS	NS
Forraje ensilado de pastura base leguminosas (SL)					
	Seco	30	63	103	127
	Fresco	64	102	136	157
	EEM ¹	5.1	6.5	7.3	7.8
	Significancia	***	***	**	**
Estadístico					
Tratamiento	F _{1,102}	28.8	18.2	7.2	4.2
Forraje	F _{1,102}	52.6	60.6	65.8	63.0
Tratamiento x Forraje	F _{1,102}	3.4	5.2	4.9	5.0
Significancia ²					
Tratamiento		***	***	***	**
Forraje		***	***	***	***
Trat x Forraje		†	**	**	**

¹ EEM = error estándar de la media. ² NC: no corresponde; NS: no significativo; †, P<0.10; *, P<0,05; **, P<0.01; ***, P<0.001. ³ Medias por factores principales S, 56; F, 79; SGgr, 81 y SL, 47 ml/g MS. Letras diferentes en la misma columna difieren estadísticamente P<0.05, Tukey.

La cinética de PG para S y F presentó diferencias significativas en Tmax y TTmax (Cuadro 2.8) como en los parámetros estimados del modelo de (Ørskov y McDonald, 1979; Cuadro 2.9; $P < 0.001$). Se observó que F tuvo una Tmax 23% mayor y que ésta ocurrió 4 horas antes que en S (TTmax 5.6 y 9.7 h F y S, respectivamente; Cuadro 2.8). En el mismo sentido, la modelación de la cinética de PG mostró que en F la fase *Lag* fue la mitad que para S (0.5 y 1.1 h, respectivamente; Cuadro 2.9) y que *c* fue un 30% mayor (0.04 y 0.03 h⁻¹, respectivamente). Por otro lado, la PG asociada a la digestión de la fracción potencialmente degradable (*b*, ml/g MS) y la estimación *a+b* fueron menores en F que en S (Cuadro 2.9) en contraposición a lo registrado en PGA.

Cuadro 2.8 Tasa horaria máxima de producción de gas in vitro (Tmax; ml/g MS.h⁻¹) y tiempo de ocurrencia de Tmax (TTmax; h) de sustrato seco y fresco (S y F) de forrajes ensilados.

		Tmax	TTmax
Tratamiento			
	Seco (s)	6.9	9.7
	Fresco (F)	8.5	5.6
	EEM ¹	0.46	0.67
Forraje ensilado			
	Gramíneas con grano (SGgr)	9.1	6.7
	Pastura base alfalfa (SL)	5.4	9.2
	EEM ¹	0.57	0.86
Estadístico			
	Tratamiento	F _{1, 102}	11.8
	Forraje	F _{1, 102}	52.6
	Tratamiento x Forraje	F _{1, 102}	2.3
Significancia ²			
	Tratamiento	***	***
	Forraje	***	***
	Tratamiento x Forraje	NS	NS

¹ EEM = error estándar de la media. ² NC: no corresponde; NS: no significativo; †, $P < 0.10$; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. Letras diferentes en la misma columna difieren estadísticamente $P < 0.05$, Tukey.

En resumen, F mostró un comienzo temprano de PG (*i.e.* estimado 30 minutos) y una mayor velocidad que S, aunque esto no permitió alcanzar mayor PGA a partir de las 24 horas de incubación. Por lo tanto, las mayores diferencias entre F y S se registraron dentro de las primeras 12 horas de incubación *in vitro*, siendo las variables más afectadas PGA 12h, fase *Lag*, *c*, Tmax y TTmax.

Cuadro 2.9 Parámetros *a*, *b* y *c* del modelo exponencial que describe la cinética de producción de gas (PG) *in vitro* (Ørskov y McDonald, 1979) y tiempo de retardo hasta el comienzo de la misma (*Lag*, h) del Experimento 2.

		<i>a</i> ¹	<i>b</i> ²	<i>c</i> ³	<i>Lag</i>	
Tratamiento						
	Seco (S)	-6.5	212	0.032	1.1	
	Fresco (F)	-3.5	193	0.043	0.5	
	EEM ⁴	0.63	6.3	0.0020	0.11	
Forraje ensilado						
	Gramíneas con grano (SGgr)	-6.9	221	0.040	1.0	
	Pastura base alfalfa (SL)	-2.2	174	0.033	0.6	
	EEM ⁴	0.61	5.2	0.0020	0.14	
Estadístico						
	Tratamiento	F _{1, 102}	13.9	6.4	25.2	16.8
	Forraje	F _{1, 102}	36.7	45.2	8.1	5.9
	Tratamiento x Forraje	F _{1, 102}	0.2	0.1	1.9	2.0
Significancia⁵						
	Tratamiento	***	**	***	***	
	Forraje	***	***	***	**	
	Tratamiento x Forraje	NS	NS	NS	NS	

¹ PG de la fracción soluble (ml/g MS); ² PG de la fracción potencialmente degradable (ml/g MS); ³ tasa de degradación de *b* (ml/h); ⁴ EEM = error estándar de la media; ⁵ NC: no corresponde; NS: no significativo; †, P<0.10; *, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001. Letras diferentes en la misma columna difieren estadísticamente P<0.05, Tukey.

La interacción Tratamiento x Forraje (Trat x Forr) resultó significativa para las desapariciones (*i.e.* MSD, FDND y FDAD) y las PGA a las 24, 48 y 72 horas. En SL no se observaron diferencias entre los tratamientos S y F en ninguna de las fracciones analizadas (MSD, FDND y FDAD; P>0.05; Cuadro 2.10), siendo los

valores promedio 565, 436 y 450 g/kg para MSD, FDND y FDAD, respectivamente. Por otro lado para SGgr la tendencia observada en MSD indicó que F fue menor (696 y 666 g/kg MS S y F, respectivamente; $P=0.051$) al igual que las FDND y FDAD que fueron 18 % inferiores respecto de S ($P<0.001$; Cuadro 2.10). Así mismo, tanto SL como SGgr presentaron MSD mayores que FDND y FDAD pudiendo ser explicado esto por la mayor degradabilidad del contenido celular que se acerca a 98% respecto de la fracción fibrosa que ronda un valor promedio de 50% dependiendo de la composición e interacción entre sus componentes (Goering y Van Soest, 1970).

Cuadro 2.10 Desaparición de la materia seca (MSD), aFDN_{mo} (FDND) y FDA_{mo} (FDAD) a las 72 horas de incubación (g/kg MS, FDN ó FDA según corresponda) durante la incubación *in vitro* de muestras secas y frescas de forrajes ensilados de gramíneas con grano y pasturas base leguminosas.

		MSD	FDND	FDAD
Forraje ensilado de gramíneas con grano				
	Seco	696	551	526
	Fresco	666	452	436
	EEM ¹	10.7	11.8	15.4
	F _{1,102}	3.9	36.0	17.1
	Significancia	†	***	***
Forraje ensilado de pastura base leguminosas				
	Seco	547	438	450
	Fresco	582	433	449
	EEM ¹	13.5	14.7	19.4
	F _{1,102}	3.3	0.04	0.00
	Significancia	†	NS	NS
Estadístico				
Tratamiento	F _{1,102}	0.04	15.2	6.9
Forraje	F _{1,102}	92.3	24.6	3.3
Tratamiento x Forraje	F _{1,102}	7.0	12.8	6.4
Significancia ³				
Tratamiento		NS	***	*
Forraje		***	***	†
Tratamiento x Forraje		**	***	*

¹ EEM = error estándar de la media. ³ NC: no corresponde; NS: no significativo; †, $P<0.10$; *, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P<0.001$. Letras diferentes en la misma columna difieren estadísticamente $P<0.05$, Tukey.

En SL la FDND y FDAD (*i.e.* fracciones fibrosas) fueron similares y no se observaron diferencias entre S y F. Esto sugiere que la degradabilidad de los principales constituyentes de la fibra (*i.e.* celulosa y hemicelulosa) fue de igual magnitud y que el secado tampoco la modificó. Sin embargo, en SGgr la FDND y FDAD fueron similares entre sí pero mostraron diferencias entre tratamientos. S tuvo cerca de 100 g/kg más que F (551 y 452 g/kg FDN y 526 y 436 g/kg FDA para S y F, respectivamente; $P < 0.0001$). Cabe destacar que mientras en SL las desapariciones de sustrato para S y F no fueron diferentes, las PGA sí; en cambio en SGgr fueron a la inversa, las desapariciones fueron distintas y las PGA no. En general se asocia que a mayor desaparición de sustrato, mayor será la PGA. La falta de coincidencia de los tratamientos para la relación entre estas variables podría estar asociada a la diferente producción de ácidos de fermentación que generan cambios en la magnitud del gas indirecto por desplazamiento de buffer.

La composición de los AGV producidos durante la incubación *in vitro* a las 72 horas se detalla en el Cuadro 2.11. La interacción Tratamiento x Forraje fue significativa solo en But ($P = 0.0023$); sin embargo, F fue siempre mayor que S para ambos tipos de forraje, 3 veces para SGgr y 2 veces para SL. F y S resultaron diferentes en Ac, Pro y Ac/Pro. En F, Ac fue un 23% menor y Pro un 25% mayor respecto de S dando como resultados una relación Ac/Pro menor en F (1.9 y 3.1 en F y S, respectivamente).

Cuadro 2.11 Composición de ácidos grasos volátiles (AGV) producidos durante la incubación *in vitro* a 72 h de sustrato fresco y seco de ensilajes de gramínea con grano y en base a alfalfa.

		Ac ¹	Pro	But	Ac/Pro	AGV _{Total}	
		(mol/100 mol)				(mmol/g MS)	
Tratamiento							
	Seco (S)	70.2	23.1	6.7	3.1	3.4	
	Fresco (F)	53.9	28.9	17.2	1.9	3.5	
	EEM ²	1.24	0.61	0.84	0.09	0.48	
Forraje ensilado							
	Gramíneas con grano (SGgr)	58.8	27.0	14.2	2.3	3.7	
	Pastura base alfalfa (SL)	65.3	24.9	9.8	2.7	3.1	
	EEM ²	1.42	0.70	0.96	0.11	0.55	
Estadístico							
	Tratamiento	F _{1, 102}	105.5	53.2	96.7	103.7	0.1
	Forraje	F _{1, 102}	16.7	7.1	17.0	13.8	0.6
	Tratamiento x Forraje	F _{1, 102}	2.9	1.4	11.6	0.5	1.4
Significancia³							
	Tratamiento	***	***	***	***	NS	
	Forraje	***	*	***	***	NS	
	Tratamiento x Forraje	NS	NS	** ⁴	NS	NS	

¹ Ac, ácido acético; Pro, ácido propiónico, But, ácido butírico; ² EEM = error estándar de la media; ³ NS: no significativo; †, P<0.10; *, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001. ⁴ SGgr F 21.2 y S 7.1% (EEM: 0.76; P<0.0001) y para SL F 13.2 y S 6.3% (EEM: 1.49; P=0.0011)

Los AGV totales fueron iguales en F y S (Cuadro 2.11), como así también la cantidad producida de Ac y Pro (1.9 y 2.4 mmol Ac/g MS, 1.0 y 0.8 mmol Pro/g MS para F y S, respectivamente). Por otro lado, en SGgr F produjo 0.9 mmol But/g MS, la cantidad más alta respecto de los otros tratamientos. La mayor proporción de AGV producido durante la incubación fue ácido acético (Ac) en todos los casos con más de 50% del total, seguido por el propiónico (Pro) dentro del 20 a 30%, mientras que el butírico (But) se encontró entre 5 y 20%.

2.5. Discusión

La amplia variabilidad encontrada en los resultados de las fracciones analíticas que describen la composición química de las muestras en estudio (CV promedio 32 y 36% para SGgr y SL, respectivamente) permitiría asegurar que las conclusiones alcanzadas podrían ser extrapoladas a un gran número de muestras de forraje ensilado. La fracción de almidón en SGgr y SL y LDA_{AS} en SGgr fueron las más variables. En el grupo SGgr el ensilaje de avena granada fue el que generó las mencionadas variaciones por tener el registro mínimo de almidón y los valores más altos de aFDN_{mo}, FDA_{mo} y LDA_{AS}. Esto sugiere que el ensilaje de avena se cosechó en un estado muy avanzado de madurez y posiblemente con alto nivel de pérdida de grano durante la cosecha (e.g. pérdida mecánica). Por otro lado en el grupo SL, el almidón fue la fracción más variable (123% CV) aunque siempre constituyó una parte minoritaria (máximo 34 g/kg MS). El almidón en los forrajes ensilados de pastura puede ser fermentado durante el almacenamiento y así disminuir su proporción (Jaurena y Pichard, 2001). Por lo tanto las condiciones de almacenamiento del ensilaje (e.g. pH principalmente) así como la composición del forraje original podrían ser responsables de la concentración del almidón (Muck, 1988), aportado en este caso por la alfalfa como una de las especies forrajeras predominante en la mezcla de las pasturas (Muck, 1988; Xiccato y otros, 1994; Jaurena y Pichard, 2001).

Los tratamientos aplicados en el Experimento 1 no permitieron alcanzar diferencias entre E y P en la distribución del tamaño de partículas (Cuadro 2.2). Esto explicaría que no fueron encontradas diferencias entre ellos en los resultados reportados para PGA, parámetros que describen la cinética de PG, Tmax, TTmax y desapariciones de MS, FDN y FDA donde (Cuadro 2.3; Cuadro 2.4; Cuadro 2.5;

Cuadro 2.6). Por otro lado, las diferencias observadas entre E y P con respecto a M para las mismas variables fueron significativas. El incremento de la fracción de partículas menores a 1.19 mm pareció ser el factor más importante y responsable de los cambios registrados en el estudio *in vitro*.

La reducción del tamaño de partícula tiene como principal objetivo garantizar la homogeneidad de las muestras y reducir así la variación en los resultados. Las variables analizadas cumplieron con los supuestos de homogeneidad de varianza, independencia entre los errores y normalidad ($P > 0.05$). Sin embargo, en la Figura 2.1 se observa una tendencia a mayores coeficientes de variación (CV) para E respecto de M en MSD y DFND. Siendo los resultados más altos los de FDND, donde E alcanzó valores de 1 y 3% CV mientras que M no superó el 1%. Resultados similares fueron reportados por Ferreira y Mertens (2005). De todos modos, los mayores CV registrados para E podrían ser considerados adecuados para la evaluación de muestras de ensilaje de rápido procesamiento ya que no superaron el 3 %.

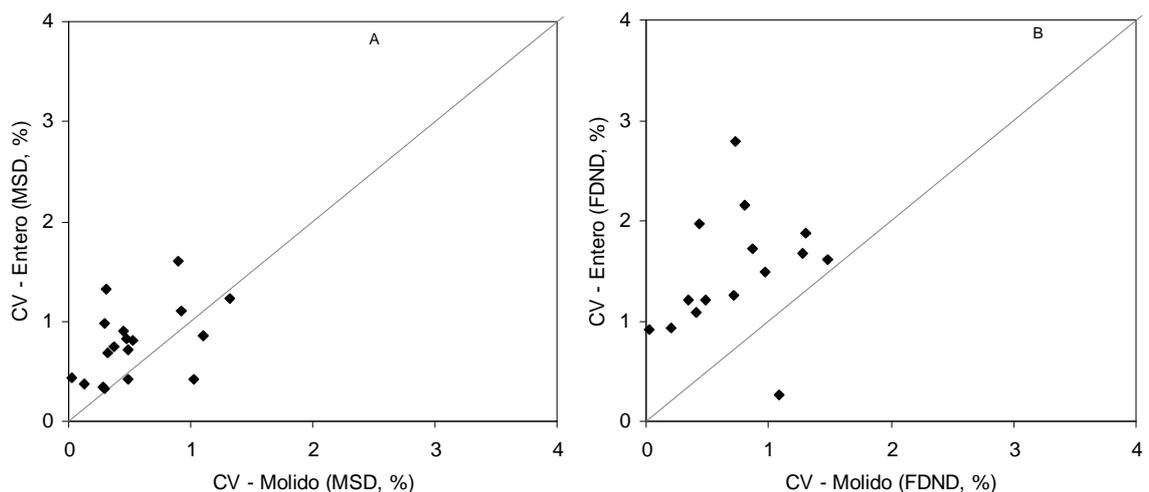


Figura 2.1 Relación entre los coeficientes de variación de los ensilajes enteros y molidos (E y M, respectivamente; $n = 18$) de la materia seca y fibra en detergente neutro desaparecidas (A: MSD; B: FDND).

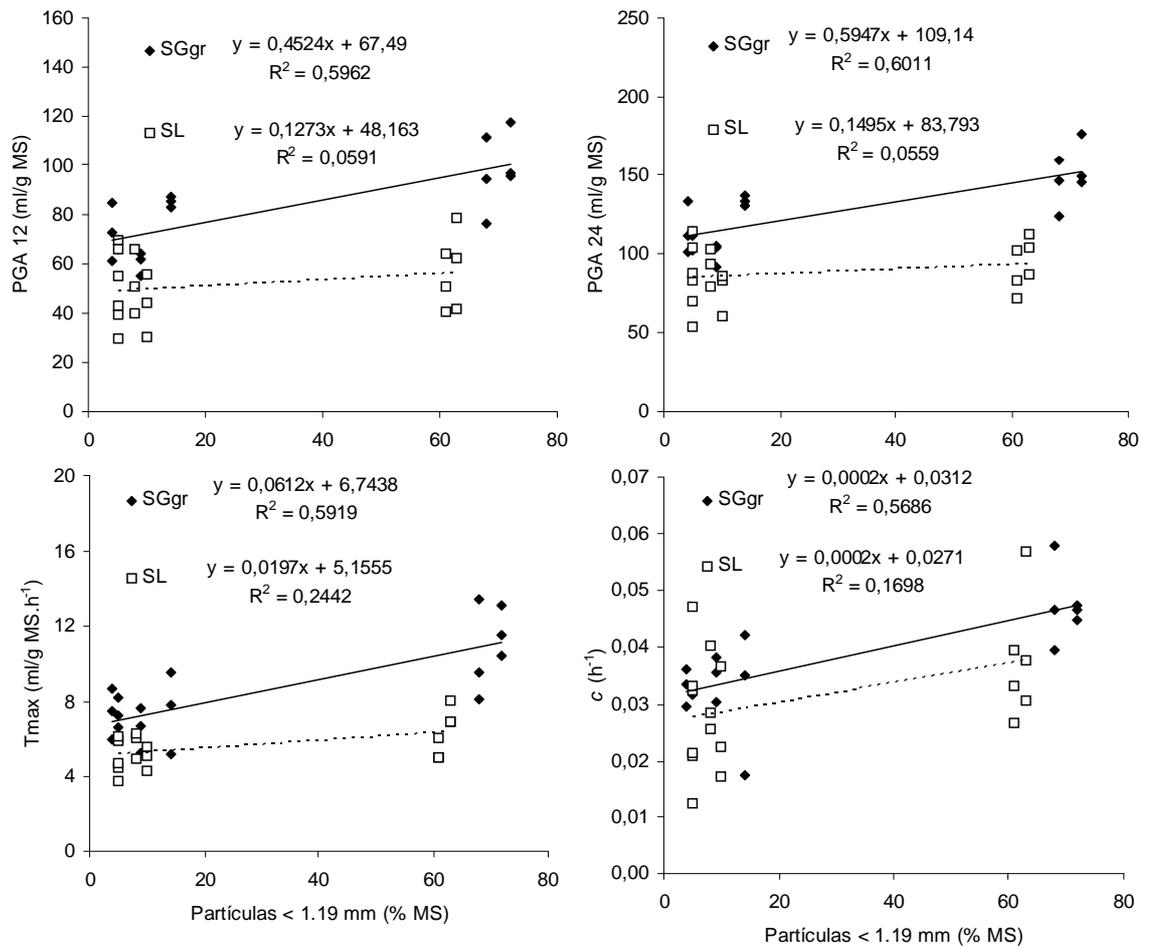


Figura 2.2 Relación entre la producción de gas acumulada a las 12 y 24 h de incubación (PGA 12; ml/g MS), tasa y tasa máxima de PG (c y T_{max} ; ml/g MS.h⁻¹) y la cantidad de materia seca con partículas menores a 1.19 mm en forrajes ensilados con grano y pasturas a base de leguminosas (♦, SGgr; □ SL, respectivamente).

El mayor impacto ejercido por el aumento de la fracción de partículas menores a 1.19 mm en M se observó para SGgr en PGA 12 y 24 h, T_{max} y parámetro c (Figura 2.2). Valentin y otros (1999) también informaron con PG efectos significativos sobre c por reducir las partículas de 3 a 1 mm en ensilajes de maíz aunque con valores superiores a los del presente trabajo (0.03-0.04 vs. 0.071-0.069 h⁻¹) explicados probablemente por el uso de material seco en estufa y no fresco. Tanto Menke y Steingass (1988) como Lowman y otros (2002) también reportaron incrementos en la tasa de producción de gas cuando el tamaño de las partículas del

sustrato seco disminuía. Mientras que sobre las variables determinadas a tiempos mayores de 24 horas de incubación el efecto del tamaño de partícula se diluye (*i.e.* PGA 48 y 72 h; MSD, FDND, FDAD, $P < 0.10$).

La aceleración de la PG por aumento de la molienda ocurrió tanto para SGgr como SL. Sin embargo, el impacto para SGgr fue mucho mayor probablemente debido a la molienda de los granos presentes en el material. Ferreira y Mertens (2005) reportaron para ensilajes de maíz que el 52% de total del almidón estaba presente en partículas mayores a 4.75 mm. En el mismo sentido Niwińska (2009) reportó menor digestión ruminal *in situ* en granos de cebada al aumentar el tamaño de partícula de 1 a 5.7 mm. Además, cuanto mayor era esa fracción la diferencia en digestibilidad entre del material molido a 1 mm y el entero aumentaba (72 y 77 % MSD, respectivamente; $P = 0.014$). La molienda de los granos por el procesado sería la causa principal de los incrementos en c y T_{max} para SGgr. Mientras que para SL el aumento en c se explicaría por un aumento de la FDND; como así también lo reportan Ferreira y Mertens (2005) quienes observaron a las 24 horas *in situ* un aumento en la degradabilidad de la fracción fibrosa, posiblemente por mayor superficie expuesta debido a la molienda que permite un aumento en la velocidad de ataque de los microorganismos ruminales. Es generalmente reconocido que a menor tamaño de partícula del sustrato se incrementa la superficie disponible para la degradación microbiana (Williams, 2000). Resultados similares fueron reportados por Damiran y otros (2008) en henos de gramíneas y pajas donde encontraron un aumento de MSD y FDND (Daisy II) cuando el material fue molido a 1 mm respecto de 2 mm ($a_{FDN_{mo}} > 580$ g/kg MS).

En forrajes ensilados de planta entera de maíz secados en estufa a 55 °C, Ferreira y Mertens (2005) encontraron un aumento en FDND del 30% para el forraje

molido a 1 mm respecto del entero (37 a 48 %, respectivamente) similar a los resultados ya reportados (33% de incremento entre E y M; Cuadro 2.6). Sin embargo, estos autores no encontraron diferencias en MSD como en el presente trabajo (568 y 634 g/kg MS para E y M, respectivamente – $P < 0.05$) posiblemente provocadas por el secado de la muestra antes de la incubación y con la consecuente pérdida de compuestos volátiles y cocción del almidón que aumenta su velocidad de digestión. Por otro lado, Valentin y otros (1999) también encontraron un aumento de 17% en la degradabilidad efectiva con 3 mm respecto de 5 mm tanto para sustrato fresco como secado en estufa (e.g. aumenta c en PG) pero detectaron diferencias en la fracción no degradable.

En incubaciones *in vitro* con forraje de alfalfa Caramella y otros (2006) encontraron que a partir de las 12 horas F produjo un 12% mas gas que S y alcanzó a las 72 horas 8% mas MSD; aunque no se detectaron diferencias entre los parámetros de la cinética de PG debido probablemente al alto contenido celular del forraje de alfalfa (355 g/kg MS a FDN_{mo}). Bernardos (2008) encontró en forrajes ensilados que S de la fracción vegetativa de plantas de maíz producía 8% menos gas, 18% menos Tmax y 3 horas de retraso en TTmax. Mientras que para la fracción grano del ensilaje, S produjo 8% mas gas, 25% mayor Tmax y una hora de antelación en TTmax. Los resultados sugieren que las dos fracciones de tejido que forman parte de los SGgr (vegetativo y grano) presentan respuestas encontradas al ser secados en estufa, el almidón se gelatiniza y aumentaría su degradable y la fibra se condensa y la reduciría (Owens y otros, 1986; Theurer, 1986; Huntington, 1997). En el presente trabajo en acuerdo con Caramella y otros (2006) y Bernardos (2008), el tratamiento S provocó una disminución de Tmax, mayor TTmax (Figura 2.3) respecto de F, observándose la mayor diferencia en SL. En el mismo sentido, se registró un menor c y mayor Lag en S respecto de F para los dos grupos de

forrajes (Figura 2.4). Los resultados expuestos y lo descrito por Bernardos (2008) y Sijnienski y otros (2005) sugieren que para los SGgr a tiempos de incubación superiores a 48 horas jugaría un rol mas importante la disminución de la degradabilidad de la fracción fibrosa que el aumento de la almidonosa cuando se incubaba el ensilaje entero (fracciones vegetativa + grano) y secado en estufa. Esto fue confirmado por Tandecarz (2007) quien observó que a las 12 horas de incubación había desaparecido 980 g/kg de almidón y a las 24 horas solo se había incrementado un 1% más. Además también fue observado para SL con alta fracción fibrosa y bajo contenido de almidón (e.g. 562 g $a_{FDN_{mo}}$ /kg MS y 10 g almidón/kg MS) un detrimento tanto en PGA como en la tasa de PG.

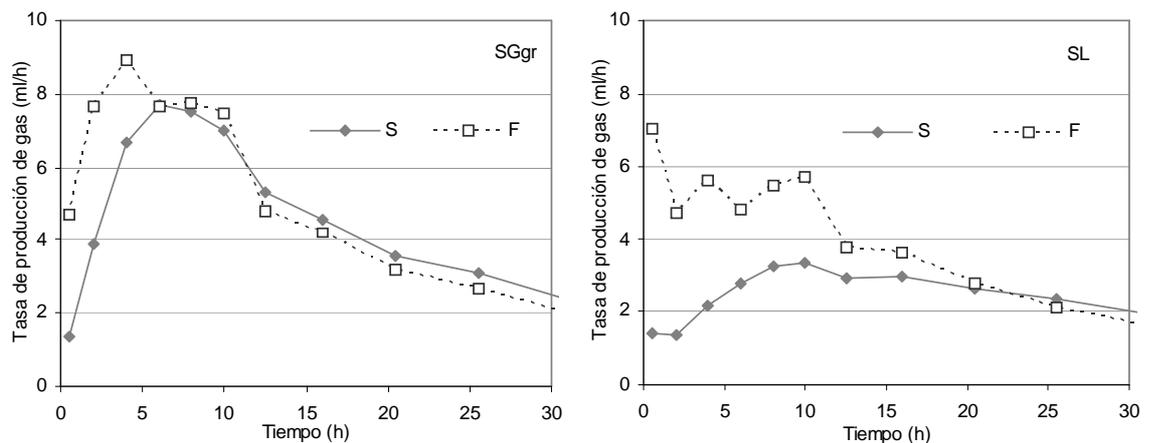


Figura 2.3 Tasas horarias de producción de gas (ml/h) en función del tiempo de ensilaje de gramíneas con grano y pasturas base leguminosas (SGgr y SL) para sustrato fresco (---□--- F) y seco en estufa (—◆— S).

Cuando se compararon los tratamientos F y S en SGgr la respuesta contrapuesta que se observó entre MSD y FDND podría estar explicada por una diferente susceptibilidad a la degradación de los componentes almidonosos del forraje. Bernardos (2008) observó que la MSD cuando se incubaron granos de maíz ensilados fue mayor en sustrato seco en estufa (941 vs 915 g/kg S y F,

respectivamente – $P=0.0171$) a las 12 horas. En cambio cuando se incubó material vegetativo de ensilaje de planta entera de maíz la MSD fue menor para el sustrato seco (552 vs 575 g/kg S y F, respectivamente – $P=0.0286$). Esto podría explicar las menores diferencias registradas entre F y S dentro de SGgr; a comparación de las amplias diferencias reportadas entre los tratamientos en SL donde el sustrato almidonoso, que es el que aumentaría su degradabilidad con el secado, es casi inexistente.

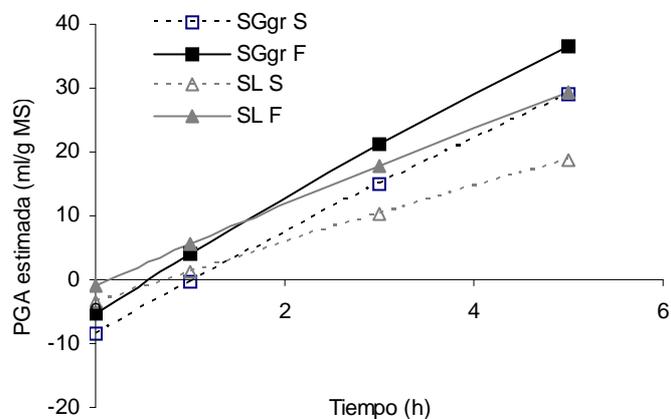


Figura 2.4 Producción de gas acumulada (PGA) estimada por el modelo de Ørskov y McDonald (1979) en función del tiempo de incubación *in vitro* para forrajes ensilados de gramíneas con grano y pasturas base leguminosas con sustrato fresco y seco (SGgr y SL; F y S).

Bernardos (2008) no encontraron diferencias entre F y S en MSD, FDND y FDAD de la fracción vegetativa de ensilajes de maíz a las 72 horas de incubación *in vitro* (700, 600 y 600 g/kg MSD, FDND y FDAD, respectivamente) asociado posiblemente a la menor concentración de LDA_{AS} en las muestras analizadas respecto a las del presente trabajo (15 vs. 29 g/kg MS, respectivamente). En el mismo sentido, los valores de desaparición fueron algo mayores a los del presente trabajo (697, 596 y 611 g/kg de MSD, FDND y FDAD). Por otro lado, los granos del ensilaje de maíz secados en estufa mostraron mayor MSD que F a las 24 horas. Estas diferencias no se detectaron a tiempos superiores de incubación.

El secado en estufa de los ensilajes de gramíneas con grano y base leguminosas modifica la MSD y retrasa la cinética de PG del alimento incubado *in vitro*. En los tratamientos S y F se detectaron diferencias en la relación lineal establecida entre la PGA y la MSD (Figura 2.5). La cantidad de gas producido por cada gramo de MSD fue mayor en S (0.463 y 0.302 para S y F, respectivamente; $P < 0.10$). La ordenada al origen de S fue -125 ml/g MS y diferente de cero ($H_0 = 0$; $P = 0.009$) mientras que para F fue -15 ml/g MS sin ser diferente de cero ($H_0 = 0$; $P = 0.717$).

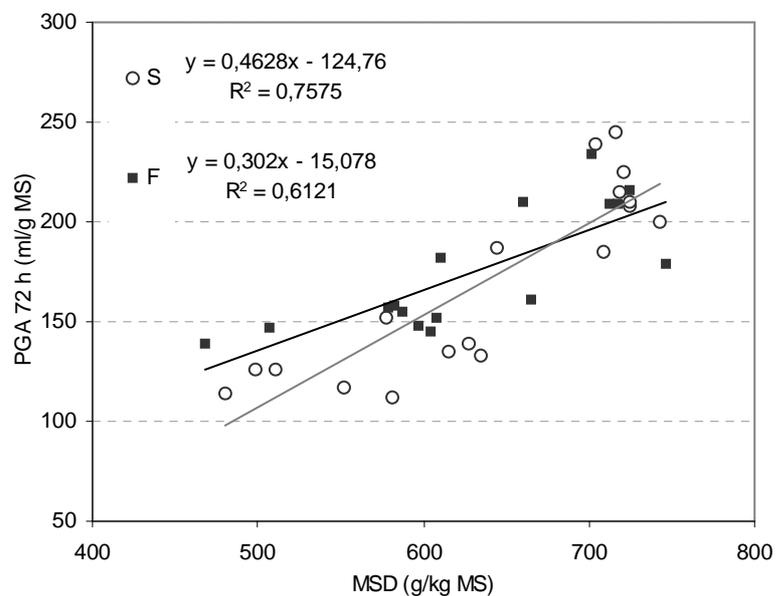


Figura 2.5 Relación entre producción de gas acumulada a las 72 horas de incubación (PGA 72 h, ml/g MS) y la materia seca desaparecida (MSD, g/kg MS) de sustrato seco y fresco (S y F, respectivamente) de forrajes ensilados.

Las diferencias mencionadas en las pendientes entre S y F podrían ser explicadas por los cambios observados en la composición de AGV producidos en la incubación *in vitro*. S y F no presentaron diferencias en AGV total (3.4 y 3.5 mmol/g MS; $P > 0.869$) pero si en la composición de los mismos; S produjo 70% de Ac mientras que F 54% ($P < 0.0001$; Cuadro 2.11). De los AGV medidos, el Ac es el que más cantidad de dióxido de carbono (CO_2) libera por mol de ácido producido, luego

se encuentra el But y por último el Pro (4, 3 y 2 moles de CO₂; Beuvink y Spoelstra, 1992). Por lo expuesto sería de esperar que a mayor proporción de ácido acético en los AGV totales sería también mayor el incremento de la PGA por unidad de MSD.

En contraposición a lo observado en este trabajo Calabrò y otros (2005) encontraron con ensilajes de gramíneas con grano que al incubar forraje fresco la proporción de Ac fue numéricamente mayor y con esto una relación Ac/Pro más alta (2.8 vs. 2.5 F y S, respectivamente) que con forraje seco, aunque sin poder detectar diferencias estadísticamente significativas. Una diferencia importante entre ambos trabajos fue la especie rumiante usada como donante del licor ruminal (e.g. ovinos vs. búfalos en el trabajo de Calabrò y otros (2005)). Por otro lado, la relación Ac/Pro reportadas en este trabajo se encuentran dentro del rango publicado por Beuvink y Spoelstra (1992) para sustratos puros de almidón y celulosa (2.80 y 1.23, respectivamente). La similitud obedecería a que los forrajes usados están compuestos por proporciones variables de los mencionados sustratos.

2.6. Conclusión

El secado en estufa de los ensilajes de gramíneas con grano y de pasturas base leguminosas modifica la MSD y retrasa la de PG del alimento incubado *in vitro* aumentando la fase *Lag*, disminuyendo las tasas de PG y provocando cambios en la composición de los AGV producidos. El tamaño de partícula del sustrato incubado en fresco afectó las desapariciones de MS, FDN y FDA, la tasa de PG y la PGA hasta las 24 horas de incubación, provocando un aumento en dichas variables cuando la proporción de partículas de menos de 1.19 mm fue mayor al 60% del total del forraje. Únicamente la PGA 72 horas y la fracción *b* de PG no presentaron diferencias. Por lo tanto, para el estudio y comparación de forrajes ensilados mediante la técnica de producción de gas y desapariciones de sustrato *in vitro* sería recomendable el uso de sustrato fresco y garantizar la reducción del tamaño de partícula en la molienda con hielo seco.

Capítulo 3.

Contribución de los residuos insolubles en agua y detergente neutro a la desaparición *in vitro* de los forrajes ensilados

3.1. Resumen

La importancia cuali y cuantitativa así como la variabilidad que poseen las fracciones de los CHO en los forrajes ensilados pone de manifiesto que el análisis de la cinética de fermentación de cada una de ellas, permitiría mejorar la comprensión global del proceso de digestión. El objetivo fue analizar el proceso de degradación *in vitro* de los forrajes y sus residuos insoluble en agua y detergente neutro (RIA y RIDN) de ensilajes de gramíneas con grano y pasturas base leguminosas (SGgr y SL) y la contribución de dichos residuos al ensilaje completo. Las contribuciones a la PGA y MSD de los RI no fueron equivalentes y las curvas de substracción solo se pudieron calcular hasta las 24 horas. El RIA produjo aproximadamente el 95% de la PGA 72 h del sustrato completo mientras que la MSD solo alcanzó el 55%; en tanto que para el RIDN los valores fueron 70% de la PGA 72 h y 40% de la MSD. Las diferencias fueron explicadas al menos en parte por las proporciones de AGV producidos en cada caso. Las variables Lag, Tmax y TTmax de RIA mostraron una alta correlación con MSD y la tasa de digestión de c, siendo la de TTmax con efecto negativo. Mientras que Lag y Ac/Pro de RIDN también se correlacionaron negativamente con MSD y la tasa de digestión de C. Estas contribuciones podrían resultar de gran importancia a la hora de predecir la digestión o aporte energético de los ensilajes.

3.2. Introducción

Los forrajes ensilados son alimentos que se incluyen en las dietas de rumiantes generalmente como fuente de energía y en algunas ocasiones como aporte de fibra efectiva. Sin embargo, aquellos que fueron confeccionados con forraje de leguminosas y de gramíneas perennes, en algunas ocasiones pueden presentar contenidos de proteína bruta superiores a 120 g/kg MS que permitiría cubrir los requerimientos de animales rumiantes en mantenimiento o bajo nivel de producción.

Los hidratos de carbono (**CHO**) son la principal fuente de energía contenida en los alimentos aunque presentan diferente susceptibilidad a la digestión dependiendo de las características de las moléculas. La susceptibilidad a la hidrólisis depende de la naturaleza de la unión glucosídica (e.g. uniones α ó β y 1-4 ó 1-6), fuerzas intermoleculares, uniones entre cadenas, tamaño molecular y afinidad con el medio. A los CHO se los puede clasificar en estructurales y no estructurales (**CE** y **CNE**, respectivamente); siendo los CE aquellos que integran la pared celular de los vegetales con una amplia variación en digestibilidad entre sus componentes pero siempre inferior a la de los CNE. En estos últimos se incluyen, entre otros, los azúcares solubles en agua y el almidón como los más importantes.

Los CHO presentes en los forrajes ensilados son principalmente estructurales (*i.e.* hemicelulosa y celulosa, componentes de pared celular **-PC-** y pectinas y β -glucanos, fibra soluble), aunque en aquellos confeccionados con gramíneas anuales el almidón juega un importante rol como sustrato fermentescible. La variabilidad en composición detectada para los ensilajes fue reconocida por varios autores y citada en este mismo trabajo en el Capítulo 2. (Stekar y otros, 1991; NRC, 2001; Ashbell y otros, 2002; Guaita y Fernández, 2005; Jaurena y

Danelón, 2006). La especie vegetal originaria, el estado fenológico del forraje al momento del corte, el contenido de humedad del forraje, la estructura de almacenamiento, el tamaño de picado y el nivel de compactación son los factores principales causantes de la variabilidad en la calidad nutricional de los forrajes ensilados (Muck, 1988; McDonald y otros, 1991a; Ruppel y otros, 1995).

Además, entre los CHO se debe mencionar que la velocidad de degradación también difiere. Doane y otros (1997a) encontraron que la fracción soluble en detergente neutro redujo la tasa de degradación así como su extensión a causa del ensilado en forraje de alfalfa y cebadilla. También, existen importantes diferencias entre almidones de cereales de invierno y verano (Ørskov, 1986), como así también entre PC de gramíneas y leguminosas o incluso entre los componentes de la misma (*i.e.* celulosa y hemicelulosa). Dentro de las diferencias más importantes entre almidones se pueden mencionar la velocidad y la extensión de la degradación ruminal. Mientras que en PC, a las mencionadas variables se suma el tiempo de retardo hasta que comienza la digestión (*i.e.* Fase *Lag*) debido al proceso de colonización de las bacterias celulolíticas sobre las partículas de sustrato. Este proceso es complejo e implica la adherencia de las bacterias a las partículas de alimento, la producción de una sustancia mucilaginoso que la protege (*i.e.* glycocalyx) y la liberación de la batería de enzimas que catalizan la hidrólisis de la PC (Miron y otros, 2001; Lynd y otros, 2002).

Muchos estudios han mostrado que el primer factor que influencia la digestibilidad de los forrajes y su valor energético es la digestibilidad de la PC (Deinum, 1988; Wolf y otros, 1993; Van Soest, 1994; Jung y Allen, 1995; Argillier y otros, 1996). La extensión de la degradación de la PC depende entre otros factores, de la proporción de cada una de las sustancias que la componen (*i.e.* hemicelulosa,

celulosa y lignina) y de la cantidad y tipo de uniones químicas establecidas entre ellas, así como cercanía en la estructura física de la matriz que forma la PC en su disposición espacial (Sawai y otros, 1983; Chesson y Forsberg, 1988). Es ampliamente aceptado que la digestibilidad de la celulosa y de la hemicelulosa está negativamente afectada por la cantidad de lignina depositada en la PC (Sullivan, 1966; Van Soest, 1994).

La contribución de las fracciones rápida y lentamente degradables a la digestión del forraje completo permitiría la identificación de las características potencialmente limitantes para la digestión. En el caso específico de los forrajes ensilados, el contenido celular (CC) contiene sustancias que fueron degradadas total o parcialmente durante la fermentación ocurrida en el período de almacenamiento (Whittenbury y otros, 1967; McDonald y otros, 1991a; McDonald y otros, 1991b). Así mismo, los cambios suscitados durante el período de almacenamiento del ensilaje también pueden alcanzar a la PC tanto en concentración como en composición. La variación en cantidad y facilidad de degradación de los compuestos del CC y PC estarán afectados por las características del forraje original y las condiciones de confección y almacenamiento del forraje que ya fueron mencionados. Cabe destacar que la actividad microbiana en rumen estará condicionada por el nivel de aporte de energía de los alimentos y su velocidad de liberación, así como por la disponibilidad de N de la dieta.

Schofield y Pell (1995a; 1995b) basados en la propuesta de Van Soest y otros (1991) aislaron PC de forrajeras perennes y las incubaron *in vitro* para evaluar la cinética de digestión de la fracción soluble en detergente neutro (**SDN**) cuantificada como la diferencia entre la cinética de degradación del forraje completo y de la fibra insoluble en detergente neutro (**FDN**); todos los trabajos fueron

realizados con la técnica de producción de gas. Este método lo denominaron curvas de substracción y lo usaron también para evaluar las diferencias entre el forraje original y el ensilado en SDN. Por otro lado, Hall y otros (1999) propusieron estimar la proporción de fibra soluble (**FDNS**) como la diferencia entre los residuos insoluble en etanol (**RIE**) y detergente neutro corregidos por cenizas, proteína y almidón. También Hall y otros (1998) estudiaron la cinética de digestión de la FDNS mediante las curvas de substracción. En todos los trabajos citados los sustratos completos fueron incubados secados en estufa a 60°C y molidos.

La importancia cuali y cuantitativa así como la variabilidad que poseen las fracciones de los CHO en los forrajes ensilados pone de manifiesto que el análisis de la cinética de fermentación de cada una de ellas, permitiría mejorar la comprensión global del proceso de digestión. La técnica de producción de gas *in vitro* resultaría adecuada para estudiar la cinética de digestión de los ensilajes y de las fracciones de diferente disponibilidad como insoluble en agua y en detergente neutro (**RIA** y **RIDN**) que los componen. Sobre la base de los resultados y conclusiones reportados en el Capítulo 2. del presente trabajo los ensilajes deberían incubarse húmedos y molidos. El lavado con agua eliminaría del sustrato compuestos de bajo peso molecular como ácidos orgánicos, azúcares simples, disacáridos, nitrógeno no proteico y proteínas verdaderas solubles, entre otros (e.g. β -glucanos y galactanos). En tanto, la digestión con detergente neutro solo dejaría como residuo PC, asegurando el lavado del almidón y la fibra soluble (e.g. pectinas y fructosanos) como componentes principales. La descripción de las cinéticas de digestión del RIA y RIDN permitiría identificar las características más importantes que limitan la velocidad y la digestión potencial de los ensilajes. Varios autores informaron el uso de las curvas de substracción como una herramienta para comparar la degradabilidad de las fracciones de diferentes especies forrajeras,

materiales genéticos, tratamientos que mejorarían la degradación de la fracción fibrosa o métodos de conservación de forrajes (Schofield y Pell, 1995a; Doane y otros, 1997a; Doane y otros, 1997b; Doane y otros, 1997c; Hall y otros, 1998). Hasta el momento no ha sido reportado su uso para describir la interacción entre las distintas fracciones que componen los alimentos.

El objetivo de esta etapa fue examinar la interacción entre los compuestos solubles en agua y los residuos insoluble en agua y detergente neutro (RIA y RIDN) de ensilajes de gramíneas con grano y pasturas base leguminosas (SGgr y SL) y la contribución de dichos residuos al sustrato completo de la materia orgánica (MO) de los ensilajes durante el proceso de fermentación *in Vitro*.

3.3. Materiales y Métodos

3.3.1. Forraje ensilado y sustrato incubado

Se utilizaron los forrajes ensilados descritos en la sección 2.3.1 del Capítulo 2. (*i.e.* 11 de gramíneas con presencia de grano y 7 de pasturas a base de alfalfa, **SGgr** y **SL**, respectivamente) siendo los ensilajes estudiados un total de 18 unidades experimentales (**UE**). Aproximadamente 600 g de MH de cada uno de los ensilajes fue molido en fresco con un homogeneizador Foss Tecator® (Modelo 2096) con previa adición de hielo seco (forraje fresco y hielo seco con 15 minutos de reposo). El procedimiento de molienda constó de 4 pulsos de 1 minuto. Luego las muestras fueron almacenadas en freezer a -18°C hasta su utilización.

Las muestras molidas y frescas se dividieron en tres partes iguales para la preparación de los sustratos para la incubación *in vitro*. Una parte se reservó en fresco (sustrato completo, **C**), la segunda fue lavada con agua (residuo del lavado con agua, **RIA**) y la tercera con detergente neutro (residuo del lavado con detergente neutro, **RIDN**). La extracción RIA se realizó mediante la maceración del forraje fresco en agua destilada a 4°C durante una hora (10 g MH/100 ml) y filtrado por papel Whatman N° 54. Mientras que el RIDN se obtuvo aplicando el procedimiento descrito por Van Soest y otros (1991) con agregado de α -amilasa y sin sulfito de sodio. Ambos residuos insolubles (**RI**) fueron secados en estufa una vez finalizada la extracción y reservados en lugar seco hasta su uso. Durante el procedimiento de preparación de RIA y RIDN se registraron los pesos iniciales y finales para el cálculo de la proporción de los residuos en el sustrato C de cada muestra de forraje ensilado.

3.3.2. Incubación *in vitro*

La incubación *in vitro* se efectuó siguiendo la técnica descrita por Brooks y Theodorou (1997) modificada por Wawrzkievicz y Danelon (2004) según lo descrito en la sección 2.3.1 del Capítulo 2. , así como las condiciones en las que se obtuvo el licor ruminal usado como inóculo. Los sustratos C, RIA y RIDN se incubaron por triplicado en tres oportunidades independientes en el tiempo (*i.e.* repeticiones) durante 72 horas. La relación sustrato / inóculo en las botellas de incubación fue 1 g MS / 10 ml licor ruminal. La cantidad de sustrato RIA y RIDN colocado en cada botella fue equivalente a la del C, para mantener la relación entre cada una de las fracciones del sustrato y el inóculo. Las mediciones se realizaron a intervalos regulares (*i.e.* 1 - 12 h con 1 h de intervalo, luego 14, 16, 18, 21, 24, 28, 32, 36, 42, 48, 60 y 72 h) con un transductor de presión (tipo T443A®, Bailey y Mackey Ltd., Birmingham, Gran Bretaña) conectado a un panel digital (Data Track®, Christchurch, Gran Bretaña). La frecuencia de medición durante la incubación fue mayor a la de los experimentos del Capítulo 2. , esto permitió caracterizar con mayor precisión la cinética de PG de los sustratos. Al 30 % de las botellas en cada repetición se midió la presión y el volumen correspondiente para construir la relación lineal entre dichas variables utilizada para transformar los resultados de presión de las restantes botellas de la repetición.

Los residuos no digeridos a las 72 horas fueron recuperados en bolsitas filtrantes ANKOM® F57 para la determinación de la MS, FDN y FDA desaparecidas (**MSD**, **FDND** y **FDAD**, respectivamente) expresada por unidad de peso de la MS incubada en cada caso (g). También se calculó la MSD en base al sustrato completo (**MSDc**) para los residuos RIA y RIDN mediante la corrección de la proporción del residuo recuperado durante la preparación de los mismos. Se

reservaron 3 ml de solución de incubación para la determinación de AGV producidos. Los resultados de producción de gas (**PG**), AGV y de desaparición de sustrato de las muestras en estudio fueron corregidos por blanco (*i.e.* botellas sin sustrato). En el caso del sustrato C los AGV también se corrigieron por los aportados por la muestra húmeda.

La cinética de PG fue ajustada según la ecuación $PGA = A - B Q^t Z^{\sqrt{t}}$ donde $Q = e^b$, $Z = e^{-c}$, y $B = e^{bT+c\sqrt{T}}$ (France y otros, 1993), **PGA** es el total de gas acumulado al tiempo t (ml), t es el tiempo de incubación (h), **A** es el valor asintótico del total de gas producido (ml), **T** es el tiempo de retardo o fase *Lag*, y **b** (h^{-1}) y **c** ($h^{-0.5}$), son tasas constantes. A partir de estos parámetros se estimaron T50 y T95 (tiempo en el cual se acumuló el 50% y el 95% del gas producido, respectivamente), y μ_{50} ($\mu_t = b + c / (2 \sqrt{t})$); tasa fraccional de PG en h^{-1} a la hora 50.

La cinética de PG de todos los sustratos estudiados fue ajustada con los modelos de Ørskov y McDonald (1979) y France y otros (1993) resultando con mejores niveles de ajuste éste último. Para los modelos no lineales como los mencionados, el nivel de ajuste se puede calcular con un pseudo coeficiente de determinación ($p-R^2$) que cumple una función similar al R^2 de los modelos lineales y fue usado como criterio de selección para rechazar el modelo de Ørskov y McDonald (1979) que para RIA y RIDN alcanzó valores inferiores ($P-R^2_F = 0.423 \times P-R^2_{\emptyset} + 0.579$; $R^2=0.914$ y $P<0.0001$).

Se analizaron las variables producción de gas acumulada (PGA; ml/g MS) a las 12, 24, 48 y 72 h, parámetros *A*, *b*, *c*, Fase *Lag*, T50, T95, μ_{50} , tasa horaria máxima de producción de gas (*Tmax*; ml/g MS. h^{-1}) y el tiempo al que ésta se produce (*TTmax*) y MSD, MSDc, FDND y FDAD. Por otro lado para estudiar la proporción aportada por cada uno de los residuos incubados los resultados se

afectaron por la proporción de dichos residuos de cada forraje ensilado, siendo denominados los residuos como **RIAc** y **RIDNc** (*i.e.* residuo insoluble en base al sustrato completo).

3.3.3. Análisis químicos

La caracterización de las muestras de ensilaje se realizó mediante los análisis de materia seca liofilizada (**MS**; (Givens, 1986), cenizas (AOAC, 1990; Nro. 942.05), proteína bruta (**PB** - Ntotal x 6,25) (AOAC, 1990; Nro. 984.13), pH y acidez total (pH y **AT**) (Playne y McDonald, 1966), ácido láctico (**Lac**) según (Barnet 1951) adaptado por (Anaya, 1995), carbohidratos solubles en etanol (**CHO_s**) (Yemm y Willis, 1954) y fibra insoluble en detergente neutro (${}_a$ FDN_{mo}) y ácido (FDA_{mo}) y la lignina en detergente ácido con ácido sulfúrico (Lig_{as}) (Van Soest y otros, 1991) y se informaron libres de cenizas. El contenido de almidón se determinó con un kit enzimático (Megazyme®; AOAC, 2000; Nro. 996.11).

Se determinó la concentración de ácidos grasos volátiles (**AGV**) en los forrajes ensilados y en los residuos de la incubación *in vitro* por cromatografía gaseosa. Fueron identificados los ácidos acético, propiónico y butírico (Mezcla de ácidos grasos soluble en agua Matreya® - **Ac**, **Pro** y **But**, respectivamente). Se utilizó un equipo Konik-3000® con inyección manual, detector FID (10 y 1 ml/min de aire e hidrógeno, respectivamente) y una columna semi-capilar BP-20 (marca SGE®) con nitrógeno como carrier (10 ml N₂/min) según protocolo recomendado por el fabricante de la columna. La purificación de las muestras para AGV se realizó con ácido sulfúrico (25 % en ácido sulfúrico 0.5M) a razón de 0.5 ml por cada 2 ml de muestra y luego centrifugadas por 10 minutos a 6000 x g (Fruggens y otros, 1998).

3.3.4. Análisis estadístico

Las variables en estudio fueron sometidos a un análisis de varianza con un diseño completamente aleatorizado de dos factores con interacción según el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + \text{Frac}_i + \text{Forr}_j + (\text{Frac} \times \text{Forr})_{ij} + E_{ijk}$$

donde, Y_{ijk} = variable en estudio; μ = media general; Frac_i = fracción ($i=3$); Forr_j = tipo de forraje ensilado ($j=2$); $(\text{Frac} \times \text{Forr})_{ij}$ = interacción; E_{ijk} = error experimental ($k=3$). En los casos en que la interacción fue significativa se efectuó un análisis mediante la opción Slice por Frac o Forr según correspondiera.

Las tasas horarias de PG fueron analizadas con un modelo de medidas repetidas con una estructura de covarianza AR(1) que incluyó al término correspondiente al tiempo de medición (medida repetida sobre la botella de incubación) según el modelo descrito a continuación,

$$Y_{ijkl} = \mu + \text{Frac}_i + \text{Forr}_j + T_k + (\text{Frac} \times \text{Forr})_{ij} + (\text{Frac} \times T)_{ik} + (\text{Forr} \times T)_{jk} +$$

$$+ (\text{Frac} \times \text{Forr} \times T)_{ijk} + E_{ijkl}$$

donde, Y_{ijkl} = variable en estudio; μ = media general; Frac_i = fracción ($i=3$); Forr_j = tipo de forraje ensilado ($j=2$); T = horario de medición ($k=24$); todos los términos de interacción y E_{ijk} = error experimental ($k=3$). Si al menos una de las interacciones con Forr resultó significativas se aplicó la opción Slice por Forr.

3.4. Resultados

La composición química de los ensilajes fue descrita en el Cuadro 2.1 del Capítulo 2. . La variabilidad encontrada entre los resultados fue importante; registrándose en SGgr los CV entre 12 y 64 % mientras que para SL entre 17 y 123 %. Las diferencias más importantes entre los dos grupos de ensilajes se encontraron en el contenido de PB, FDA_{mo} , Lig_{as} , Cen y Alm que en SL fueron 1.8, 1.4, 2.9 y 1.7 veces mayores, respectivamente; mientras que el Alm casi 20 veces menor. El perfil fermentativo de los ensilajes SGgr y SL se describe en el Cuadro 3.1. Tanto la composición química como el perfil fermentativo de los ensilados resultaron característicos de los ensilajes producidos en nuestro país. Los SGgr y SL no presentaron diferencias entre ellos en contenido de CHO_s y Lac, siendo los valores promedio repetidamenbte bajos en comparación con ensilajes de buena calidad. Los SGgr registraron 1.8 veces más AT y 1 punto menos de pH que los SL. El máximo valor de pH encontrado en SGgr corresponde al ensilaje de planta entera de sorgo que coincide con la AT y Ac más bajos y los $aFDN_{mo}$, FDA_{mo} y Lig_{as} más altos del grupo aunque con un aceptable contenido de Alm (*i.e.* 138 g / kg MS). Sin embargo como no se detectó But podría sospecharse que la baja calidad nutricional del ensilaje obedece a las características del cultivo al momento de la cosecha más que a las condiciones de almacenamiento (*e.g.* estado fenológico avanzado, baja altura de corte incorporando alta proporción de tallo, material genético – granífero vs. silero, condiciones climáticas, entre otros). Por otro lado, se detectaron pequeñas cantidades de But en otros ensilajes de planta entera de maíz y el de avena granada, siendo este último además el de menor contenido de Alm. Es posible que el re-ensilado haya causado efecto negativos sobre la calidad de los ensilajes. Algo similar se detectó en los SL aunque con 5 veces más de But en

promedio y pH relativamente altos para lo esperado en este tipo de ensilajes (e.g. pH 4.5). En relación a los valores de pH registrados las AT no fueron bajas, indicando probablemente alta capacidad buffer en los silajes.

Cuadro 3.1 Perfil fermentativo de los forrajes ensilados (g/kg MS) continuación del Cuadro 2.1.

	Fracciones analíticas ¹						pH
	CHO _s	Lac	Ac	Prop	But	AT	
Forraje ensilado de gramíneas con grano (n = 11)							
Media	5	38	31	2	2	514	4.1
Máximo	17	44	50	5	4	773	6.0
Mínimo	1	29	14	ND	ND	35	3.6
DE ²	5.4	4.3	11.1	1.6	1.2	200.7	0.67
CV ³	108	11	36	91	73	39	16
Forraje ensilado de pastura consociada base alfalfa (n = 7)							
Media	2	38	48	6	10	291	5.2
Máximo	3	45	85	8	27	587	5.6
Mínimo	1	35	26	3	2	132	4.7
DE ²	0.6	3.9	21.2	1.6	8.9	185.4	0.35
CV ³	30	10	44	27	94	64	7

¹ CHO_s: carbohidratos solubles en etanol; Lac; ácido láctico; Ac: ácido acético; Prop: ácido propiónico; But: ácido butírico; AT: acidez total; ND: no detectable. ² DE = desvío estándar de la media. ³ CV = coeficiente de variación (%).

Los procedimientos de lavado con agua y detergente neutro con α -amilasa dieron origen a los sustratos RIA y RIDN, respectivamente. En RIA se concentraron las fracciones fibrosas como así también el Alm (*i.e.* aproximadamente 40% más en las fibras –_aFDN_{mo}, FDA_{mo} y Hemi – y 48% para el almidón); mientras que en RIDN solo las fracciones fibrosas fueron las remanentes del lavado alcanzando valores cercanos al 100% (la diferencia hasta el 100% corresponden a las cenizas). En el Cuadro 3.2 se describe la composición de los residuos en comparación a la de los sustratos completos. Los SGgr y SL no mostraron diferencias en cuanto a la cantidad de RIAc y RIDNc recuperado luego de los lavados (*i.e.* 720 g RIA / kg MSc y 533 g RIDN / kg MSc; P>0.05). Cabe destacar que los lavados con agua y detergente neutro redujeron el contenido de cenizas en 25 y 9%, respectivamente. El RIDN que mostró una menor reducción del contenido de cenizas podría deberse

a la incorporación de alguna de las sales de la solución de DN al residuo de la digestión. Estas importantes variaciones en el contenido de materia orgánica de los residuos fue necesario tenerlas en cuenta en los cálculos y correcciones en la determinación de las desapariciones de las fracciones de fibra de los sustratos.

Cuadro 3.2 Concentración (g/kg MS) de las fracciones analíticas de fibra y almidón de los sustratos completos y los residuos insolubles en agua y detergente neutro (RIA y RIDN, respectivamente) según el tipo de forraje ensilado.

	Residuo ²	Fracción analítica ¹				Alm	Cen
		_a FDN _{mo}	FDA _{mo}	Hemi			
Forraje ensilado de gramíneas con grano (SGgr; n = 11)							
Completo							
Media		503	264	239	219	75	
Máximo		737	529	317	365	117	
Mínimo	NC	378	189	189	38	58	
DE		112	99	46	88	22	
CV (%)		22	38	19	40	29	
RIA							
Media	708	701	376	338	318	56	
Máximo	850	876	629	446	526	98	
Mínimo	600	544	272	247	49	36	
DE	90	107	110	61	133	20	
CV (%)	13	15	29	18	42	36	
RIDN							
Media	503	952	515	437		67	
Máximo	737	980	718	545		98	
Mínimo	378	915	420	252	ND	40	
DE	112	23	80	87		19	
CV (%)	22	2	16	20		29	
Forraje ensilado de pastura base leguminosas (SL; n = 7)							
Completo							
Media		562	405	157	10	130	
Máximo		695	533	232	34	177	
Mínimo	NC	420	325	95	1	94	
DE		93	76	48	12	32	
CV (%)		17	19	31	123	25	
RIA							
Media	732	770	552	218	15	97	
Máximo	827	896	684	330	56	171	
Mínimo	608	618	478	140	1	71	
DE	79	108	71	75	20	35	
CV (%)	11	14	13	34	133	36	
RIDN							
Media	562	919	721	279		122	
Máximo	695	970	797	369		288	
Mínimo	420	800	631	203	ND	56	
DE	93	63	69	69		85	
CV (%)	17	7	10	25		1	

¹ _aFDN_{mo}: fibra insoluble en detergente neutro con α -amilasa y libre de cenizas; FDA_{mo}: fibra insoluble en detergente ácido y libre de cenizas; Hemi: hemicelulosa; Alm: almidón; Cen: cenizas; NC: no corresponde; ND: no detectable. ² Residuo en g/kg MS sustrato completo

En el RIA de los SGgr aproximadamente el 30% del sustrato fue almidón, siendo el sustrato restante casi en su totalidad $a\text{FDN}_{\text{mo}}$ (*i.e.* 70%), mientras que en los SL estos valores en promedio fueron 1.5 y 77% manteniendo las diferencias que se habían detectado en los sustratos completos para ambos forrajes (Cuadro 3.2 y Cuadro 2.1 del Capítulo 2.). Por otro lado el RIDN en SGgr tuvo en promedio menos FDA_{mo} y hemicelulosa que SL (*i.e.* -200 g FDA_{mo} /kg RIDN y -160 g Hemi/kg RIDN; Cuadro 3.2). En el RIDN no se detectó Alm como era de esperar por el tratamiento con α -amilasa efectuado durante la digestión.

El análisis de los sustratos desaparecidos indicó que la interacción Fracción x Forraje solo fue significativa para MSD y MSDc; en ambos casos se procedió al estudio por fracción para analizar los resultados (Cuadro 3.3). SGgr en todas las fracciones presento mayor MSD que SL (*i.e.* 17, 50 y 42% mas MSD en C, RIA y RIDN, respectivamente), en acuerdo a lo mencionado en las fracciones analíticas donde se observo que SL contenía mayor proporción de $a\text{FDN}_{\text{mo}}$ y FDA_{mo} que son las porciones de menor degradabilidad del forraje y que incrementaron su concentración en los mencionados residuos. En el mismo sentido cabe mencionar que el Alm en el RIA de SGgr también contribuye al aumento de la degradabilidad de dicha fracción. Por otro lado, al analizar la contribución de las distintas fracciones a la MSDc se encontró que el RIA aportaba el 60% del total en SGgr y solo el 48% en SL. Estas diferencias podrían estar explicadas, al menos en parte por la contribución del almidón en SGgr como sustrato de alta degradabilidad. Mientras que la MSDc del RIDN también fue diferente entre SGgr y SL (286 y 234 g/kg MS; $P=0.0091$), respecto de la contribución a la MSD de dichos forrajes no se encontraron diferencias (38 y 37% de 490 y 392 g/kg MS para SGgr y SL, respectivamente; $P>0.05$).

En cuanto a las variables FDND, FDAD y HemiD la interacción del modelo no fue significativa y se analizaron los efectos principales. No se encontraron diferencias entre fracciones, siendo los promedios de desaparición generales 587, 573 y 544 g/kg de FDN, FDA y Hemi, respectivamente. SGgr presentó 27, 10 y 73% más FDND, FDAD y HemiD que SL ($P < 0.001$). La desaparición de estos compuestos se asoció negativamente a la concentración de LDA de los sustratos, siendo los coeficientes de correlación -0.583 ($P < 0.0001$), -0.233 ($P < 0.10$) y -0.745 ($P < 0.0001$) para FDND, FDAD y HemiD, respectivamente. Pareciera que de todos los componentes de la PC el más afectado fue la hemicelulosa.

Cuadro 3.3 Desaparición de materia seca, fibra insoluble en detergente neutro y ácido y hemicelulosa (FDND, FDAD y HemiD; g/kg MS, FDN, FDA y Hemi, respectivamente) y MSD es base al sustrato completo (MSDc; g/kg MS) de los sustratos completos, residuos del lavado con agua y detergente neutro (C, RIA y RIDN) para los ensilajes de gramíneas con grano y pastura base leguminosas (SGgr y SL).

		MSD ³	MSDc ⁴	FDND	FDAD	HemiD	
Fracción							
	C	689	689	590	590	538	
	RIA	525	375	565	538	515	
	RIDN	493	260	605	592	579	
Forraje							
	SGgr	651	490	649	594	689	
	SL	487	392	510	540	399	
EEM ¹		10.8	8.9	11.2	13.2	17.3	
Estadístico							
	Frac	F _{2, 156}	77.5	511.1	2.2	1.4	2.8
	Forr	F _{1, 156}	140.9	76.1	94.4	10.1	170.4
	Frac x Forr	F _{2, 156}	4.6	4.8	1.5	0.9	0.07
Significancia ²							
	Frac	***	***	NS	NS	†	
	Forr	***	***	***	**	***	
	Frac x Forr	**	***	NS	NS	NS	

¹ EEM = error estándar de la media; ² NS: no significativo; †, $P < 0.10$; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. Letras diferentes en la misma columna difieren estadísticamente $P < 0.05$, Tukey.
³ Slice por Fracción, C 743 y 634 ($F_{1, 156} = 20.7$), RIA 630 y 420 ($F_{1, 156} = 7.6$), RIDN 579 y 407 ($F_{1, 156} = 51.9$) para SGgr y SL, respectivamente (EEM = 18.7; $P < 0.0001$);
⁴ Slice por Fracción, C 743 y 634 ($F_{1, 156} = 30.7$), RIA 443 y 307 ($F_{1, 156} = 48.0$), RIDN 286 y 234 ($F_{1, 156} = 6.9$) para SGgr y SL, respectivamente (EEM = 15.8; $P < 0.0001$).

La PGA a las 48 y 72 horas no mostró significativa la interacción (Frac x Forr; Cuadro 3.4). SL produjo un 34 % menos de gas que SGgr a partir de las 48 horas. En horas más tempranas de la incubación y aunque la interacción resultó significativa (*i.e.* Frac x Forr; $P < 0.0001$) también se encontró por debajo de SGgr y con mayores diferencias. El sustrato C a pesar de haber registrado las mayores MSD respecto de las otras fracciones (Cuadro 3.3) fue la que menor cantidad de gas produjo, con 18 y 23 % menos a la 48 y 72 h (*i.e.* 153 y 171 ml/g MS a 48 y 72 h). Mientras que RIA y RIDN no tuvieron diferencias entre ambas para PGA (*i.e.* 187 y 221 ml/g MS a las 48 y 72 h) aunque RIA mostró mayores desapariciones de sustrato que RIDN.

En cambio a las 6, 12 y 24 h el sustrato C tuvo mayores PGA que RIA y RIDN, alcanzando en algunos casos a valores cercanos al doble. Las mayores diferencias entre fracciones y forrajes se encontraron en las primeras 12 horas de incubación sugiriendo esto que los SL y en especial los RI sufrieron una digestión más lenta que los SGgr y C, respectivamente. A partir de las 12 primeras horas las diferencias entre SGgr y SL en los RI fueron disminuyendo pero en ningún momento desaparecieron.

Cuadro 3.4 Producción de gas acumulada a las 6, 12, 24, 48 y 72 horas de incubación *in vitro* (PGA 6, 12, 24, 48 y 72; ml/g MS de sustrato incubado) de los sustratos completo y residuos del lavado con agua y detergente neutro (C, RIA y RIDN, respectivamente).

		PGA					
		6	12	24	48 ⁴	72 ⁵	
C							
	SGgr	39.7	94.1	149.5	194.0	214.3	
	SL	19.4	44.0	79.9	112.8	127.4	
	F _{1, 156}	31.0	48.6	43.0			
	Sig ³	***	***	***			
RIA							
	SGgr	19.2	71.4	156.2	238.2	273.2	
	SL	9.4	31.4	85.6	149.7	174.5	
	F _{1, 156}	7.3	31.0	44.2			
	Sig ³	**	***	***			
RIDN							
	SGgr	15.8	31.9	103.6	207.4	253.0	
	SL	7.8	19.4	77.6	153.1	183.1	
	F _{1, 156}	4.9	4.7	6.0			
	Sig ³	*	*	*			
	EEM ¹	2.84	5.62	8.31	9.15	8.90	
Estadístico							
	Frac	F _{2, 156}	27.9	34.6	9.1	12.4	26.1
	Forr	F _{1, 156}	36.5	72.1	81.7	122.1	167.9
	Frac x Forr	F _{2, 156}	3.3	6.1	5.7	2.4	1.6
Significancia²							
	Frac	***	***	***	***	***	
	Forr	***	***	***	***	***	
	Frac x Forr	*	**	**	†	NS	

¹ EEM = error estándar de la media; ² NS: no significativo; †, P<0.10; *, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001. Letras diferentes en la misma columna difieren estadísticamente P<0.05, Tukey.

³ Slice por Fracción.

⁴ Forraje: 213 y 139, SGgr y SL; Fracción: 153_b, 194_a y 180_a, C, RIA y RIDN (EEM = 5.9)

⁵ Forraje: 247 y 162, SGgr y SL; Fracción: 171_b, 224_a y 218_a, C, RIA y RIDN (EEM = 5.7).

Los resultados obtenidos de PGA durante las 72 horas de incubación *in vitro* fueron modelados según lo propuesto por France y otros (1993). Las variables que describen la cinética de PG se detallan en el Cuadro 2.9 y las variables derivadas

de éstas en el Cuadro 3.6. Solo en Z resultó significativa la interacción Fracción x Forraje. En las restantes variables se procedió al estudio de los efectos principales del modelo. La PG potencial (A) y B coincidieron con la PGA a 72 horas que resultó 171_b, 224_a y 218_a ml/g MS (EEM = 5.7, $P < 0.0001$; Cuadro 3.4) para C, RIA y RIDN mientras que SGgr y SL fueron 247 y 162 ml/g MS (EEM = 5.1, $P < 0.0001$). A diferencia de lo esperado, los sustratos que habían tenido menores MSD tuvieron las PGA más altas (Cuadro 3.3). Esto podría deberse a las producciones de los diferentes AGV que modifican la contribución de gas directa e indirecta y/o a la cantidad de nitrógeno amoniacal liberado en el medio de incubación como producto de la degradación proteica que desplaza el equilibrio buffer capturando CO₂ en solución.

Los parámetros Q y Z permitieron calcular las variables derivadas que se observan en el Cuadro 3.6. Las variables *Lag*, *c*, T50 y T95 no mostraron significativa la interacción del modelo ($P > 0.05$). SL tuvo mayor fase *Lag*, T50 y T95 que SGgr con 0.4, 4.4 y 9.4 horas más, respectivamente ($P < 0.05$). Es decir que, SL no solamente comenzó más tarde a liberar gas sino que lo hizo a una menor velocidad. En el mismo sentido, la constante *c* también fue menor en SL (-0.15 y -0.19 h⁻¹ para SGgr y SL; $P = 0.029$). Por otro lado, el sustrato C comenzó a producir gas antes de la hora 1 de incubación y mostró 0.6 h menos de fase *Lag* que los RI, los que no presentaron diferencias entre ellos (*i.e.* 1.5 h *Lag* para RIA y RIDN). El tiempo de inicio de la degradación de los RI no marcaría diferencias en dificultad entre ambos. El T50 de C fue a las 19 horas mientras que para los RI ocurrió a las 25 h, 6 horas más tarde. En cambio no hubo diferencias entre las fracciones para el T95 que fue a las 60 h ($P = 0.193$). La constante *c* presentó una tendencia similar, siendo menor para C respecto de RIA y RIDN ($P < 0.10$).

Cuadro 3.5 Parámetros *A*, *B*, *Q* y *Z* modelo que describe la cinética de producción de gas (PG) *in vitro* (France y otros, 1993) de los sustratos completos, residuos del lavado con agua y detergente neutro (Completo, RIA y RIDN, respectivamente).

		<i>A</i>	<i>B</i>	<i>Q</i>	<i>Z</i> ³
Fracción					
	C	178 _b	164 _b	0.93 _b	1.16 _{ab}
	RIA	235 _a	203 _a	0.91 _a	1.19 _a
	RIDN	213 _a	180 _a	0.81 _a	1.05 _b
Forraje					
	SGgr	245	218	0.84	1.07
	SL	172	146	0.93	1.20
EEM ¹		9.5	8.9	0.027	0.038
Estadístico					
Frac	F _{2, 145}	7.3	4.0	4.2	2.8
Forr	F _{1, 145}	33.8	37.6	5.5	6.8
Frac x Forr	F _{2, 145}	1.2	0.7	1.6	3.4
Significancia ²					
Frac		**	*	*	†
Forr		***	***	NS	*
Frac x Forr		NS	NS	NS	*
¹ EEM = error estándar de la media; ² NS: no significativo; †, P<0.10; *, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001. Letras diferentes en la misma columna difieren estadísticamente P<0.05, Tukey.					
³ Slice por Fracción: C 1.16 y 1.16; RIA 1.14 y 1.23; RIDN 0.89 _b y 1.20 _a (EEM = 0.065; α = 0.05)					

La constante *b* de PG y las tasas fraccionales μ_{50} y μ_{95} mostraron significativa la interacción (Frac x Forr) a causa de no existir diferencia entre los residuos RIA y RIDN para SL mientras que si los hubo para SGgr; aunque en cualquiera de los casos C siempre mostró los valores más altos para ambos forrajes resultando SGgr superior a SL. Por otro lado, SGgr y SL no fueron diferentes en el RIA obteniéndose para *b*, μ_{50} y μ_{95} valores promedio de 0.06, 0.04 y 0.05 h⁻¹, respectivamente. En cambio, el RIDN de SGgr presentó valores de éstas variables aproximadamente un 40% menores a las de SL, sugiriendo así que la fracción fibrosa de los SGgr se degrada más lentamente que las de SL (Slice por Frac

Cuadro 3.6) aunque con una desaparición a las 72 h superior (MSD, FDND, FDAD y HemiD, Cuadro 3.3).

Cuadro 3.6 Variables derivadas de los parámetros del modelo de France y otros (1993) de los sustratos completos, residuos del lavado con agua y detergente neutro (C, RIA y RIDN, respectivamente).

	Lag (h)	b^3 (h ⁻¹)	c (h ⁻¹)	T50 (h)	T95 (h)	$\mu 50^4$ (h ⁻¹)	$\mu 95^5$ (h ⁻¹)
Fracción							
C	0.9 _b	0.07 _a	-0.14	18.7 _b	56.2	0.05 _a	0.06 _a
RIA	1.5 _a	0.06 _a	-0.19	24.4 _a	62.9	0.04 _b	0.05 _b
RIDN	1.5 _a	0.05 _b	-0.17	25.3 _a	61.5	0.03 _c	0.04 _c
Forraje							
SGgr	1.1	0.06	-0.15	20.6	54.5	0.04	0.05
SL	1.5	0.06	-0.19	25.0	65.9	0.04	0.05
EEM ¹	0.08	0.004	0.014	1.32	2.26	0.002	0.003
Estadístico							
Frac F _{2, 145}	15.9	9.7	3.0	5.9	2.0	25.4	17.5
Forr F _{1, 145}	18.6	0.01	4.9	6.6	15.0	0.6	0.1
Frac x Forr F _{2, 145}	0.6	5.1	2.7	0.4	0.1	6.9	5.9
Significancia²							
Frac	***	***	†	**	NS	***	***
Forr	***	NS	*	*	***	NS	NS
Frac x Forr	NS	**	NS	NS	NS	**	**

¹ EEM = error estándar de la media; ² NS: no significativo; †, P<0.10; *, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001. Letras diferentes en la misma columna difieren estadísticamente P<0.05, Tukey.
Slice por Fracción: ³ C 0.08_a y 0.06_b, RIA 0.07 y 0.06 y RIDN 0.04_b y 0.06_a (EEM = 0.006); ⁴ C 0.06_a y 0.05_b, RIA 0.05 y 0.04 y RIDN 0.03_b y 0.04_a (EEM = 0.004); ⁵ C 0.06_a y 0.05_b, RIA 0.05 y 0.04 y RIDN 0.03_b y 0.04_a para SGgr y SL, respectivamente (EEM = 0.005) ($\alpha = 0.05$).

El sustrato C fue incubado en fresco y por lo tanto contenía los AGV propios del ensilaje original. La incorporación de sustancias ácidas en el medio buffer de la botella de incubación produce el desplazamiento del sistema tampón liberando CO₂ que no es producto de la degradación del sustrato. La PG medida a la hora 1 de la incubación *in vitro* mostró un coeficiente de correlación de 0.82 con la AT de los ensilajes (0). Por lo observado, la determinación de las variables Tmax y TTmax se

realizó excluyendo la primera medición realizada a la hora 1 y se observan en el Cuadro 3.7. La inclusión de la primera medición de PGA 1 provoca que TTmax en C se anticipe cerca de 1.5 horas, sin corresponderse esto con la degradación del sustrato sino con el establecimiento del equilibrio del sistema buffer en el recipiente de incubación.

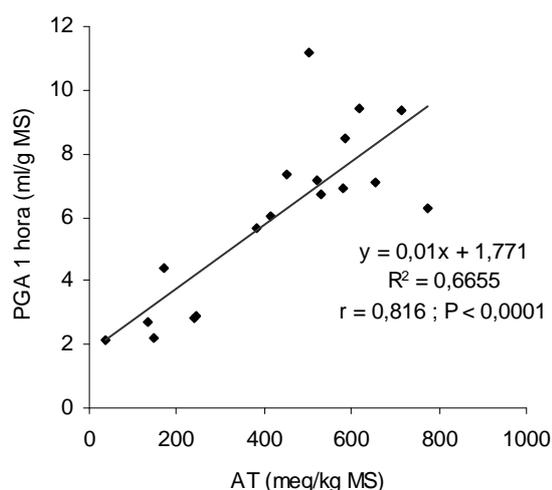


Figura 3.1 Relación entre la producción de gas acumulada a la hora 1 (PGA 1) de incubación *in vitro* y la acidez total (AT) del forraje ensilado (n=18).

El TTmax fue de 15 horas en promedio para ambos forrajes y ocurrió 4 horas antes de alcanzar el 50% del total de gas producido (*i.e.* T50 = 19 horas; Cuadro 3.6). Ahora bien, las tres fracciones resultaron diferentes para TTmax con 9, 15 y 20 horas para C, RIA y RIDN, respectivamente ($P < 0.0001$). A diferencia de lo observado en T50 donde los RI se igualaron en 25 horas y *c* fue menor, al igual que con TTmax (*i.e.* en C 19 h menos para T50 y 6 h antes TTmax que los RI). Pareciera desprenderse de esto que las variables T50 y TTmax no resultan equivalentes sino que describen características distintas de la cinética de digestión; mayores diferencias parece encontrarse entre ellas cuanto más lentamente degradable resulta el sustrato (*e.g.* RIDN vs RIA vs C). En cualquiera de los casos, la estimación de T50 pareciera reducir las diferencias observadas entre las

fracciones en los resultados obtenidos durante las mediciones; y más aún el T95. La interacción del modelo resultó significativa en Tmax (P = 0.0003). El RIDN tuvo una Tmax promedio de 8 ml/g MS.h para SGgr y SL (P = 0.173); mientras que para C y RIA SGgr fue aproximadamente el doble de SL y mayor a las del RIDN (*i.e.* 11.5 y 6.1 ml/g MS.h para SGgr y SL).

Cuadro 3.7 Tasa máxima de producción de gas (Tmax; ml/g MS.h) y tiempo de ocurrencia de Tmax (TTmax; h) de los sustratos completos, residuos del lavado con agua y detergente neutro (Completo, RIA y RIDN, respectivamente) para los ensilados de gramínea con grano y pastura en base alfalfa.

		Tmax ³	TTmax
Fracción			
	C	8.2	9.3 _c
	RIA	9.6	15.3 _b
	RIDN	8.0	19.6 _c
Forraje			
	SGgr	10.5	15.1
	SL	6.6	14.4
EEM ¹		0.42	0.80
Estadístico			
Frac	F _{2, 156}	4.1	41.9
Forr	F _{1, 156}	65.6	0.7
Frac x Forr	F _{2, 156}	8.5	2.9
Significancia ²			
	Frac	**	***
	Forr	***	NS
	Frac x Forr	***	†

¹ EEM = error estándar de la media; ² NS: no significativo; †, P<0.10; *, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001. Letras diferentes en la misma columna difieren estadísticamente P<0.05, Tukey.
³ Slice por Fracción: C 11.1_a y 5.3_b, RIA 12.0_a y 7.1_b y RIDN 8.6_a y 7.4_b para SGgr y SL, respectivamente (EEM = 0.65; α = 0.05).

Los resultados observados en PGA, Tmax y TTmax resultaron coincidentes para las tres fracciones y los forrajes. A mayor PGA 72 h, la Tmax fue más elevada

y TTmax menor; esto significa que la Tmax se anticipó en el tiempo cuanto más alta fue la PGA. En todos los casos el coeficiente de correlación fue positivo ($P < 0.05$) en el caso de PGA 72 h y Tmax y negativo para PGA 72 h y TTmax ($P < 0.05$).

En el Cuadro 3.8 se informa la producción de AGV a las 72 h y la proporción de cada uno de los ácidos identificados. Tanto la composición como la cantidad total de AGV producidos durante la incubación *in vitro* mostró significativa la interacción Fracción x Forraje ($P < 0.01$). SL produjo 40, 33 y 22% menos AGVt en C, RIA y RIDN que SGgr en acuerdo a lo mencionado para PGA 72 (41, 36 y 28 % menos PGA 72) y MSD (15, 33 y 30 % menos MSD) aunque con diferentes magnitudes. A diferencia de lo detectado al comparar para cada forraje las fracciones, la MSD de mayor desaparición registró la menor PGA 72 h (Cuadro 2.7 y Cuadro 2.10). Oportunamente esto fue sugerido como consecuencia de los cambios ocurridos en el perfil de fermentación de las fracciones. En el Cuadro 3.8 se mencionan importantes cambios en la relación Ac/Pro entre las fracciones y también entre forrajes para C. Así mismo, para las fracciones se detectaron diferencias entre ensilajes solo en C, siendo 3.9 y 7.5 en SGgr y SL ($P < 0.0001$). Resultando en valores promedio de 4.4 y 2.5 para RIA y RIDN que confirman cambios en el perfil de fermentación, incluso respecto de los valores citados para C. En cuanto a la proporción de los ácidos producidos solo la fracción RIA no presentó diferencias entre los forrajes. Es decir que en este caso la marcada diferencia en composición (*i.e.* 318 vs 15 g Alm/g MS entre los SGgr y SL, respectivamente) no indujo a cambios en el perfil de fermentación; solo en But se encontró una tendencia a mayor proporción para SGgr respecto de SL (*i.e.* 6.6 y 5.4 %; $P = 0.065$). Mientras que en el RIDN SL tuvo 5 puntos más de Ac y disminuyó en igual cantidad el Pro respecto de SGgr. En términos generales podría mencionarse que el principal responsable de la variación en composición de AGV en la incubación *in vitro* resultó

la concentración de PC y sus componentes, dado que las diferencias más altas se registraron entre las fracciones. A medida que se concentraron las fracciones de fibra en los RI aumentó la proporción de Pro y disminuyó la de Ac, generando relaciones Ac/Pro menores.

Cuadro 3.8 Composición de ácidos grasos volátiles producidos hasta 72 horas de incubación *in vitro* de los sustratos completo y residuos del lavado con agua y detergente neutro (C, RIA y RIDN, respectivamente).

		Ac	Pro (mol/100 mol)	But	Ac/Pro	AGV _{Total} (mmol/g MS)	
C							
	SGgr	72.3 _b	19.4 _a	8.3 _a	3.9 _b	9.1 _a	
	SL	85.8 _a	9.9 _b	4.3 _b	7.5 _a	4.5 _b	
	F _{1, 145}	115.6	97.0	37.7	148.1	49.9	
	Sig ³	***	***	***	***	***	
RIA							
	SGgr	75.1	18.3	6.6	4.3	8.6 _a	
	SL	76.4	18.1	5.4	4.5	5.9 _b	
	F _{1, 145}	1.2	0.02	3.5	0.3	19.1	
	Sig ³	NS	NS	†	NS	***	
RIDN							
	SGgr	63.1 _b	29.8 _a	7.1	2.1	7.0 _a	
	SL	68.1 _a	25.1 _b	6.7	2.8	5.4 _b	
	F _{1, 145}	16.9	24.3	0.4	1.6	0.4	
	Sig ³	***	***	NS	NS	*	
	EEM ¹	0.98	0.75	0.51	0.39	0.49	
Estadístico							
	Frac	F _{2, 145}	129.4	195.6	2.3	81.0	2.5
	Forr	F _{1, 145}	86.5	75.72	25.1	66.7	65.5
	Frac x Forr	F _{2, 145}	25.26	24.4	8.7	43.5	5.5
Significancia²							
	Frac	***	***	NS	***	NS	
	Forr	***	***	***	***	***	
	Frac x Forr	***	***	***	***	**	

¹ EEM = error estándar de la media; ² NS: no significativo; †, P<0.10; *, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001. Letras diferentes en la misma columna difieren estadísticamente P<0.05, Tukey.

³ Slice por Fracción.

La desaparición de las diferentes fracciones del ensilaje completo identificadas como MSDc, FDNDc, FDADc y HemiDc resultó de los promedios obtenidos por la incubación del sustrato completo. Como se esperaba, estuvieron positivamente correlacionadas con MSDc y FDNDc ($P < 0.05$) pero no así con FDADc, tanto en SGgr como SL (Cuadro 3.9). Por otro lado, RIADc y RIDNDc corresponden a las desapariciones promedio obtenidas de incubar los RI y corregir por la proporción de los RI respecto del sustrato completo. Solamente el RIDNc mostró una correlación positiva con la HemiDc para SL; pareciera apropiado ya que en el RIDN es donde la Hemi se encuentra con mayor concentración en SL (Cuadro 3.2). Además se calculó por diferencia la desaparición de las fracciones solubles SADc, SDNDc y (SDN-SA)Dc; se encontraron coeficientes de correlación positivos entre SADc y MSDc, FDNDc, FDADc y HemiC para SGgr. También (SDN-SA)Dc tuvo correlación positiva con MSDC y FDNDc. En contraste en SL solo SDNDc se correlacionó negativamente con HemiDc. En resumen, para SGgr la mayor contribución a la MSDc la realizaron SADc y (SDN-SA)Dc, siendo la correlación positiva; mientras que en SL el nivel de desaparición de FDN, FDA y Hemi resultaron los factores determinantes de la MSDc y FDNDc.

La correlación entre las variables de desaparición, cinética de PG y perfil de fermentación *in vitro* del sustrato completo y las correspondientes a las fracciones estudiadas se informan en Cuadro 3.10 y Cuadro 3.11 para SGgr y SL, respectivamente. La MSD del sustrato completo esta positivamente correlacionada con μ_{50} , Tmax y AGVt y negativamente con T50. En tanto que TTmax afecta negativamente a HemiD y Tmax, así como en forma positiva TTmax a la fase Lag. Por otro lado, la Tmax del RIA se correlaciona con Tmax de C pero negativamente

con T50 y TTmax presentó un efecto negativo sobre MSD, HemiD, Tmax y μ_{50} . Además cuanto mas aumenta la extensión de la digestión de Hemi de RIDN, más se retrasa TTmax y T50 en C. Esto último podría resultar de interés para diseñar ecuaciones que permitan corregir la reducción en digestibilidad por disminución en el tiempo medio de retención ruminal. Las variables Tmax y TTmax de C y RIA resultaron de influencia sobre la desaparición del sustrato en C. También presentan la ventaja de ser fácilmente cuantificables a partir de los resultados de PG sin modelar. En cualquiera de los casos estudiados el aumento en la cantidad de AGVt en el residuo provoca una disminución en la relación Ac/Pro del sustrato C.

Cuadro 3.9 Coeficiente de correlación entre las desapariciones de sustrato del forraje ensilado completo y residuos en base al sustrato completo o al residuo.

	Desaparición de sustrato ³									Base R ²	
	Base forraje completo ¹									RIAD	RIDND
	MSDc	FDNDc	FDADc	HemiDc	RIADc	RIDNDc	SADc	SDNDc	(SDN-SA)Dc		
Forraje ensilado de gramíneas con grano (SGgr)											
MSDc	1										
FDNDc	0,81	1									
FDADc	0,65	0,92	1								
HemiDc	0,83	0,85	0,58	1							
RIADc	0,45	0,11	-0,02	0,26	1						
RIDNDc	-0,36	0,10	0,14	-0,02	-0,07	1					
SADc	0,73	0,79	0,72	0,70	-0,28	-0,33	1				
SDNDc	0,56	0,04	-0,09	0,22	0,87	-0,56	-0,07	1			
(SDN-SA)Dc	0,95	0,63	0,49	0,69	0,40	-0,64	0,72	0,65	1		
RIAD	0,82	0,34	0,17	0,52	0,72	-0,58	0,33	0,89	0,87	1	
RIDND	0,71	0,38	0,22	0,56	0,67	-0,17	0,26	0,64	0,64	0,81	1
Forraje ensilado de pastura base leguminosa (SL)											
MSDc	1										
FDNDc	0,94	1									
FDADc	0,92	0,98	1								
HemiDc	0,80	0,85	0,74	1							
RIADc	0,31	0,48	0,50	0,42	1						
RIDNDc	0,66	0,77	0,68	0,92	0,71	1					
SADc	0,72	0,54	0,50	0,45	-0,44	0,10	1				
SDNDc	-0,65	-0,66	-0,52	-0,94	-0,14	-0,80	-0,51	1			
(SDN-SA)Dc	0,16	-0,04	0,05	-0,39	-0,60	-0,64	0,60	0,39	1		
RIAD	0,16	0,16	0,10	0,39	0,74	0,62	-0,39	-0,25	-0,65	1	
RIDND	0,53	0,58	0,48	0,80	0,72	0,92	-0,02	-0,68	-0,66	0,83	1

¹ Desapariciones en base al ensilaje completo: MSDc, materia seca; FDNDc, fibra insoluble en detergente neutro; FDADc, fibra insoluble en detergente ácido; HemiDc, hemicelulosa; RIADc, residuo insoluble en agua; RIDNDc, residuo insoluble en detergente neutro; SADc, fracción soluble en agua; SDNDc, fracción soluble en detergente neutro; (SDN-SA)Dc, diferencia entre fracciones solubles en DN y A

² Desapariciones en base a los residuos: RIA, residuo insoluble en agua; RIDN, residuo insoluble en detergente neutro.

³ Valores en negrita son significativos (P < 0.05)

Cuadro 3.10 Coeficiente de correlación entre las desapariciones de sustrato, variables de cinética de producción de gas (PG) y perfil fermentativo (PF) del forraje ensilado de gramíneas con grano (SGgr) completo con los residuos insolubles en agua y detergente neutro (RIA y RIDN).

	Forraje ensilado completo (C) ¹										
	Desaparición				Cinética de PG					PF	
	MSD	FDND	FDAD	HemiD	Tmax	TTmax	Lag	t50	μ50	Ac/Pro	AGVt
Forraje ensilado completo (C)											
Tmax	0.78	0.36	0.13	0.57	1						
TTmax	-0.56	-0.26	0.06	-0.69	-0.60	1					
Lag	-0.12	0.05	0.36	-0.42	-0.20	0.85	1				
T50	-0.79	-0.43	-0.13	-0.77	-0.82	0.92	0.62	1			
M50	0.94	0.62	0.42	0.75	0.90	-0.63	-0.16	-0.86	1		
Ac/Pro	-0.09	0.05	0.02	0.14	-0.32	-0.31	-0.32	-0.07	-0.10	1	
AGVt	0.64	0.17	-0.09	0.45	0.86	-0.56	-0.28	-0.75	0.77	-0.28	1
Residuo insoluble en agua (RIA)											
MSD	0.82	0.34	0.17	0.52	0.92	-0.62	-0.21	-0.84	0.88	-0.23	0.85
FDND	0.83	0.38	0.25	0.53	0.90	-0.63	-0.20	-0.84	0.91	-0.17	0.74
FDAD	0.41	0.00	0.14	-0.09	0.50	-0.08	0.28	-0.30	0.49	-0.26	0.31
HemiD	0.77	0.51	0.18	0.84	0.81	-0.86	-0.61	-0.93	0.80	-0.01	0.75
Tmax	0.85	0.43	0.24	0.58	0.95	-0.54	-0.09	-0.80	0.95	-0.24	0.88
TTmax	-0.86	-0.46	-0.26	-0.66	-0.83	0.75	0.41	0.91	-0.88	0.12	-0.73
Lag	0.79	0.51	0.45	0.48	0.63	-0.30	0.14	-0.58	0.76	-0.09	0.64
T50	-0.80	-0.35	-0.12	-0.59	-0.96	0.68	0.27	0.88	-0.94	0.17	-0.86
μ50	0.86	0.43	0.22	0.62	0.95	-0.64	-0.21	-0.87	0.96	-0.20	0.85
Ac/Pro	-0.14	-0.39	-0.31	-0.44	0.07	0.31	0.28	0.20	-0.15	-0.40	0.34
AGVt	0.74	0.28	0.11	0.48	0.90	-0.62	-0.19	-0.79	0.85	-0.04	0.85
Residuo insoluble en detergente neutro (RIDN)											
MSD	0.71	0.38	0.22	0.56	0.61	-0.63	-0.36	-0.74	0.66	0.03	0.70
FDND	0.75	0.39	0.26	0.54	0.65	-0.62	-0.31	-0.75	0.71	0.02	0.69
FDAD	0.22	-0.04	0.11	-0.11	0.12	-0.09	0.07	-0.16	0.15	0.05	0.14
HemiD	0.79	0.49	0.18	0.82	0.77	-0.89	-0.62	-0.96	0.82	0.10	0.79
Tmax	0.53	0.05	-0.20	0.39	0.70	-0.68	-0.49	-0.76	0.59	-0.09	0.88
TTmax	-0.30	-0.07	-0.06	-0.09	-0.43	0.16	-0.18	0.24	-0.41	-0.30	-0.45
Lag	-0.58	-0.53	-0.66	-0.36	0.03	-0.35	-0.53	0.36	-0.47	-0.20	0.11
T50	-0.46	-0.36	-0.49	-0.20	-0.05	-0.41	-0.43	0.41	-0.39	0.12	0.16
μ50	-0.21	-0.31	-0.44	-0.20	0.32	-0.34	-0.24	0.02	-0.12	-0.23	0.42
Ac/Pro	-0.64	-0.30	-0.13	-0.47	-0.64	0.52	0.21	0.69	-0.76	-0.12	-0.74
AGVt	0.57	0.20	0.05	0.33	0.57	-0.40	-0.25	-0.56	0.51	-0.28	0.76

¹ MSD, materia seca desaparecida; FDND; fibra insoluble en detergente neutro desaparecida; FDAD, fibra insoluble en detergente ácido desaparecida; HemiD, hemicelulosa desaparecida; Tmax, tasa máxima de PG; TTmax, tiempo a Tmax; Lag, fase de retardo en la PG; t50, tiempo hasta alcanzar el 50% del gas; μ50, tasa fraccional al t50; Ac/Pro, relación de los ácidos acético y propiónico; AGVt, ácidos grasos totales producidos.

Valores en negrita son significativos (P < 0.05)

Cuadro 3.11 Coeficiente de correlación entre las desapariciones de sustrato, variables de cinética de producción de gas (PG) y perfil fermentativo (PF) del forraje ensilado de pastura base leguminosas (SL) completo con los residuos insolubles en agua y detergente neutro (RIA y RIDN).

	Forraje ensilado completo (C) ¹										
	Desaparición				Cinética de PG					PF	
	MSD	FDND	FDAD	HemiD	Tmax	TTmax	Lag	t50	μ50	Ac/Pro	AGVt
Forraje ensilado completo (C)											
Tmax	-0.67	-0.70	-0.70	-0.57	1						
TTmax	0.59	0.80	0.86	0.53	-0.58	1					
Lag	-0.48	-0.45	-0.31	-0.79	0.16	-0.04	1				
T50	-0.78	-0.82	-0.87	-0.50	0.89	-0.78	-0.02	1			
μ50	0.52	0.69	0.79	0.28	-0.57	0.93	0.28	-0.83	1		
Ac/Pro	0.24	0.43	0.40	0.54	-0.67	0.55	-0.37	-0.43	0.34	1	
AGVt	-0.05	-0.17	-0.07	-0.50	0.40	-0.12	0.61	0.02	0.16	-0.87	1
Residuo insoluble en agua (RIA)											
MSD	0.16	0.16	0.10	0.39	0.16	-0.01	-0.79	0.27	-0.32	0.29	-0.54
FDND	0.46	0.46	0.36	0.70	-0.32	0.17	-0.82	-0.10	-0.11	0.58	-0.75
FDAD	0.49	0.39	0.29	0.61	-0.59	-0.01	-0.69	-0.26	-0.19	0.57	-0.73
HemiD	0.31	0.41	0.32	0.66	-0.09	0.28	-0.81	0.05	-0.05	0.58	-0.72
Tmax	-0.16	-0.11	-0.01	-0.34	0.66	0.11	0.24	0.29	0.15	-0.52	0.58
TTmax	0.06	0.24	0.21	0.34	-0.66	0.41	-0.13	-0.37	0.29	0.93	-0.80
Lag	-0.79	-0.91	-0.88	-0.85	0.58	-0.78	0.63	0.63	-0.55	-0.62	0.43
T50	0.68	0.69	0.72	0.51	-0.24	0.54	-0.50	-0.42	0.38	0.21	-0.09
M50	0.26	0.48	0.59	0.15	-0.38	0.85	0.19	-0.60	0.82	0.42	0.01
Ac/Pro	0.36	0.48	0.39	0.72	-0.69	0.39	-0.59	-0.38	0.15	0.92	-0.90
AGVt	-0.42	-0.43	-0.29	-0.78	0.57	-0.11	0.78	0.23	0.13	-0.71	0.85
Residuo insoluble en detergente neutro (RIDN)											
MSD	0.53	0.58	0.48	0.80	-0.08	0.31	-0.92	-0.06	-0.02	0.36	-0.48
FDND	0.45	0.49	0.40	0.70	-0.01	0.25	-0.88	0.04	-0.07	0.36	-0.51
FDAD	0.58	0.64	0.59	0.70	-0.14	0.45	-0.77	-0.17	0.17	0.39	-0.42
HemiD	0.07	0.11	-0.03	0.55	0.18	-0.11	-0.87	0.40	-0.45	0.34	-0.67
Tmax	0.24	0.34	0.25	0.59	-0.40	0.25	-0.53	-0.13	0.04	0.75	-0.82
TTmax	0.45	0.69	0.73	0.52	-0.42	0.91	-0.20	-0.58	0.76	0.58	-0.23
Lag	0.23	0.41	0.38	0.39	0.10	0.51	-0.05	-0.16	0.45	-0.07	0.25
T50	-0.57	-0.76	-0.85	-0.38	0.46	-0.97	-0.08	0.75	-0.95	-0.36	-0.08
μ50	0.20	0.08	0.05	0.06	0.56	-0.17	-0.16	0.26	-0.16	-0.76	0.64
Ac/Pro	0.01	-0.14	-0.16	-0.16	0.59	-0.36	-0.02	0.33	-0.30	-0.85	0.71
AGVt	0.00	-0.20	-0.18	-0.31	0.60	-0.40	0.18	0.34	-0.25	-0.90	0.76

¹ MSD, materia seca desaparecida; FDND; fibra insoluble en detergente neutro desaparecida; FDAD, fibra insoluble en detergente ácido desaparecida; HemiD, hemicelulosa desaparecida; Tmax, tasa máxima de PG; TTmax, tiempo a Tmax; Lag, fase de retardo en la PG; t50, tiempo hasta alcanzar el 50% del gas; μ50, tasa fraccional al t50; Ac/Pro, relación de los ácidos acético y propiónico; AGVt, ácidos grasos totales producidos.

Valores en negrita son significativos (P < 0.05)

En cuanto a las correlaciones observadas para SL, TTmax presentó correlación positiva con FDND y FDAD de C. En tanto que T50 de C con efecto negativo sobre MSD, HemiD y Tmax y la TTmax del RIA también sobre MSD, HemiD y Tmax. Finalmente, la reducción de la fase *Lag* de C parecería estar asociada con mayores desapariciones de sustrato en RIDN probablemente a causa de un inicio más temprano de la digestión que con una prolongación en el tiempo de la misma, ya que T50 de RIDN están asociados negativamente con FDND, FDAD, TTmax y μ_{50} de C.

Por último, en los SGgr al análisis de la fracción RIA en desaparición de sustrato así como de la cinética de PG pareciera aportar mayor cantidad de información sobre lo ocurrido con el sustrato C que RIDN. Mientras que para SL no existe una prevalencia de alguno de los RI acerca de cual de los dos brinda mayor información al respecto de la degradación de C.

3.5. Discusión

El NRC (2001) describe en ensilajes de planta entera de maíz 480 $a\text{FDN}_{\text{mo}}$ y 90 PB g/kg MS, para ensilajes de sorgo granífero 607 y 91 y para aquellos de avena 606 y 129 g/kg MS. Hoffman y otros (2003) reportaron para ensilajes de planta entera de maíz valores de 40 y 8.2 % de $a\text{FDN}_{\text{mo}}$ y PB, respectivamente. En tanto que Huhtanen y otros (2003) y Shaver (2004) para el mismo tipo de forrajes cita entre 300 a 540 de $a\text{FDN}_{\text{mo}}$ y 130 a 430 de Alm g/kg MS. Los SGgr de este trabajo presentaron cantidades mayores $a\text{FDN}_{\text{mo}}$ de y menores de Alm y PB (378-799 $a\text{FDN}_{\text{mo}}$, 365-38 Alm y 56 PB g/kg MS; Cuadro 2.1). Sin embargo sí fueron similares a los reportados por Fernández y otros (2004) quienes describen ensilajes de planta entera de maíz en estado fenológico temprano y tardío. Algo similar ocurrió al comparar los resultados de las fracciones analíticas de los SL con los de otros autores. Tanto Hoffman y otros (2003) como NRC (2001) describen los ensilajes de pastura en base alfalfa con menos $a\text{FDN}_{\text{mo}}$ y mas PB, mientras que los de gramíneas con valores mucho mas cercanos a los aquí reportados.

El perfil fermentativo de los SGgr y SL no resultó característico de los informados para silos experimentales de laboratorio donde las condiciones de fermentación fueron controladas (Driehuis y otros, 2001; Hill y otros, 2001; Jaurena y Pichard, 2001; Johnson y otros, 2003; Kamalak y otros, 2003; Filya, 2004; Khorvash y otros, 2006). Los SL estudiados presentaron la mitad de Lac y un punto más de pH en comparación a lo descrito por Huhtanen y otros (2003) en ensilajes de pastura (n = 234) de confección comercial. En el mismo sentido, los contenidos de Ac, Prop y But en el presente trabajo fueron 2, 4 y 5 veces superiores, respectivamente, a lo observado por otros autores. Los SGgr tuvieron mayor pH y menor Ac que los de Fernández y otros (2004) y aunque se registró 3 veces más

Lac no fue suficiente como para garantizar una AT superior a 400 meq/kg MS que se esperan para este tipo de ensilajes. El perfil de fermentación (Cuadro 3.1) así como la composición de los mismos (Cuadro 2.1) describen ensilajes de menor valor nutritivo que los descritos por otros autores antes citados. Por otro lado, Gaggiotti y otros (1996), Guaita y Fernández (2005) y Jaurena y Danelón (2006) reportan composiciones similares a los encontrados en este trabajo para forrajes ensilados de la región pampeana y cuenca lechera central argentina. La menor calidad observada en los ensilajes puede estar explicada por la baja calidad promedio de los forrajes ensilados producidos en el país así como por el procedimiento de re-ensilado que fue necesario para trasladar las muestras ya fermentadas de este trabajo al sitio final de estudio.

La incubación *in vitro* de los residuos, RIA y RIDN, permite disponer de estimaciones de las tasas de digestión de estas fracciones en forma rápida. La técnica de las curvas de substracción asume que la preparación de los RI no altera su composición ni la disponibilidad de los CHO que las forman (Pell y Schofield, 1993). Sin embargo y aunque esto se cumpla, la disponibilidad de azúcares solubles, pequeños oligosacáridos y ácidos solubles asociados a los componentes de la fibra pueden modificar la tasa y extensión de la digestión (Piwonka y Firkins, 1996; Doane y otros, 1998). La remoción de los componentes solubles en las extracciones impide la interacción entre los componentes del alimento que ocurren durante la fermentación del sustrato completo. La ausencia de los componentes de rápida disponibilidad para los microorganismos ruminales podría afectar negativamente la degradabilidad de las fracciones más refractarias como los componentes de PC. Los efectos de los CHOs y otras sustancias removidas y sus interacciones con la fibra pueden ser analizados comparando las desapariciones de las diferentes fracciones incubadas (*i.e.* C, RIA y RIDN). En caso que hubiera

existido este efecto negativo sobre las desapariciones de los componentes de PC en RIA y RIDN no sería adecuado analizar la información aportada por las cinéticas de degradación de éstos residuos como explicativas de los procesos de digestión de esas fracciones en el sustrato completo. Las FDND, FDAD y HemiD no presentaron diferencias entre los sustratos incubados (Cuadro 3.3), posiblemente a causa del prolongado tiempo de digestión (*i.e.* 72 horas). Hoffman y otros (2003) mencionan para ensilajes de planta entera de maíz y pastura de alfalfa que de 30 a 48 horas de incubación *in vitro* aumenta la digestibilidad de la FDN. En la Figura 3.2 se observan las relaciones establecidas entre las desapariciones de los componentes de PC (FDN, FDA y Hemi) de los residuos incubados respecto de los resultados obtenidos al incubar el ensilaje completo. En ninguno de los casos se detectan diferencias de las FDND, FDAD y HemiD entre el sustrato C y los RIA y RIDN. Sólo en el caso de la HemiD se observa una nube de puntos con mayor dispersión probablemente a causa de los errores acumulados para su estimación, dado que la hemicelulosa no fue medida en forma directa sino que su concentración fue estimada a partir de la diferencia entre FDN y FDA según lo descrito por Van Soest y otros (1991). Sin embargo aunque no se hayan detectado diferencias entre las fracciones para las desapariciones de fibra a tiempo final no se puede asegurar que no haya sido afectada la cinética de la misma.

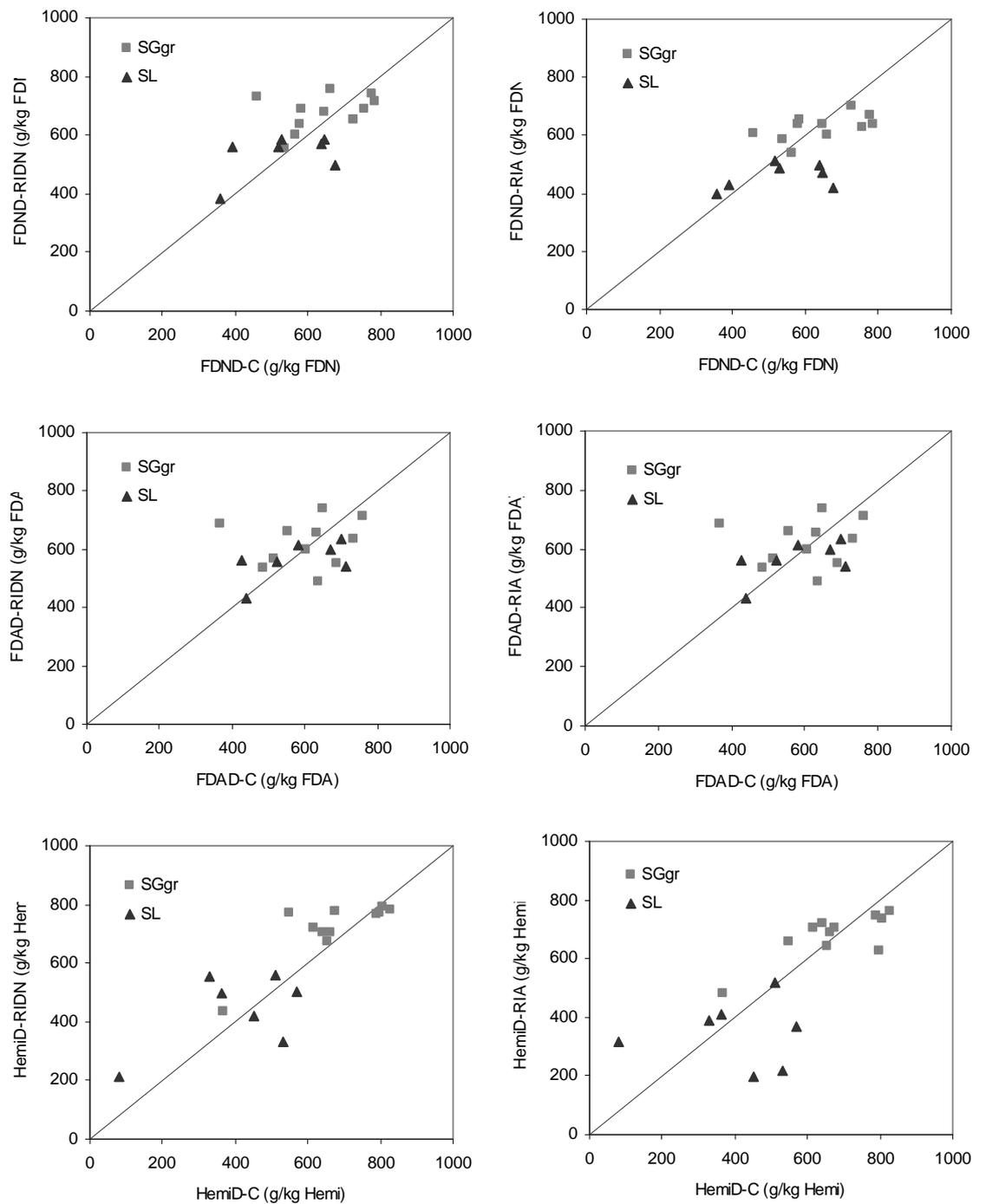


Figura 3.2 Relación entre las desapariciones de FDN, FDA y Hemicelulosa (FDND, FDAD y HemiD) en el sustrato completo y los residuos en agua y detergente neutro (C, RIA y RIDN) del ensilaje de gramíneas con grano y pastura base leguminosas (SGgr ■; SL ▲).

La concentración de LDA_{as} afectó negativamente la MSD, FDND y HemiD resultando el factor más importante en la determinación de la degradabilidad de estas fracciones entre las fracciones analíticas (*i.e.* $r = -0.82$, -0.58 y -0.75 , respectivamente). La HemiD en cambio se correlacionó positivamente con la MSD y FDND (Cuadro 3.9). En coincidencia con Riboulet y otros (2008) quienes encontraron en plantas de maíz $r = -0.88$ y -0.60 para FDND y HemiD con LDA/FDN . Mencionaron además al contenido de ácido *p*-cumárico (*e.g.* uno de los componentes del polímero de lignina) como el mejor estimador del valor nutritivo de los alimentos, aunque el éter de ácido ferúlico también presentó correlación negativa. En cambio en gramíneas perennes fueron citados el ácido ferúlico (Lam y otros, 2003) y el *p*-cumárico con enlaces éter/éster (Kasuya y otros, 2008). Por otro lado, a mayor HemiD en RIA y RIDN de SGgr la TT_{max} , fase *Lag* y T50 fueron menores y en SL se redujo solo la fase *Lag* sugiriendo que los ensilajes con más HemiD serán degradados rápidamente y quizás con menores consecuencias negativas provocadas por el aumento del consumo o la tasa de pasaje (Cuadro 3.10 y Cuadro 3.11). Yan y Agnew (2004b) encontraron valores superiores a los aquí reportados de MSD y tasas de degradación para ensilajes de pastura de menor contenido de ${}_aFND_{mo}$ y Lig_{as} . (*i.e.* $84\% MSD_{in situ}$ con una tasa de degradación de $0.035 h^{-1}$). Sin embargo detectaron que la fracción soluble, es decir al parámetro *a* del modelo de Ørskov y McDonald (1979) estimada *in situ* resultó el mejor predictor de la degradabilidad de la MS, al igual que en este trabajo en el que la SAc tuvo un $r = 0.73$ y 0.72 para SGgr y SL (Cuadro 3.9).

Las FDND reportadas por Shaver (2004) coinciden con las encontradas en este trabajo. La MSD de RIA y RIDN fue menor que la del sustrato completo en acuerdo con lo encontrado por otros autores para un diverso tipo de forrajes (Doane y otros, 1997a; Hall y otros, 1998; Williams y otros, 2000; Hoffman y otros, 2003).

Doane y otros (1997c) también encontraron que la FDND en sustratos no fraccionados (*i.e.* pastura de alfalfa y cebadilla en estado temprano y tardío de madurez y paja de trigo) resultó de la misma magnitud que en los RIDN. Por otro lado, al igual que lo detectado en este trabajo, Sullivan (1966) y Van Soest y otros (1991) encontraron que la degradabilidad de la hemicelulosa de forrajes de leguminosas fue menor que en gramíneas; y argumentan que dichas diferencias obedecen a los enlaces químicos entre dicha sustancia y la lignina en la PC (Kasuya y otros, 2008). Más recientemente Grabber y otros (2009) encontraron que el aumento en la cantidad de enlaces cruzados del ácido ferúlico con los componentes de la pared celular de plantas de maíz disminuye más la degradabilidad de la hemicelulosa que el contenido de LDA_{as}. Además Lam y otros (2003) reportaron resultados similares para *Lolium perenne*. En este trabajo se encontró que independientemente del tipo de ensilaje estudiado el contenido de LDA afectó negativamente la MSD y especialmente HemiD (*i.e.* $r = -0.818$ y -0.745 ; $P < 0.0001$) aunque en menor medida la FDND también fue afectada (*i.e.* $r = -0.593$; $P < 0.01$).

La diferencia de 136 g/kg MSDc de la contribución del RIA a la MSDc entre SGgr y SL (*i.e.* 443 y 307 g RIA/kg MSDc, respectivamente; Cuadro 3.3) es menor a la cantidad de Alm (*i.e.* 219 y 10 g Alm/kg MS en SGgr y SL; Cuadro 3.2) presente en el sustrato competo. Esto sugiere que en RIA de SL existe una sustancia no cuantificada en el presente trabajo y que presentó una degradabilidad similar a la del almidón de SGgr. Shaver (2004) reportó para ensilajes de planta entera de maíz 82% de digestibilidad del almidón, mientras que calculado por diferencia entre las desapariciones de RIAc y RIDNc en este trabajo se encontró 75% (Figura 3.3). La estimación por diferencia entre los RI se debe tener en cuenta que dicha diferencia contiene también otras sustancias además de Alm y quizás de menor digestibilidad

que este último. Se encontró que la relación entre la desaparición del sustrato que se calculó como la diferencia RIAc-RIDNc se correlacionó con el contenido de Alm para SGgr, mientras que para SL el almidón no sería el único sustrato digerido (Figura 3.3). Los compuestos de la FDN soluble presente en el SL podrían ser los que se estén digiriendo en la mencionada fracción.

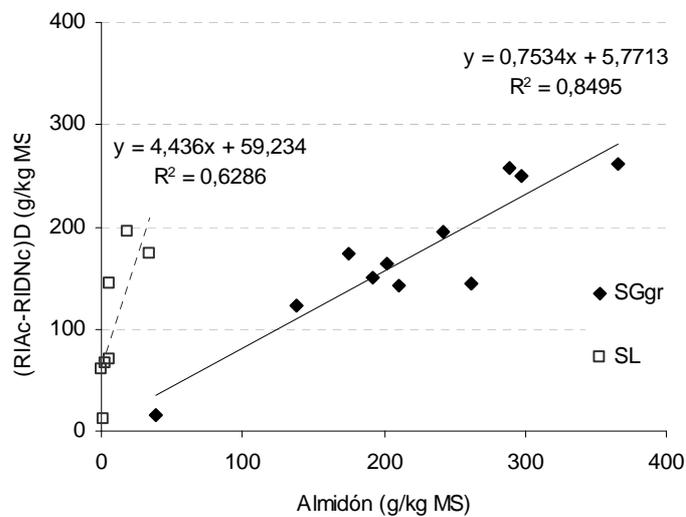


Figura 3.3 Relación entre la materia seca desaparecida de la diferencia entre el residuo insoluble en agua y en detergente neutro expresado en base completa en función de la concentración de almidón del forraje ensilado de gramíneas con grano y pastura en base leguminosas (SGgr y SL).

En alimentos con bajo contenido de almidón, como en el caso de SL, la diferencia entre el residuo insoluble en etanol (RIE) y RIDN corresponde a la FDN soluble, compuesta por (1→3)(1→4)-β-glucanos, fructosanos y pectinas (Hall y otros, 1998). La familia de las leguminosas se caracteriza por el alto contenido de pectinas (Van Soest y otros, 1991). La extracción en agua, a diferencia de la extracción con etanol, remueve parte de los β-glucanos quedando las otras sustancias como remanente en el RIA (Van Soest y otros, 1991). Titgemeyer y otros (1992) reportaron alta degradabilidad en sustancias pécticas de forraje de alfalfa. En entrenudos de alfalfa se encontró que al aumentar el contenido de lignina la

degradabilidad de la celulosa y hemicelulosa fue fuertemente afectada a las 12 h disminuyendo un 60% en comparación con la pectina que sufrió un 30% de reducción. Mientras que a las 96 h de incubación *in vitro* solo la celulosa recuperó 15 puntos porcentuales de degradabilidad; resultando la hemicelulosa la sustancia de la PC mas afectada por el nivel de lignificación y en especial con la acumulación de *p*-cumárico (66% de pérdida de degradabilidad - Jung y Engels, 2002).

Las PGA de los SGgr resultaron superiores a las reportadas por Taghizadeh y otros (2006) y Nsahlai y otros (1994) hasta las 48 h (e.g. hasta 50% como máximo), luego las diferencias se redujeron. La colecta de licor ruminal fue efectuada en ovinos que consumieron una dieta similar a la del presente trabajo pero 2 h luego en vez de antes de la ingesta.

La PGA 72 h de los RI fue superior a C. La contribución de los RIA y RIDN a la PGA 72 horas no se correspondió con lo reportado para MSDc (Figura 3.4). Es decir que las proporciones de PGA72 y MSD de RIA y RIDN respecto del sustrato completo no fueron iguales. En SGgr se observó que del total de MSDc el 60% correspondió a RIA, mientras que de PGA72 cerca del 90%. Lo mismo se encontró en SL aunque en mayor magnitud, alcanzando al 100% del total de PGA72. La consecuencia de esto sería que al momento de efectuar el cálculo de la PGA de la fracción soluble en agua (diferencia PGA-C – PGA-RIA) existiría la posibilidad que a tiempos superiores a 24 - 48 horas de incubación encontremos valores negativos de PGA. Doane y otros (1997a), Williams y otros (2000) y Sánchez y otros (2005) también observaron mayor PGA al incubar PC aislada aunque la desaparición de la misma fue siempre menor respecto del sustrato completo al igual que los resultados aquí informados. Hall y otros (1998) trabajaron con las curvas de substracción de

RIE y RIDN hasta las 24 horas de incubación *in vitro* para caracterizar algunos concentrados energéticos.

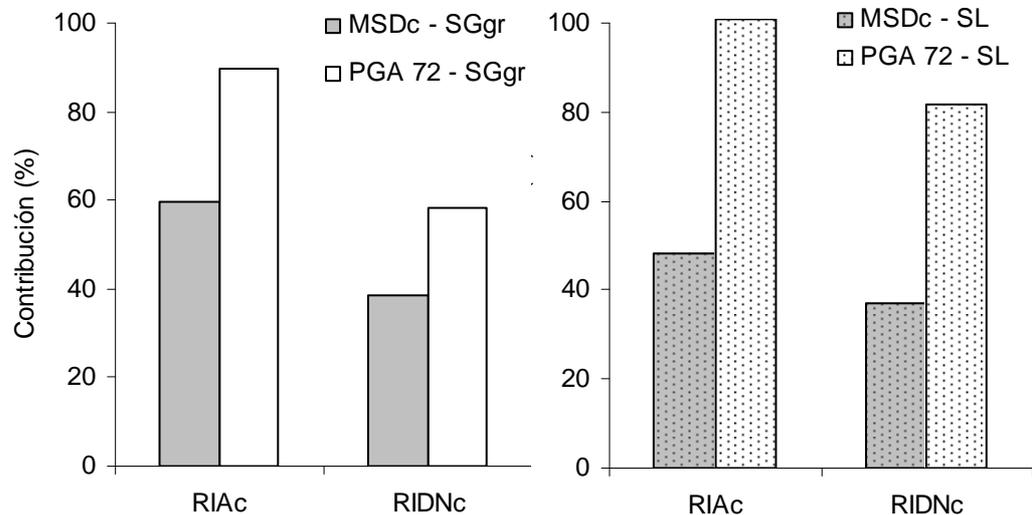


Figura 3.4 Contribución de los residuos insolubles en agua y detergente neutro en base al sustrato completo (RIAc y RIDNc) a la materia seca desaparecida y la producción de gas acumulada a las 72 horas de incubación *in vitro* (MSDc y PGA72) para los forraje ensilados de gramíneas con grano y pasturas base leguminosas (SGgr y SL).

Con resultados algo superiores a los de este trabajo Grabber y otros (2009) determinaron una tasa de PG de 0.04 h^{-1} en PC de plantas de maíz y Schofield y Pell (1995b) de 0.07 h^{-1} en C y para ensilajes de pastura 0.05 h^{-1} . Sin embargo, las fases Lag reportadas por los autores fueron superiores para RIDN de SGgr y SL (*i.e.* 2.7 y 7.1 h) pero igual en C de SL (*i.e.* 1 h). Posiblemente las diferencias obedezcan a la calidad de los ensilajes, tal como fue comentado anteriormente, o a los modelos usados para ajustar las cinéticas de PG (*e.g.* modelo logístico con uno o dos pooles). Beuvink y Spoelstra (1994) encontraron en ensilajes de raigras T_{\max} de 15 ml/h y TT_{\max} 6.5 h coincidentes con los de este trabajo, en tanto que la Lag fue de 2.3 h, superior en 0.8 h.

Nadeau y otros (1996) analizaron *in situ* ensilaje de alfalfa y registraron las máximas MSD y FDND a las 20-25 horas de incubación, fase Lag de 1.4 h y tasas

de degradabilidad de $0.10h^{-1}$. A diferencia de lo encontrado en este trabajo realizado *in vitro* en el que la T95 ocurrió cerca de las 60 h, aunque los eventos más importantes ocurrieron durante las primeras 24 h. Para las tasas horarias de PG se observó que hasta las 30 horas para ambos forrajes; el sustrato C superó a los RIAc y RIDNc solo hasta las 10 h resultando a partir de las 25 h superiores los RI ($P < 0.0001$; Figura 3.5). Aunque en el caso de SL la magnitud de las tasas de C y RIAc fue la mitad respecto a SGgr. A partir de las 20 horas los residuos mantienen las tasas de PG por sobre el C y probablemente esto haya sido lo que permitió que los RI aumenten la contribución de PGA72 respecto de la MSDc. Lo hasta aquí discutido y los resultados informados sugieren que los cambios en el perfil de fermentación desarrollado durante la incubación de C, RIA y RIDN impediría el cálculo de las curvas de substracción hasta el final del período de incubación (*i.e.* 72 h). Sin embargo, pareciera que el cálculo de la PG de las fracciones solubles en agua (**SA**) y detergente neutro (**SDN**) mediante las curvas de substracción propuestas por Doane y otros (1997c) sería adecuado al menos hasta las 24 horas de incubación. Beuvink y Spoelstra (1992) reportaron que a partir de las 24 h *in vitro* se manifiestan los mayores cambios en la proporción de los AGV producidos, para sustratos puros de glucosa, almidón y celulosa.

En acuerdo a lo encontrado en este trabajo, Taghizadeh y otros (2006) al incubar ensilaje de planta entera de maíz y sus RIE y RIDN también encontraron que las PGA a partir de las 48 h fueron mayores en los RI que en C, alcanzando valores 7% superiores a las 96 h ($MSD_{in vitro}$ $a=4.0\%$, $b=66.3\%$ y $c=0.03\%/h$); también al igual que en este trabajo encontraron una buena correlación entre la MSD y la PGA ($r=0.99$). Mientras que Doane y otros (1998) encontraron menores PGA en los RI que en C.

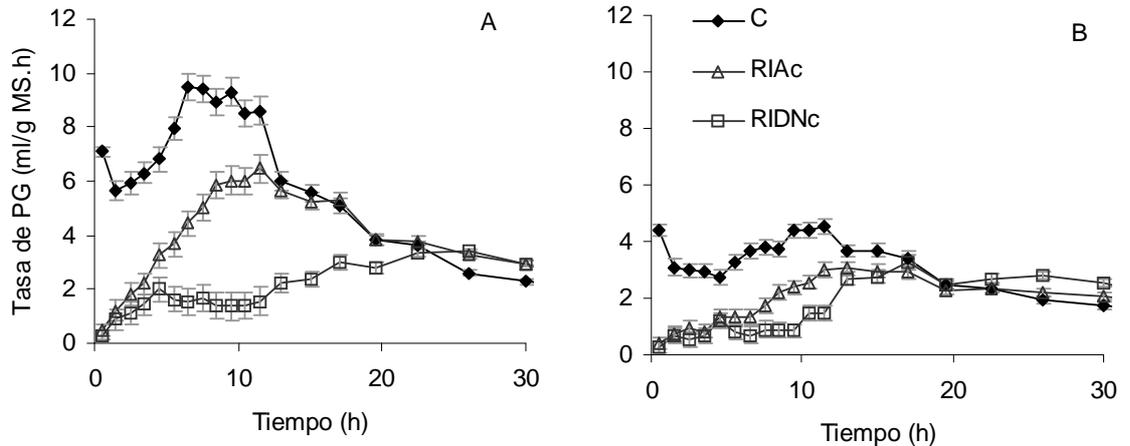


Figura 3.5 Tasas horarias de producción de gas (ml/g MS.h^{-1}) en función del tiempo de incubación *in vitro* de sustrato completo, residuo insoluble en agua y en detergente neutro (C, \blacklozenge ; RIAC, \triangle ; RIDNc, \square respectivamente) para ensilajes de gramíneas con grano (SGgr – A) y pasturas en base leguminosas (SL – B). Las barras verticales corresponden al error estándar de la media.

Las tasas horarias de SA y (SDN-SA) se muestran en la Figura 3.6. SA resultó rápidamente fermentable y con una vida media de 5 h aproximadamente tanto para SGgr como SL, en coincidencia a lo reportado por Hatfield y Weimer (2006) para sustancias pécticas de hojas y tallos de alfalfa. Por otro lado, (SDN-SA) fue degradado entre las 5 y 20 y 6 y 15 horas de digestión para SGgr y SL, respectivamente. Como fue mencionado con anterioridad, la magnitud de las tasas de SGgr fue del orden de 2 veces las de SL debido al Alm retenido en esta fracción (Figura 2.2). En acuerdo con lo reportado por Beuvink y Spoelstra (1992) para sustratos de almidón puro de arroz y celulosa, se identificó la mayor tasa de PG a las 10 h en SGgr para la fracción almidonosa (*i.e.* (SDN-SA) y a partir de las 15 h para la RIDN.

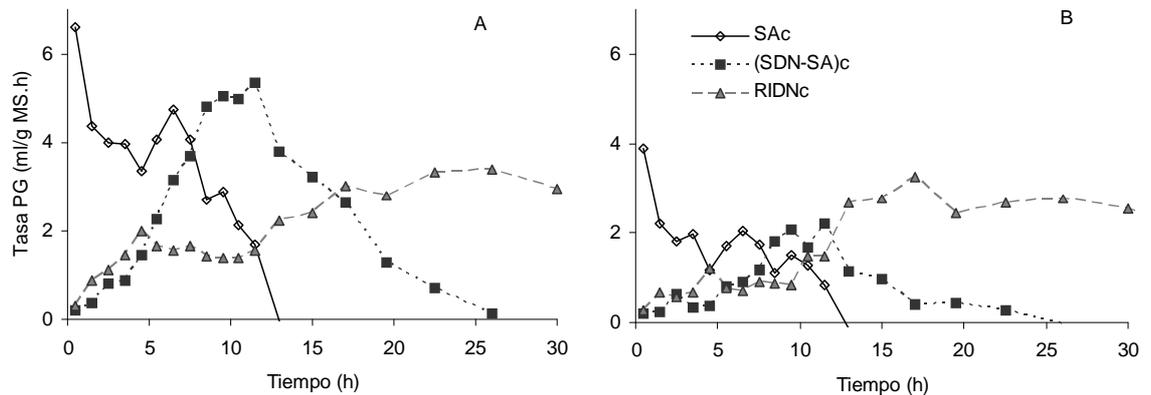


Figura 3.6 Tasas horarias de producción de gas (PG) en función del tiempo de incubación *in vitro* de la fracción soluble en agua (\diamond , SAc), soluble en detergente neutro menos SA (\blacksquare , (SDN-SA)c) y residuo insoluble en detergente neutro (\blacktriangle , RIDNc) para forraje ensilado de gramíneas con grano (A) y pasturas base alfalfa (B).

En la Figura 3.6 se observa la PG de (SDN-SA)c en SL no realiza un aporte sustancial a la PG de C en comparación a SA y RIDN ya que las tasas de PG se aproximan los 2 ml/g MS.h⁻¹ sólo durante 3 horas (*i.e.* 8.5 a 1.5 horas), mientras que las otras fracciones duplican y triplican estos valores. Van Soest y otros (1991) mencionan a los β -glucanos como sustancias muy solubles en agua, mientras que a las pectinas solo parcialmente solubles. Bach y Calsamiglia (2006) mencionan que las gramíneas contienen alta cantidad de β -glucanos. Por las diferencias encontradas entre SAc y (SDN-SA)c en SL sería probable que la fracción de fibra soluble esté compuesta principalmente por β -glucanos (*e.g.* mayor 50%) que habrían sido lavados durante la preparación de los sustratos y por esto la PG correspondiente contribuye al SAc más que al (SDN-SA)c. Las menores tasas de PG en SL de las fracciones más lábiles se deban probablemente a que parte de la FDN soluble fue fermentada a AGV durante el almacenamiento del forraje.

A diferencia de lo esperado, la cantidad de AGVt producida por los RI en SL no presentó diferencias con C mientras que en SGgr fueron como máximo un 20% inferiores. Sin embargo otros autores también publicaron igual o mayor AGVt en los RIDN (Beuvink y Spoelstra, 1992; Doane y otros, 1997c; Hall y otros, 1998). Los

valores reportados por la bibliografía para la relación Ac/Pro obtenida en incubaciones *in vitro* suelen no superar el valor de 3 para un amplio rango de forrajes verdes y ensilados (Beuvink y Spoelstra, 1992; Schofield y Pell, 1995b; Doane y otros, 1997a; Campos y otros, 2002; Lowman y otros, 2002; Calabrò y otros, 2005). Sin embargo en el presente trabajo para C se observaron valores superiores (*i.e.* C 4 y 7.5; RIA 4 y 5 para SGgr y SL, respectivamente; Cuadro 3.8). Marounek y otros (1985) citados por Hall y otros (1998) mencionan que la relación Ac/Pro cuando se fermentan *in vitro* sustratos ricos en FDN soluble es mucho mayor a la obtenida con otro tipo de sustratos (*i.e.* almidonosos y fibrosos). Ariza y otros (2001) para dietas de vacas lecheras basadas en ensilaje de planta entera de maíz con pulpa de cítrico (*i.e.* 26.7 y 23.6 % MS_{dieta}) que contenía 55% de carbohidratos solubles en DN, reportaron una relación Ac/Pro de 4.1 determinada en un sistema de cultivo continuo *in vitro*. También fueron informados valores de 4.4 y 5.6 en simuladores de rumen (Feasenhiser, 2005). Posiblemente la fermentación de pectinas en el RIA de SL es la causa de la elevada relación Ac/Pro detectada. En el mismo sentido y aportando argumentos acerca de los cambios ocurridos durante la incubación de los residuos en el perfil de fermentación se observaron importantes diferencias en la contribución de los residuos a los AGV de C. En SL se cuantificó 2.5 veces de But en RIAc y RIDNc respecto de C (*i.e.* 0.10, 0.27 y 0.24 mmol But/g MSc; P=0.10) aunque las diferencias no alcanzaron a ser estadísticamente significativas; mientras que Pro para el mismo caso resultó 1.6 veces mayor en RIAc y RIDNc también respecto de C (*i.e.* 0.54, 0.88 y 0.89 mmol Pro/g MSc; P=0.012). Únicamente C en SGgr fue superior al los resultados reportados por otros autores, mientras que para SL coincidieron con los valores máximos reportados en la bibliografía. Pareciera que la incubación *in vitro* de forraje ensilado fresco aumenta la cantidad de AGVt y produce cambios en la proporción de cada uno de

los ácidos respecto del forraje seco, tal como fuera discutido en la sección 5 del Capítulo 2. de este trabajo.

Según lo descrito por Blümmel y otros (1999) a partir de la producción *in vitro* de AGV es posible estimar la cantidad de gas liberado como CO₂ y CH₄ en forma directa e indirecta (*i.e.* por fermentación o por desplazamiento del sistema buffer). En la Figura 3.7 se observa la distribución del origen del gas producido *in vitro* para los sustratos incubados. Los cambios en el perfil de fermentación de los RI respecto de C habrían promovido un aumento en la proporción del gas indirecto liberado durante la fermentación (CO₂buff), incrementando así las distorsiones al comparar la PGA de las distintas fracciones.

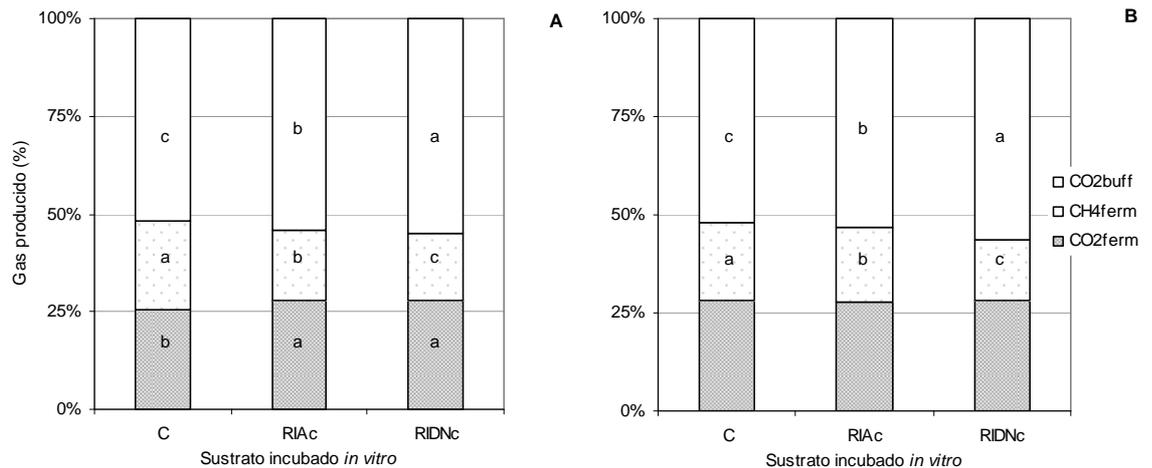


Figura 3.7 Origen del gas producido durante la incubación *in vitro* clasificado en dióxido de carbono directo de la fermentación e indirecto del buffer y metano de la fermentación (CO₂ferm, CO₂buff y CH₄ferm) del sustrato completo y residuos del lavado con agua y detergente neutro (C, RIAc y RIDNc) para ensilajes de gramínea con grano (A) y pasturas base leguminosas (B). Letras diferentes para la misma leyenda en cada gráfico indican diferencias significativas ($\alpha = 0.05$).

3.6. Conclusión

Las contribuciones de los RI a la PGA y MSD no fueron equivalentes y las curvas de substracción solo se pudieron calcular hasta las 24 h. El RIA produjo aproximadamente el 95% de la PGA 72 h del sustrato completo mientras que la MSD solo alcanzó el 55%; en tanto que para el RIDN los valores fueron 70% de la PGA 72 h y 40% de la MSD. Las diferencias fueron explicadas al menos en parte por las diferencias en la proporción de AGV producidos en cada caso. La relación Ac/Pro de C fue 3.9 para SGgr y 7.5 para SL siendo probablemente la FDN soluble la principal responsable de las diferencias citadas; en cambio en el RIA se registró 4.4 y 2.5 en RIDN más cercanos a los de C.

Sin embargo la cantidad de información que aportan los RI fue clara y quedo expuesta en los cuadros de las correlaciones (Cuadro 3.10 y Cuadro 3.11). Las variables Lag, Tmax y TTmax de RIA mostraron una alta correlación con MSD y la tasa de digestión de C, siendo la de TTmax con efecto negativo. Mientras que Lag y Ac/Pro de RIDN también se correlacionaron negativamente con MSD y la tasa de digestión de C. Los parámetros asociados a la velocidad de degradación del ensilaje también mostraron una alta correlación con la MSD y FDND (Tmax, μ 50 y T50). Estos aportes podrían resultar de gran importancia a la hora de predecir la digestión o suministro energético de los ensilajes así como la incorporación de variables de efecto negativo que permitan la corrección de la digestión por reducciones en el tiempo de digestión ruminal.

Capítulo 4.

Estimación del valor energético de los forrajes ensilados evaluados *in vitro*

4.1. Resumen

Las evaluaciones *in vivo* son la referencia para las estimaciones de digestibilidad y concentración energética. Sin embargo, el uso de animales para la evaluación de los alimentos posee desventajas como ser elevados costos, requerimientos de mano de obra, cantidad de alimento, infraestructura y tiempo hasta la obtención del resultado; además de las crecientes preocupaciones acerca del bienestar animal. Para reemplazar las evaluaciones *in vivo* fueron desarrolladas técnicas de laboratorio que permitan caracterizar los alimentos como la química húmeda tradicional y el método *in vitro* de producción de gas. El objetivo fue seleccionar modelos para estimar la digestibilidad de la materia seca y la fibra insoluble en detergente neutro y contenido de energía metabolizable (DMS, DFDN y EM) de forrajes ensilados utilizando la información aportada por química húmeda y la producción de gas *in vitro*. Las fracciones de ${}_a\text{FDN}_{\text{mo}}$, Lig/FDA y almidón fueron fundamentales para el desarrollo de las ecuaciones de predicción pero otras variables derivadas de la PG fueron necesarias para reducir la magnitud en los errores de la predicción. Las tasas de PG y los tiempos en que éstas ocurrieron fueron de mayor utilidad que las PGA (*i.e.* Tmax, $\mu 50$ y T50). La predicción de la DFDN se alcanzó con un error mayor al de las otras ecuaciones; resultó del doble del alcanzado con DMS (*i.e.* RSD 21.3 vs 42.3 g/kg). Además los parámetros de la cinética de PG de los residuos insolubles en agua y detergente neutro (*i.e.* RIA y

RIDN) permitieron mejorar la precisión de la predicción de DMS y EM (*i.e.* RSD 21.3 y 29.4 vs 33.2).

4.2. Introducción

El uso de forrajes ensilados en la Argentina se ha difundido en los últimos cinco a diez años. La superficie destinadas a esta reserva fue algo mayor a 2 veces lo registrado hace 10 años y alcanzó en la campaña 2007/08 a 880.000 ha (Pozzo, 1999; CACF, 2009). Estos hechos ocurrieron dentro del contexto generado por el avance de la agricultura que obligó a intensificar la producción animal. Como resultado de ello la participación de los ensilajes en las dietas de los sistemas de producción de carne y leche en algunos casos alcanzó cerca del 11% y su uso se extendió a todo el año (Bragachini y otros, 2008). Por lo tanto, la evaluación de estos recursos resulta indispensable para que su uso sea eficiente. Cabe destacar que la bibliografía más difundida y utilizada en nuestro país para estimar la digestibilidad y concentración energética de forrajes ensilados no fue desarrollada localmente según lo reportado por los laboratorios participantes en el Programa para el Mejoramiento de la Evaluación de Forrajes y Alimentos del Centro de Investigación y Servicios en Nutrición Animal (CISNA, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires) (Jaurena y Wawrzkievicz, 2009). Las ecuaciones más difundidas en nuestro país resultaron de origen americano (Schmidt y otros, 1976; Russell y otros, 1992; NFTA, 2006). Es decir, que tanto las pasturas como los cultivos anuales hasta aquí mencionados en las citas bibliográficas no son necesariamente los genotipos disponibles en el país, ni tampoco cultivados bajo condiciones ambientales similares a las nuestras. Por otro lado, en algunos casos las ecuaciones desarrolladas requieren de información derivada de varias técnicas analíticas poniendo en duda la rapidez y economía del resultado obtenido.

Todas las técnicas de evaluación de alimentos intentan identificar el grado en que cada alimento contribuye a los requerimientos nutricionales del animal. La

situación ideal sería observar la respuesta productiva obtenida por cada alimento ofrecido a una clase específica de animal (e.g. especie, categoría). Por lo tanto, la respuesta animal que permite lograr es considerada la expresión más completa del valor nutritivo (**VN**) de un alimento. Esta respuesta depende de la digestibilidad del alimento, del consumo alcanzado y de la eficiencia de conversión de los nutrientes consumidos. Por esto, las evaluaciones *in vivo* son imprescindibles como referencia en las estimaciones del VN o de alguna de las variables que lo afectan. Sin embargo, el uso de animales para la evaluación *in vivo* de los alimentos tiene serias desventajas como ser elevados costos, requerimientos de mano de obra, cantidad de alimento, infraestructura y tiempo hasta la obtención del resultado, además de las crecientes preocupaciones acerca del bienestar animal. La digestibilidad de la fibra insoluble en detergente neutro (**DFDN**) de los forrajes fue reportado por Oba y Allen (1999) como el factor más influyente sobre el consumo de materia seca (**CMS**) de vacas lecheras. Cada unidad de aumento en la DFDN provocó un incremento de 0.17 kg MS en el CMS y se reflejó en 0.25 kg/d más de leche. A su vez, la estimación de DFDN mediante análisis de laboratorio *in vitro* resultó un buen predictor del CMS.

Para reemplazar las evaluaciones *in vivo* se han desarrollado técnicas de laboratorio buscando caracterizar los alimentos con el mayor grado de exactitud posible y capacidad de predicción de la respuesta animal. Entre ellas se pueden mencionar la química húmeda tradicional (e.g. total de nutriente digestibles (TND)), Van Soest y otros (1991), el método *in vitro* de dos etapas, la producción de gas, fermentadores continuos, enzimas y espectroscopía de reflectancia del infrarrojo cercano (NIRs). Las ventajas buscadas en estos métodos son rapidez en la obtención del resultado, precisión, repetibilidad y bajo costo ya que la demanda de

estas evaluaciones es en última instancia para aplicación directa en sistemas de producción comerciales.

A los métodos de estimación de la digestibilidad y concentración energética es posible separarlos en dos grupos. Por un lado, se encuentran las que miden en forma directa el residuo de una digestión simulando la digestibilidad *in vivo* ya sea en la instancia final de la digestión o describiendo la cinética de la misma (Tilley y Terry, 1963; Goering y Van Soest, 1970; Ørskov y McDonald, 1979; Fonseca y otros, 1998). Y por otro, aquellas que estiman la digestibilidad o concentración energética mediante ecuaciones que utilizan diversas variables de ingreso como químicas y biológicas *in vitro* (Goering y Van Soest, 1970; McLeod y Minson, 1976; Schmidt y otros, 1976; Minson, 1982; Menke y Steingass, 1988). Las técnicas biológicas *in vitro* de punto final de Tilley y Terry (1963) y de Goering y Van Soest (1970) fueron ampliamente difundidas y aceptadas para la estimación de la digestibilidad aparente y potencial de los alimentos.

No todas las ecuaciones de predicción de la digestibilidad fueron desarrolladas tomando como referencia experimentos *in vivo*. Ello se debe a la alta correspondencia entre $DMS_{in vivo}$ y las determinaciones *in vitro* para un gran número de alimentos ganando así rapidez, facilidad y menor costo. Aunque debe mencionarse como desventaja de este procedimiento que puede ocurrir sobre o subestimación de la digestibilidad de alguna/s fracción/es del alimento respecto a lo sucedido en el animal (Stern y otros, 1997). Fue mencionado como factor responsable de estas diferencias el cambio en tipo y cantidad de los microorganismos viables presentes en el licor ruminal usado como inóculo de la digestión.

Diversos autores desarrollaron ecuaciones para forrajes frescos y henificados y alimentos concentrados que han logrado predecir o explicar con bastante aproximación el VN (Minson y McLeod, 1972; De Boever y otros, 1986; Moss y otros, 1992; Sniffen y otros, 1992; Moss y Givens, 1994; Weiss, 1994; Blümmel y Becker, 1997; Weiss, 1998; Chenost y otros, 2001). En el caso de los forrajes ensilados las dificultades reportadas fueron mayores debido a la complejidad de su composición (Marten y otros, 1975; Dewhurst y otros, 1986; Givens y otros, 1995). La presencia de almidón en ensilajes de maíz y sorgo resulta un sustrato alternativo de mayor facilidad de degradación que la pared celular. En algunos casos la digestibilidad *in vitro* de ésta última puede ser subestimada a causa de la reducción de la población de bacterias celulolíticas viables del inóculo (Stern y otros, 1997). Por otro lado la presencia de sustancias volátiles como los AGV y el amoníaco que se pierden durante el secado en estufa reducen la proporción de sustancias digestibles contenidas en el alimento evaluado (Minson y Lancaster, 1963; Brown y Radcliffe, 1971). Las limitaciones expuestas permiten explicar por que los métodos químicos e *in vitro* hasta el momento no permitieron obtener resultados satisfactorios en todos los casos (Menke y otros, 1979; Jones y otros, 1980; Ferret y otros, 1997). Brown y Radcliffe (1971) reportan una importante mejora en la predicción de la digestibilidad de la materia seca y la energía de ensilajes de pastura al corregir por el contenido de materia seca de estufa con los compuestos volátiles.

Es reconocida desde hace tiempo la asociación que existe entre la fermentación ruminal y la producción de gas (**PG**) por ella provocada. Recientemente Theodorou (1993) publicó un procedimiento sencillo y rápido para medir la PG y que fue considerado como un posible método de rutina en la evaluación de alimentos para rumiantes. Los microorganismos incubados *in vitro*

fermentan el alimento produciendo ácidos grasos volátiles (**AGV**), gases (dióxido de carbono (CO₂) y metano (CH₄) y masa microbiana. Se mide la cantidad de gas liberado durante el período de incubación; la metodología se basa en la relación que existe entre el sustrato desaparecido y el volumen total de gas producido.

Menke y Steingass (1988) para lograr una mejor estimación del valor energético de los alimentos utilizando la técnica de PG, los agruparon con diferentes ecuaciones para cada uno. No obstante hallaron especiales dificultades en la valoración de alimentos voluminosos y ensilajes. Estas dificultades podrían atribuirse a lo señalado por Chamberlain y Choung (1995) respecto a que el volumen de gas producido con estos métodos resulta de un complejo equilibrio entre el CO₂ y el CH₄ (contribución directa) y la acción de los AGV sobre el bicarbonato del licor ruminal y el buffer que produce una liberación neta de CO₂ (contribución indirecta). A pesar que la PG ha mostrado una aceptable capacidad predictiva de la digestibilidad y del consumo para algunos alimentos (Menke y otros, 1979; Blümmel y Becker, 1997), parte de las inexactitudes encontradas con materiales ensilados podrían ser explicadas por cambios en proporción de gas directo e indirecto.

El objetivo del presente estudio fue desarrollar modelos para estimar la digestibilidad de la materia seca y la fibra insoluble en detergente neutro y contenido de energía metabolizable (DMS, DFDN y EM) de forrajes ensilados utilizando la información aportada por química húmeda y la producción de gas *in vitro* ajustadas a los resultados obtenidos *in vivo* con ovinos.

4.3. Materiales y Métodos

4.3.1. Forraje ensilado

Se utilizaron los forrajes ensilados descritos en la sección 2.3.1 del Capítulo 2. (*i.e.* 11 de gramíneas con presencia de grano y 7 de pasturas a base de alfalfa, **SGgr** y **SL**, respectivamente) siendo un total de 18 unidades experimentales (**UE**). Los bolsones de plastillera de 1 m³ pesaron entre 400 y 500 kg en húmedo y fueron transportados hasta la Facultad de Agronomía de la UBA - CABA donde fueron descargados y almacenados apropiadamente hasta su uso (ubicados a la intemperie sobre plataformas de madera, rotulados y tapados con manta de polietileno bicapa).

Los ensilajes fueron muestreados antes del experimento de digestibilidad *in vivo* para estimar el contenido energético mediante la composición química y ecuaciones propuestas por Schmidt y otros (1976). La descripción de las fracciones analíticas permitió la formulación de las dietas del experimento *in vivo*.

4.3.2. Experiencia *in vivo*

La digestibilidad *in vivo* se midió según el método descrito por Schneider y Flatt (1975) y Rymer (2000). La experiencia llevada a cabo permitió calcular la digestibilidad aparente y potencial de los ensilajes, dado que el nivel de consumo de los animales fue estipulado a mantenimiento. Las 18 UE fueron agrupadas aleatoriamente en dos grupos de 5 y otros dos de 4. Los grupos de ensilajes de 5 y 4 UE fueron implementados para no exceder el tiempo de ensayo. La permanencia de los animales en las jaulas metabólicas por períodos superiores a 90 días aumenta la incidencia de daños podales que pueden modificar el comportamiento de los mismos. Por lo tanto se llevaron a cabo dos CL simultáneos de 5x5 en el

otoño del 2003 y otros dos de 4x4 también simultáneos en la primavera del mismo año.

La oferta de ensilaje fue determinada para cada animal en función de su peso vivo al comienzo de cada período del trabajo experimental. Cada ensilaje fue evaluado durante 5 días consecutivos luego de 9 días de acostumbramiento a la dieta. Se utilizaron 5 jaulas metabólicas para dos animales cada con dispositivos de separación para las excretas líquidas y sólidas. El acceso al agua de bebida fue permanente. La ración de los animales se suministró dos veces al día a las 8:00 y 20:00 horas. Previo al suministro matutino se recolectó el rechazo y las excretas, dejando así las jaulas limpias para el comienzo del día siguiente.

Los animales experimentales fueron 10 capones de raza Romney Marsh de edad y peso homogéneo (*i.e.* 3 años y 42.6 ± 2.3 kg PV) con control de parásitos previo al experimento. En el experimento del año 2004 fueron elegidos al azar 8 de los 10 animales. Los requerimientos de mantenimiento fueron estimados según las recomendaciones del (NRC, 1985) asumiendo una actividad voluntaria de 5% y una ganancia de peso de 50 g/d como margen de seguridad. Las dietas se formularon con un contenido de 120 g PB/kg MS balanceado mediante el agregado de urea. Todos los animales fueron suplementados con un núcleo mineral para ovinos a razón de 25 g/an.d según la recomendación del fabricante.

Diariamente se midieron los rechazos y las excretas sólidas. Los rechazos fueron íntegramente reservados para su caracterización analítica, mientras que de las heces se reservó una alícuota del 10% del total; en ambos casos las muestras de los 5 días de medición dieron origen a una muestra compuesta por período. La muestra del forraje ofrecido se tomó durante la confección de las raciones de ensilaje al comienzo de cada período de medición. La digestibilidad aparente de la

materia seca, materia orgánica, energía y de las fibras insolubles en detergente neutro y ácido así como de la Hemicelulosa y celulosa (**DMS**, **DMO**, **DE**, **DFDN**, **DFDA**, **DHemi** y **DCel**) fue calculada según sigue,

$$\text{Digestibilidad}(g / kg) = \frac{(\text{Ofrecido} - \text{Rechazado})(g) - (\text{Heces})(g)}{(\text{Ofrecido} - \text{Rechazado})(g)} \times 1000$$

El contenido energético de los ensilajes calculado con los resultados del experimento fue la energía digestible (**ED**, Mcal/kg MS). Sin embargo, se estimó el contenido de energía metabolizable (**EM**, Mcal/kg MS) asumiendo que las pérdidas de energía en orina y gases alcanzan el 18% de la ED según lo estimado por Yan y Agnew (2004a) en ovinos alimentados a nivel de mantenimiento con ensilajes de pastura.

4.3.3. Producción de gas *in vitro*

Se utilizaron los resultados descritos en el Capítulo 3. para los sustratos C, RIA y RIDN como variables independientes en las estimaciones de digestibilidad y concentración energética.

4.3.4. Análisis de laboratorio

Se analizaron las muestras de forraje ensilado y rechazo según lo descrito en el Capítulo 3. . Las heces fueron secadas en estufa a 65°C (Aerts y otros, 1974), molidas y luego caracterizadas en sus fracciones analíticas de cenizas (AOAC, 1990; Nro. 942.05), proteína bruta (PB = Ntotal x 6,25; AOAC, 1990; Nro. 984.13) y fibra insoluble en detergente neutro (${}_a\text{FDN}_{\text{mo}}$) y ácido (FDA_{mo}) y la lignina en detergente ácido con ácido sulfúrico (Lig_{as}) y se informaron libres de cenizas (Van Soest y otros, 1991).

La determinación de energía bruta (**EB**) en los ensilajes, rechazos y heces se efectuó siguiendo las recomendaciones de (Porter y otros, 1984) con un equipo Shimatzu® modelo P-202 (Calorimetric calculator) calibrado con patrón de ácido benzoico a 25°C.

Se determinaron ácidos grasos volátiles (AGV) a los forrajes ensilados y a los residuos de la incubación *in vitro* por cromatografía gaseosa. Fueron identificados los ácidos acético, propiónico y butírico (Mezcla de ácidos grasos soluble en agua Matreya® - Ac, Pro y But, respectivamente). Se utilizó un equipo Konik-3000® con inyección manual, detector FID (10 y 1 ml/min de aire e hidrógeno, respectivamente) y una columna semi-capilar BP-20 (marca SGE®) con nitrógeno como carrier (10 ml N₂/min) y según protocolo recomendado por el fabricante de la columna. La purificación de las muestras para AGV se realizó con ácido sulfúrico (25 % en ácido sulfúrico 0.5M) a razón de 0.5 ml por cada 2 ml de muestra y luego centrifugadas por 10 minutos a 6000 x g (Friggens y otros, 1998).

4.3.5. Análisis estadístico

Los experimentos de digestibilidad *in vivo* se llevaron a cabo siguiendo un diseño en cuadrado latino (**CL**). Los resultados de los experimentos de digestibilidad fueron analizados según un modelo de cuadrados latinos con las UE anidadas dentro de de los mismos, según

$$Y_{ijk} = \mu + CL_i + Per(CL)_j + An(CL)_k + Silaje(CL)_l + \varepsilon_{ijkl}$$

donde, Y es la variable en estudio, μ es la media general, CL, cuadrado latino; Per(CL) efecto del período dentro de CL; An(CL) efecto del animal dentro de CL; Silaje, es el efecto del forraje ensilado en estudio y ε es el error experimental.

La predicción de la digestibilidad y concentración energética de los forrajes ensilados (n=18 UE) se planteó bajo la forma genérica de un modelo de regresión múltiple, según

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 X_{1i} + \beta_2 X_{2i} + \dots + \beta_{p-1} X_{(p-1)i} + \varepsilon_i$$

donde, y_i fueron DMS, DFDN y EM; β_i parámetros de la regresión y x_i variables independientes (**VI**) propuestas en el modelo completo. Las VI disponibles fueron agrupadas para no superar n-1 y así se obtuvieron varios modelos para efectuar la selección. Las VI pudieron ser clasificadas en aquellas derivadas de las fracciones analíticas (*i.e.* ${}_a\text{FDN}_{\text{mo}}$, FDA_{mo} , Hemi, Cel, LDA_{as} y $\text{LDA}_{\text{as}}/\text{FDA}_{\text{mo}}$) y PG *in vitro* de los ensilajes completos por un lado, y de los RIA y RIDN por otro (*i.e.* parámetros de France y otros (1993), Tmax, TTmax y AGV). Todas las VI de cada grupo fueron sometidas a un análisis de colinearidad antes de la selección final del modelo. Los modelos fueron seleccionados usando como criterios el mínimo C(p) de Mallow y cuadrado medio residual y el más elevado coeficiente de determinación (R^2_{Aj}) ajustado por los grados de libertad. Se utilizaron $\alpha=0.05$, 0.10 y 0.15 como criterio de inclusión y exclusión de variables (**CIEV**) durante la selección de los modelos. Sin embargo, otros criterios funcionales como la facilidad de obtención de la VI, el costo y el tiempo que demanda completar el set de datos no fueron perdidos de vista.

4.4. Resultados

En las secciones de resultados de los Capítulo 2. y Capítulo 3. se comentó la variabilidad alcanzada por las 18 UE evaluadas. En el Cuadro 4.1 se muestran los resultados de los análisis practicados a las muestras tomadas durante la evaluación *in vivo*. Los resultados obtenidos tuvieron una fuerte correspondencia con los citados en el Cuadro 2.1, indicando que los forrajes ensilados no sufrieron transformaciones de importancia durante el período transcurrido entre los dos experimentos. La relación lineal entre el contenido de ${}_a\text{FDN}_{\text{mo}}$, FDA_{mo} , y LDA_{as} de las muestras usadas en los experimentos *in vitro* e *in vivo* presentó $\beta_0=0$ y $\beta_1=1$ ($P<0.05$), determinando la relación 1:1 entre los valores señalados. De este modo fue posible afirmar que los resultados de la producción de gas *in vitro* descrita en el Capítulo 3. se corresponden con los obtenidos en el experimento *in vivo*. Por esto el procedimiento de selección de modelos de predicción a partir de variables derivadas de la PG *in vitro* fue posible.

La digestibilidad de las fracciones de SGgr fueron en todos los casos mayores a las de SL, coincidente con los menores contenidos de PC y además con menor nivel de lignificación (*i.e.* 470 y 535 g ${}_a\text{FDN}_{\text{mo}}$ /kg MS y 0.12 y 0,22 Lig/FDA para SGgr y SL, respectivamente; Cuadro 4.1). Las DMS, DMO y DHemi fueron 30% mayores, mientras que DFDN y DFDA solo 16 y 10% y la DCel con la mínima diferencia de 5% entre SGgr y SL. La menor diferencia observada en la DFDA entre SGgr y SL a pesar del mayor grado de lignificación de la PC de SL podría estar explicada por la baja tasa de pasaje de los alimentos en el tracto digestivo de los animales provocada por el nivel de consumo a mantenimiento. Como consecuencia de esto un mayor tiempo medio de retención en rumen habría prolongado el tiempo

de acción de los microorganismos, permitiendo alcanzar mayores niveles de digestión y reduciendo las diferencias entre forrajes.

Cuadro 4.1 Composición química de los forrajes ensilados utilizados en el experimento *in vivo* (g/kg MS, excepto la materia seca, g/kg MH).

	Fracciones analíticas ¹					
	MS	Cen	aFDN _{mo}	FDA _{mo}	Lig _{as}	Lig/FDA
Forrajes ensilados de gramíneas con grano (n = 11)						
Media	370	68	470	242	29	0.12
Máximo	428	101	683	399	64	0.18
Mínimo	299	50	356	172	14	0.06
DE ²	44.9	18.0	88.9	65.1	16.9	0.035
CV ³	12	26	19	27	58	31
Forrajes ensilados de pastura consociada base alfalfa (n = 7)						
Media	294	120	535	346	78	0.22
Máximo	394	195	621	408	104	0.26
Mínimo	229	83	424	312	53	0.17
DE ²	55.9	35.4	61.9	34.1	19.0	0.040
CV ³	19	30	12	10	24	18

¹ MS: materia seca; Cen: cenizas; aFDN_{mo}: fibra insoluble en detergente neutro libre de cenizas y con alfa-amilasa; FDA_{mo}: fibra insoluble en detergente ácido; Lig_{as}: lignina en detergente ácido con ácido sulfúrico.
² DE = desvío estándar de la media. ³ CV = coeficiente de variación (%).

La variabilidad observada en la composición química de los ensilajes, especialmente en el contenido de las distintas fracciones de la PC no fue detectada en la misma magnitud al analizar la digestibilidad (*i.e.* CV de 10 a 30% en contenido de fracciones analíticas y 6 a 11% en digestibilidad de todas las fracciones, excepto en DHemi que osciló entre 16 y 24%; Cuadro 4.2). La DMS promedio de SGgr fue 654 g/kg MS y 508 para SL con una diferencia entre los valores extremos de 160 y 100 g/kg MS. Los valores de DMO fueron en promedio 45 g/kg superiores a los de DMS y la variabilidad entre los ensilajes tuvo un comportamiento similar a ésta última. La mayor diferencia entre SGgr y SL y en variación dentro de cada grupo se registró para DHemi; aunque para SL el CV fue superior (*i.e.* 16 vs 24%). Sin embargo el intervalo comprendido entre los valores extremos fue similar (*i.e.* 370 y 320 g/kg).

Cuadro 4.2 Digestibilidad *in vivo* de la materia seca y orgánica, fibra insoluble en detergente neutro y ácido, hemicelulosa y celulosa (DMS, DMO, DFDN, DFDA, DHemi y D Cel; g/kg MS)

	DMS	DMO	DFDN	DFDA	DHemi	D Cel
Forrajes ensilados de gramíneas con grano (n = 11)						
Media	654	695	577	577	564	615
Máximo	741	773	648	650	697	687
Mínimo	581	617	455	466	444	533
DE ¹	48.2	44.6	58.5	64.8	90.2	55.9
CV ²	7	6	10	11	16	9
Forrajes ensilados de pastura consociada base alfalfa (n = 7)						
Media	508	559	498	526	435	586
Máximo	546	586	554	588	542	629
Mínimo	449	508	443	460	223	485
DE ¹	37.1	32.7	39.8	40.8	105.2	50.5
CV ²	7	6	8	8	24	9

¹ DE = desvío estándar de la media. ² CV = coeficiente de variación (%).

El aumento de la concentración de Lig_{as} en los ensilajes estuvo asociado al incremento de ${}_a\text{FDN}_{\text{mo}}$ y FDA_{mo} . Sin embargo, el aumento fue mas que proporcional alcanzando valores 3 veces superiores en SL que el SGgr para las relaciones Lig/FDN y 2 veces para Lig/FDA, que indican el nivel de lignificación de la PC (*i.e.* Lig/FDN SGgr 0.06 ± 0.024 y 40% CV, SL 0.15 ± 0.036 , 24% CV; $P < 0.0001$). El aumento de Lig/FDN provocó una reducción en la digestibilidad de la PC. Siendo la DHemi la más afectada que se correlacionó negativamente con el grado de lignificación de la PC (*i.e.* $y = -1496 * \text{Lig}/\text{FDN} + 655$, $R^2 = 0.468$, $P < 0.0001$ y $n = 18$; Figura 4.1). En tanto, la D Cel no presentó una correlación estadísticamente significativa con Lig_{as}, Lig/FDA o Lig/FDA ($P > 0.05$). Pero considerando que la PC resulta un sustrato alternativo al Alm para la fermentación en rumen, se detectó que por sobre 100 g Alm/kg MS la D Cel resultó afectada negativamente ($P < 0.001$; Figura 4.2). En este caso solo un ensilaje de los SGgr resultó eliminado del grupo, siendo éste el de avena granada que en la sección 3.4. del Capítulo 3. fue

mencionado como de bajo contenido de Alm, posiblemente a causa de la pérdida de grano durante el proceso de ensilado.

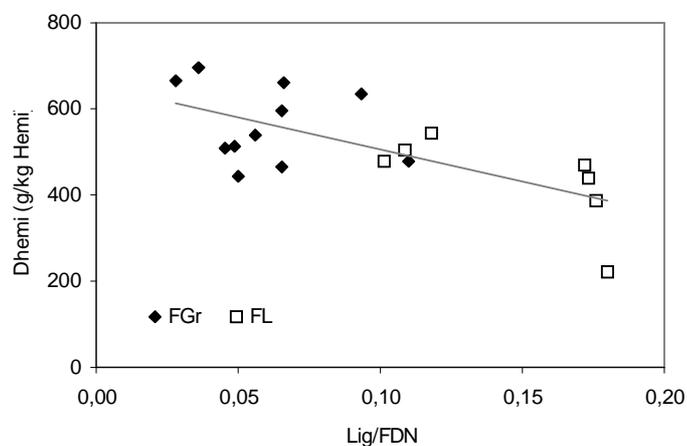


Figura 4.1 Relación entre el nivel de lignificación de la fibra insoluble en detergente neutro (Lig/FDN) y la digestibilidad de la hemicelulosa *in vitro* (DHemi; g/kg Hemi) en forrajes ensilados de gramíneas con grano (♦) y pasturas base leguminosas (□).

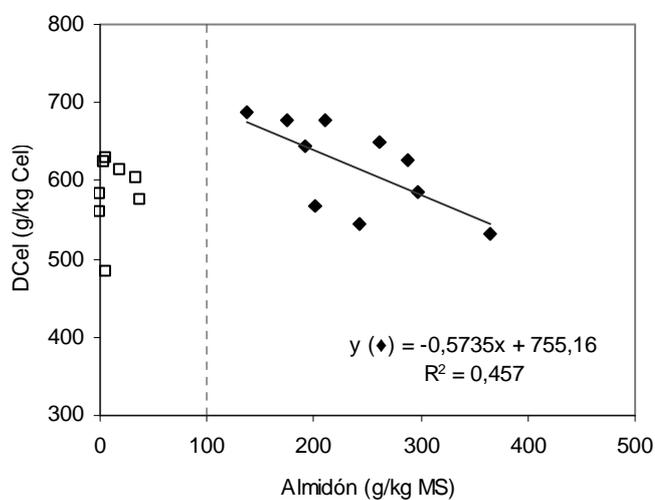


Figura 4.2 Relación entre la digestibilidad de la celulosa *in vivo* (DCel; g/kg Cel) y el contenido de almidón de los ensilajes con más (♦; n=10) y menos (□; n=8) de 100 g/kg MS.

Para el desarrollo de los modelos de predicción fue necesario disponer de un grupo de valores que brindaran un amplio rango sobre la variable respuesta (e.g. DMS, DFDN ó EM). Como ya fue mencionado los SGgr y SL dentro de cada grupo

no mostraron una gran variabilidad. Sin embargo, si los grupos de forrajes no eran separados fue posible trabajar en un amplio rango sobre las variables respuesta (*i.e.* DMS en SGgr 741-581 y SL 546-449 g/kg MS; grupo completo 741-449 g/kg MS – n=18 UE).

La Denerg y la ED mostraron un comportamiento similar a lo ya comentado para DMS (Cuadro 4.3). Los SGgr fueron 24 y 21% superiores a los SL. También fue observada baja variabilidad en los resultados. Como se esperaba, la DMS y DMO mostraron una relación lineal y positiva con la Denerg (*i.e.* $DE=0.9 \cdot DMS+101$, $R^2=0.976$ y $P<0.0001$; $DE=1.0 \cdot DMO+18$, $R^2=0.964$ y $P<0.0001$) resultando $\beta_1=1$ en ambos casos ($P<0.05$; Figura 4.3). Sin embargo, en el caso de la DMS $\beta_0 \neq 0$, marcando una ordenada al origen de 101 g/kg, mientras que para DMO fue igual a cero. La diferencia correspondió a la fracción de cenizas totales contenida en la MS que no aporta energía. (*i.e.* promedio Cen 94 g/kg MS; Cuadro 4.1).

Cuadro 4.3 Digestibilidad de la energía *in vivo* y concentración de energía digestible y metabolizable (Denerg, kcal/Mcal; ED y EM; Mcal/kg MS).

	Denerg	ED	EM
Forrajes ensilados de gramíneas con grano (n = 11)			
Media	688	3.14	2.57
Máximo	777	3.67	3.01
Mínimo	607	2.71	2.22
DE ¹	45.9	0.266	0.219
CV ²	7	8	9
Forraje ensilado de pastura consociada base alfalfa (n = 7)			
Media	556	2.60	2.13
Máximo	607	3.01	2.47
Mínimo	515	2.13	1.75
DE ¹	33.6	0.288	0.235
CV ²	6	11	11

¹ DE = desvío estándar de la media. ² CV = coeficiente de variación (%).

La EB de los ensilajes y las heces fue similar explicando, al menos en parte, la correspondencia entre DE y DMO en la experiencia *in vivo*. Sin embargo, los ensilajes tuvieron un promedio de 4.58 ± 0.2 y la heces 4.14 ± 0.2 Mcal EB/kg MS que aunque no alcanzó a marcar diferencias estadísticamente significativas indicaron una tendencia ($P < 0.10$). Es posible que la adecuada determinación de la EB de los ensilajes a cambio de la aplicación de un valor constante usado de rutina, permita un mejor ajuste en las ecuaciones de predicción seleccionadas.

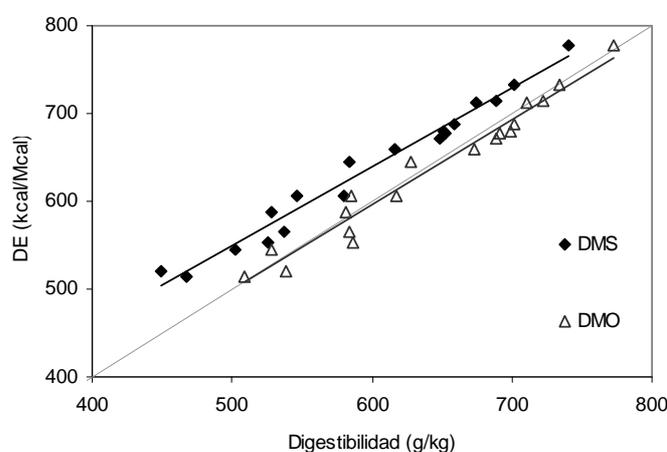


Figura 4.3 Relación entre la digestibilidad *in vivo* de la materia seca y orgánica (◆, DMS y △, DMO; g/kg) con la digestibilidad de la energía (DE; kcal/Mcal).

En muchos casos se utiliza la recuperación de los residuos de incubación *in vitro* que permite calcular las desapariciones de sustrato como estimadores de la digestibilidad de las mismas fracciones *in vivo*. En la Figura 4.4 se observa que la MSD *in vitro* sobreestima la DMS *in vivo* cerca de 160 y 104 g/kg con sustrato fresco y seco, respectivamente (*i.e.* test $H_0: \beta_1=1, P > 0.05$ y $H_0: \beta_0=0, P < 0.005$). En cambio, la FDND *in vitro* no presentó adecuada capacidad predictiva debido a la variabilidad en los resultados obtenidos (*i.e.* $R^2=0.138$ y 0.213 con sustrato fresco y seco). Tanto SL como SGgr mostraron una importante dispersión en los resultados. Sin embargo, la FDND con sustrato seco evidenció una subestimación de la DFDN *in vivo* para los ensilajes de mayor digestibilidad de la pared celular (*i.e.* $DFDN >$

500 g/kg FDN) en coincidencia con los resultados discutidos en el Capítulo 2. Por otro lado, la EM tuvo un buen ajuste con la MSD según EM ($\text{Mcal/kg MS} = 0.727 + 0.0024 * \text{MSD (g/kg MS)}$) ($R^2=0.606$ y $P=0.0001$; Figura 4.5). Es decir que la MSD *in vitro* pareciera ser un apropiado estimador de la DMS y la EM de los forrajes ensilados estudiados en el presente trabajo.

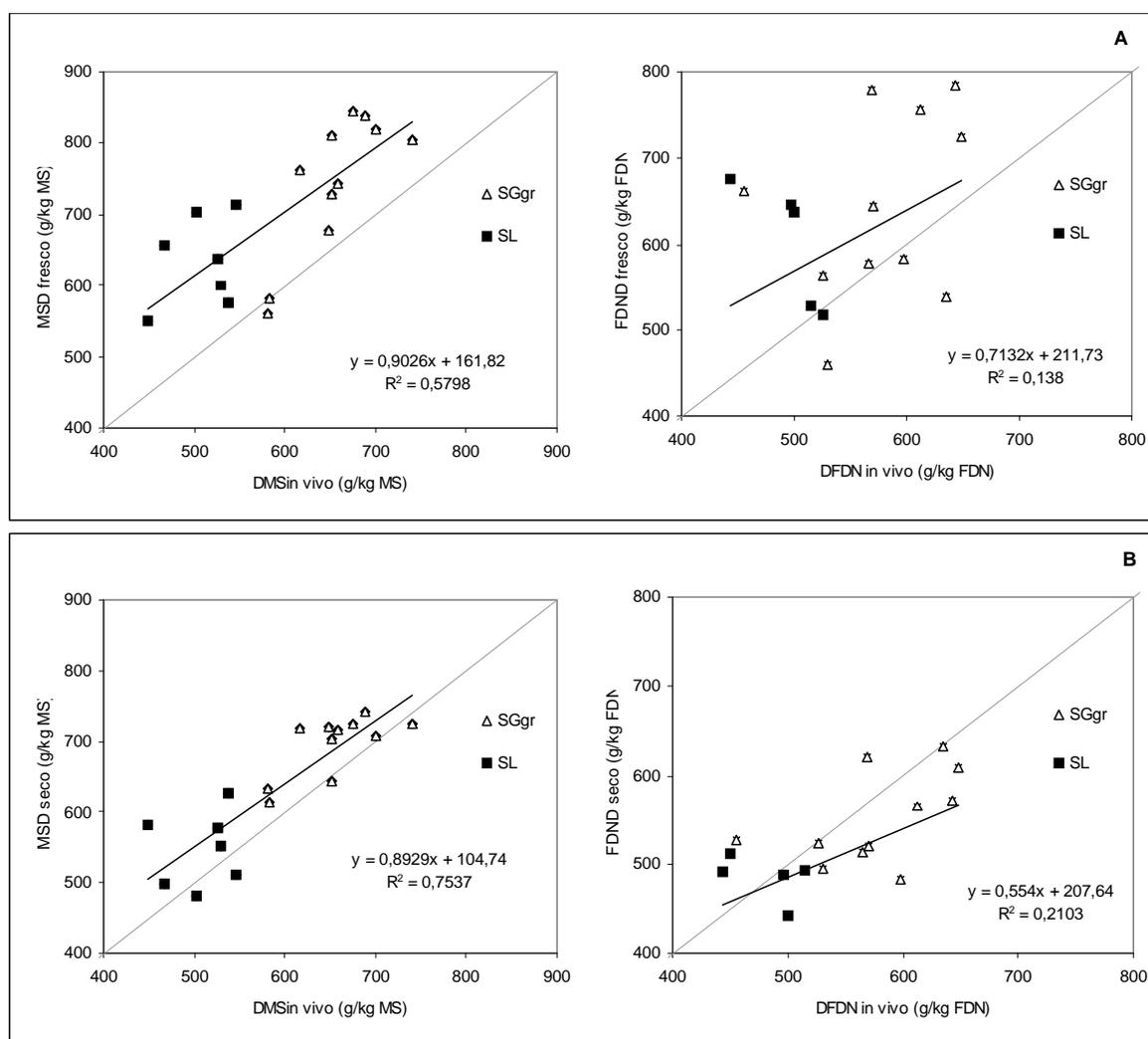


Figura 4.4 Relación entre la digestibilidad *in vivo* y la desaparición *in vitro* de la materia seca y la fibra insoluble en detergente neutro con sustrato incubado en seco y fresco (DMS y DFDN *in vivo*; **A**, sustrato fresco MSD y DFDN *fresco*; **B**, sustrato seco MSD y DFDN *seco*) de forrajes ensilados de gramíneas con grano (Δ) y pasturas en base leguminosas (\blacksquare).

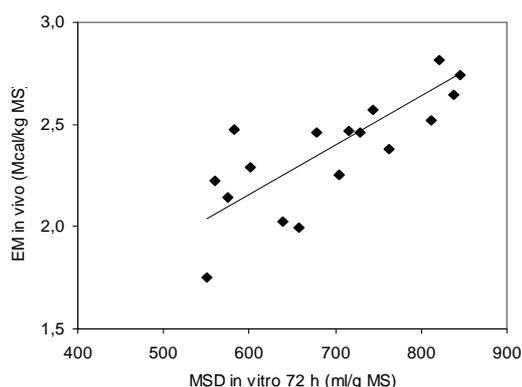


Figura 4.5 Relación entre la desaparición de materia seca *in vitro* a 72 h de incubación ($MSD_{in vitro}$; ml/g MS) y la energía metabolizable *in vivo* ($EM_{in vivo}$; Mcal/kg MS) para forrajes ensilados.

En el Cuadro 4.4 se detallan los Modelos 1 a 4 propuestos que incluyen como VI las fracciones analíticas de la PC y Alm (Modelo 1) y las derivadas de la PG de los forrajes ensilados C (Modelos 2, 3 y 4) para la estimación de la DMS, DFDN y EM. El número de VI derivadas de la PG fue superior al número de observaciones ($n=18$) y por eso se separaron en tres grupos que dieron origen los Modelos 2, 3 y 4. En este caso se tuvieron en cuenta las variables que habían presentado coeficientes de correlación significativos ($P<0.05$) que fueron comentados en la sección 3.4. del Capítulo 3. (Cuadro 3.10 y Cuadro 3.11). Como ya fue mencionado, en la selección de modelos se trabajó con un único grupo de ensilajes donde se incluyeron las 18 UE evaluadas. Esto permitió extender el rango de aplicación sobre las variables respuesta y obtener así mejor precisión en la estimación de los parámetros del modelo. Cuando fueron detectadas VI que presentaban colinealidad fue eliminada aquella que mayor error tenía en la estimación del parámetro.

Cuadro 4.4 Análisis de colinearidad de las variables propuestas para estimar la DMS, DFDN y EM *in vivo* (g/kg MS, g/kg FDN y Mcal/kg MS) de forrajes ensilados de planta entera de maíz y pastura base leguminosas, a partir de variables derivadas de la composición química (Modelo 1) o de la producción de gas *in vitro* del forraje completo (Modelo 2, 3 y 4).

Variables independientes	Estimación de DMS, DFDN y EM (n=18) ¹			
	Modelo 1	Modelo 2	Modelo 3	Modelo 4
Propuestas	PB; $aFDN_{mo}$; FDA_{mo} ; Hemi; Cel; LDA; Lig/FDA y Alm	A; Lag; T50; $\mu 50$; PG6,12, 24 y 48; Tmax y TTmax	T6, 8, 12, 23, 45 y 66; Tmax y TTmax	A; Lag; T50; $\mu 50$; Tmax; TTmax; Ac/Pro y AGV_{Total}
Eliminadas por colinearidad	Hemi y Cel	A; PG6, 12, 24 y 48	T6, 8, 12, 23, 45, y 66	A
Seleccionadas	PB; $aFDN_{mo}$; FDA_{mo} ; Lig, Lig/FDA y Alm ²	Lag; T50; $\mu 50$; Tmax y TTmax	Tmax y TTmax	Lag; T50; $\mu 50$; Tmax; TTmax; Ac/Pro y AGV_{Total}

¹ DMS, digestibilidad de la materia seca; DFDN, digestibilidad de la fibra insoluble en detergente neutro; EM, energía metabolizable.
² $aFDN_{mo}$ y FDA_{mo} mostraron indicios de colinearidad una vez retiradas Hemi y Cel, por lo tanto se evitó incluir ambas en el modelo seleccionado.

La Hemi y Cel resultaron colineales con $aFDN_{mo}$ y FDA_{mo} y fueron eliminadas de las VI a seleccionar. Por otro lado las PG acumuladas y las tasas horarias junto a la PG potencial estimada, A, también fueron colineales con los parámetros derivados del modelo de ajuste y no fueron incluidas entre las VI a seleccionar. Es decir que la descripción de la cinética de PG mediante la aplicación del modelo de France y otros (1993) en adición a Tmax y TTmax aportaron una información equivalente a las PGA y tasas horarias. Por otro lado, en el Modelo 4 la relación Ac/Pro no presentó colinearidad con ninguna de las VI propuestas. Mientras que A resultó colinear a AGV_{Total} y fue descartada.

Las variables derivadas de la PG de los sustratos RIA y RIDN también fueron usadas como VI en la selección de los Modelos 5 y 6 y 7 y 8, respectivamente (Cuadro 4.5). Los criterios aplicados para la agrupación de las VI en 2 modelos para RIA y RIDN fueron los mismos que los mencionados para el

sustrato C. Los coeficientes de correlación tenidos en cuenta fueron los presentados en Cuadro 3.10 y Cuadro 3.11. En ambos casos fueron eliminadas las concentraciones de Ac, Pro y But por resultar colindares con Ac/Pro y AGV_{Total}. Los parámetros derivados de la PG de RIA en el Modelo 6 solo $\mu 50$ y Tmax aportaron información pura, mientras que fueron eliminados A, Lag, T50, T95, $\mu 95$ y TTmax por colinearidad. Por otro lado en el Modelo correspondiente al RIDN las descartadas fueron T95 y $\mu 95$ (Modelo 8; Cuadro 4.5).

Cuadro 4.5 Análisis de colinearidad de las variables propuestas para estimar la DMS, DFDN y EM *in vivo* (g/kg MS, g/kg FDN y Mcal/kg MS) de forrajes ensilados de gramínea con grano y pastura base leguminosas a partir de variables derivadas de la producción de gas *in vitro* del residuo insoluble en agua (Modelo 5 y 6) y en detergente neutro (Modelo 7 y 8).

Variables independientes	Estimación de DMS, DFDN y EM (n=18) ¹			
	RIA		RIDN	
	Modelo 5	Modelo 6	Modelo 7	Modelo 8
Propuestas	Lag; Tmax; TTmax; Ac; Pro; But; Ac/Pro y AGV _{Total}	A; Lag; T50; T95; $\mu 50$; $\mu 95$; Tmax y TTmax	Lag; Tmax; TTmax; Ac; Pro; But; Ac/Pro y AGV _{Total}	A; Lag; T50; $\mu 50$; Tmax y Ttmax
Eliminadas por colinearidad	Ac; Pro y But	A; Lag; T50; T95; $\mu 95$ y TTmax	Ac; Pro y But	T95 y $\mu 95$
Seleccionadas	Lag; Tmax; TTmax; Ac/Pro y AGV _{Total}	$\mu 50$ y Tmax	Lag; Tmax; TTmax; Ac/Pro y AGV _{Total}	A; Lag; T50; $\mu 50$; Tmax y Ttmax

¹ DMS, digestibilidad de la materia seca; DFDN, digestibilidad de la fibra insoluble en detergente neutro; EM, energía metabolizable.

Una vez que el listado de las VI propuestas fue analizado por colinearidad, la cantidad de variables remanentes permitió reducir el número de modelos a probar. En el caso de las fracciones analíticas el único modelo propuesto fue el 1 y los resultados de la selección se muestran en el Cuadro 4.6. Sin embargo, de las VI incluidas para la selección en Modelos 2, 3 y 4 se observó que 2 y 3 estaban

incluidos en 4. Entonces el Modelo 4 fue el utilizado para la selección de modelos con variables derivadas de la PG del sustrato C (Cuadro 4.7). En cambio para los modelos propuestos a partir de las PG de RIA y RIDN, se adicionaron las VI seleccionadas (*i.e.* Modelo 5 + 6 y Modelo 7 + 8) y se testeó nuevamente la existencia de colinearidad entre ellas sin encontrar resultados positivos. Los modelos seleccionados con VI de RIA se detallan en el Cuadro 4.8 y para RIDN en el Cuadro 4.9.

La Lig/FDA fue la VI incorporada en el Modelo 1 seleccionado con un alto grado de ajuste para la predicción de la DMS (*i.e.* R^2_{Aj} 0.85, RMSE=33.2 y $P<0.0001$; Cuadro 4.6). Sin embargo para la DFDN y EM la capacidad de predicción fue menor (*i.e.* R^2_{Aj} 0.57, RMSE=42.3 y $P<0.0001$) aunque el modelo fue estadísticamente significativo. En cualquiera de los casos el parámetro del modelo para Lig/FDA fue estimado con un $P<0.05$ (*i.e.* CIEV $\alpha=0.05$).

La concentración de Alm en los ensilajes fue incluida en el modelo para la estimación de la DMS cuando el CIEV fue $\alpha=0.15$. Por lo tanto, el parámetro correspondiente del modelo fue estimado con baja precisión (*i.e.* 0.18; EEM=0.108; $P=0.1134$) y sin aportar información suficiente como para incrementar el nivel de ajuste del modelo completo (R^2_{Aj} 0.85 vs. 0.86). Hasta aquí podrían mencionarse las ecuaciones,

$$\text{DMS (g/kg MS)} = 770 - 1149 * (\text{Lig/FDA}) \quad (\text{Ec. 1})$$

$$\text{DFDN (g/kg FDN)} = 547 + 0.23 * \text{aFDN}_{\text{mo}} \text{ (g/kg MS)} - 811 * (\text{Lig/FDA}) \quad (\text{Ec. 2})$$

como las más promisorias para la estimación del valor nutritivo de los forrajes ensilados a partir de la composición química.

Cuadro 4.6 Resultados de la selección de modelos para estimar la DMS, DFDN y EM (g/kg MS ó FDN; Mcal/kg MS) de forrajes ensilados de gramíneas con grano y de pastura base leguminosas a partir de la composición química (Modelo 1).

Modelo 1	Parámetros ¹			Modelo ²		
	β_i	EEM	Sig	RMSE	R^2_{Aj}	Sig
DMS_{in vivo} (g/kg MS)						
CIEV ($\alpha=0.05$ y 0.10)						
Intercepta	770	19.3	***	33.2	0.848	***
Lig/FDA	-1149	117.5	***			
CIEV ($\alpha=0.15$)						
Intercepta	704	43.3	***	31.4	0.863	***
Lig/FDA	-875	197.0	***			
Alm (g/kg MS)	0.18	0.108	NS			
DFDN_{in vivo} (g/kg FDN)						
CIEV ($\alpha=0.05, 0.10$ y 0.15)						
Intercepta	547	51.8	***	42.3	0.571	***
aFDN _{mo} (g/kg MS)	0.23	0.105	*			
Lig/FDA	-811	163.7	***			
EM_{in vivo} (Mcal/kg MS)						
CIEV ($\alpha=0.05, 0.10$ y 0.15)						
Intercepta	2.93	0.118	***	0.203	0.576	***
Lig/FDA	-3.53	0.718	***			

¹ EEM = error estándar de la media β_i ; parámetro estimado; CIEV: criterio de inclusión y exclusión de variables por procedimiento Stepwise (α).
² RMSE: raíz cuadrada del cuadrado medio del error; R^2_{Aj} : coeficiente de determinación ajustado; Sig.: significancia; NS: no significativo; †, P<0.10; *, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001.

En el Modelo 4 cuando fueron utilizadas las variables derivadas de la PG del sustrato C de los ensilajes para la predicción de la DMS, DFDN y EM la Tmax y Ac/Pro fueron las incluidas en el modelo seleccionado si el CIEV fue $\alpha=0.05$ (Cuadro 4.7). Pero el nivel de ajuste alcanzado en la estimación de DFDN no resultó satisfactorio e incluso inferior al alcanzado por el Modelo 1 con Lig/FDA (*i.e.* R^2_{Aj} 0.42 y 0.57; RMSE 49.1 y 42.3 para Modelo 4 y 1, respectivamente). A diferencia de lo ocurrido para la estimación de DMS el ajuste fue adecuado e incluso algo mayor al reportado para el Modelo 1 (*i.e.* R^2_{Aj} 0.88 vs.0.85). En cambio la estimación de EM alcanzo $R^2_{Aj}=0.65$ con CIEV=0.05 y $R^2_{Aj}=0.71$ con CIEV=0.10 siendo las VI

incluidas $\mu 50$ y Ac/Pro en vez de Tmax y Ac/Pro. Todos los parámetros fueron estimados con $P < 0.05$.

Cuadro 4.7 Resultados de la selección de modelos para estimar la DMS, DFDN y EM (g/kg MS ó FDN; Mcal/kg MS) de forrajes ensilados de gramínea con granos y de pastura base leguminosas a partir de la producción de gas *in vitro* del forraje completo (Modelo 4).

Modelo 4	Parámetros ¹			Modelo ²		
	β_i	EEM	Sig	RMSE	R^2_{Aj}	Sig
DMS_{in vivo} (g/kg MS)						
CIEV ($\alpha=0.05, 0.10$ y 0.15)						
Intercepta	545	30.2	***			
Tmax (ml/g MS.h)	13.3	2.10	***	29.4	0.881	***
Ac/Pro	-8.4	1.89	***			
DFDN_{in vivo} (g/kg FDN)						
CIEV ($\alpha=0.05, 0.10$ y 0.15)						
Intercepta	622	23.7	***			
Ac/Pro	-9.7	2.66	**	49.1	0.422	**
EM_{in vivo} (Mcal/kg MS)						
CIEV ($\alpha=0.05$)						
Intercepta	2.28	0.190	***			
Tmax	0.04	0.013	**	0.185	0.645	***
Ac/Pro	-0.03	0.012	*			
CIEV ($\alpha=0.10$ y 0.15)						
Intercepta	2.29	0.153	***			
$\mu 50$	8.54	2.270	**	0.167	0.710	***
Ac/Pro	-0.05	0.009	***			

¹ EEM = error estándar de la media β_i ; parámetro estimado; CIEV: criterio de inclusión y exclusión de variables por procedimiento Stepwise (α).

² RMSE: raíz cuadrada del cuadrado medio del error; R^2_{Aj} : coeficiente de determinación ajustado; Sig.: significancia; NS: no significativo; †, $P < 0.10$; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

La relación Ac/Pro incluida en el Modelo 4 es la variable de mayor dificultad de obtención, respecto de las otras hasta aquí mencionadas dentro de los modelos seleccionados (e.g. Lig/FDA, $a_{FDN_{mo}}$, Tmax). Sin embargo, la inclusión de Ac/Pro permitió alcanzar buenos niveles de ajuste en los modelos predictores de DMS (i.e. RMSE 29.4 y 33.2, R^2_{Aj} 0.88 y 0.85 para Modelo 4 y 1, respectivamente); e incluso de EM para la cual las fracciones analíticas resultaron menos apropiadas (i.e.

RMSE 0.167 y 0.203, R^2_{Aj} 0.71 y 0.58 para Modelo 4 y 1, respectivamente). Podrían citarse,

$$\text{DMS (g/kg MS)} = 545 + 13.3 * \text{Tmax (ml/g MS.h)} - 8.4 \text{ Ac/Pro} \quad (\text{Ec. 3})$$

$$\text{EM (Mcal/kg MS)} = 2.29 + 8.54 * \mu 50 \text{ (ml/g MS.h)} - 0.05 * \text{Ac/Pro} \quad (\text{Ec. 4})$$

como las ecuaciones más apropiadas para la estimación del VN a partir de variables derivadas de la PG del sustrato C de forrajes ensilados.

Cuadro 4.8 Resultados de la selección de modelos para estimar la DMS, DFDN y EM (g/kg MS ó FDN; Mcal/kg MS) de forrajes ensilados de gramíneas con grano y de pastura base leguminosas a partir de la producción de gas *in vitro* del residuo insoluble en agua (Modelo 5 y 6).

Modelo 5 + 6	Parámetros ¹			Modelo ²		
	β_i	EEM	Sig	RMSE	R^2_{Aj}	Sig
DMS_{in vivo} (g/kg MS)						
CIEV ($\alpha=0.05$)						
Intercepta	601	72.8	***			
Lag (h)	-152	39.7	**	38.2	0.800	***
AGV _{Total} (mMol/g MS)	27.5	4.45	***			
CIEV ($\alpha=0.10$ y 0.15)						
Intercepta	688	59.5	***			
Lag (h)	-170	36.4	***	35.6	0.825	***
Tmax (ml/g MS.h)	14.6	2.14	***			
DFDN_{in vivo} (g/kg FDN)						
CIEV ($\alpha=0.05, 0.10$ y 0.15)						
Intercepta	774	76.1	***			
Lag (h)	-162	53.4	**	53.1	0.325	**
EM_{in vivo} (Mcal/kg MS)						
CIEV ($\alpha=0.05, 0.10$ y 0.15)						
Intercepta	1.56	0.185	***			
AGV _{Total}	0.11	0.023	***	0.207	0.559	***

¹ EEM = error estándar de la media β_i ; parámetro estimado; CIEV: criterio de inclusión y exclusión de variables por procedimiento Stepwise (α).

² RMSE: raíz cuadrada del cuadrado medio del error; R^2_{Aj} : coeficiente de determinación ajustado; Sig.: significancia; NS: no significativo; †, P<0.10; *, P<0,05; **, P<0.01; ***, P<0.001.

Las variables originadas a partir de la PG del RIA en el Modelo 5 + 6 permitieron alcanzar adecuados niveles de ajuste para DMS, aunque algo inferiores a los de los Modelos 1 y 4, incluyendo Lag y AGV_{Total} o Tmax como VI (*i.e.* R^2_{Aj} 0.80 y 0.82, RMSE 38.2 y 35.6 respecto de Modelos 4 y 1 con R^2_{Aj} 0.88 y 0.86, RMSE 29.4 y 31.4, respectivamente; Cuadro 4.6, Cuadro 4.7 y Cuadro 4.8). La predicción de la DFDN tuvo el ajuste más bajo. El error en la predicción fue 26% superior al del Modelo 1 y solo 8% al del 4 (*i.e.* RMSE 53.1, 49.1 y 42.3). En cambio para EM fue similar a lo descrito en el Modelo 1 (*e.g.* la de menor RMSE y mayor R^2_{Aj}); sin embargo la incorporación de AGV_{Total} como VI hace más compleja y de mayor costo la aplicación práctica de la ecuación.

El aporte de la PG del RIA como único predictor del VN de los forrajes ensilados no resultó superior a las fracciones analíticas (Modelo 1) ni a la PG del sustrato C (Modelo 4). Por lo tanto, no fue sugerido un modelo de predicción para ninguna de las variables respuestas analizadas en este trabajo. En el mismo sentido, se observó que las variables de PG del RIDN tampoco tuvieron adecuada capacidad de predicción en el Modelo 7+8 (Cuadro 4.9). Además los RMSE fueron 1.6 veces superiores para DMS y 1.3 para EM a los reportados con la selección de Modelo 5+6. Incluso y contrariamente a lo esperado el ajuste para DFDN fue menor al registrado para las fracciones analíticas en el Modelo 1 (*i.e.* R^2_{Aj} 0.50 y 0.57; RMSE 48.8 y 42.3, para Modelo 7+8 y 1, respectivamente); aunque sí superó a RIA en el Modelo 5+6 (*i.e.* R^2_{Aj} 0.50 y 0.33; RMSE 48.8 y 53.1, para Modelo 7+8 y 5+6, respectivamente).

Solo en el caso de la estimación de DMS alcanzó una aceptable capacidad de predicción con R^2_{Aj} 0.67, cuando fueron incluidas TTmax, Ac/Pro y A ($P < 0.05$ en la estimación de los parámetros del modelo). Las 1 y 3 resultaron superiores en el

grado de ajuste (*i.e.* RMSE 67% superior para Modelo 7+8 respecto de Ec. 1 y 3) y en la factibilidad de obtención de los resultados requeridos para su aplicación práctica.

Cuadro 4.9 Resultados de la selección de modelos para estimar la DMS, DFDN y EM (g/kg MS ó FDN; Mcal/kg MS) de forrajes ensilados de gramíneas con grano y de pastura base leguminosas a partir de la producción de gas *in vitro* del residuo insoluble en detergente neutro (Modelo 7 y 8).

Modelo 7 + 8	Parámetros ¹			Modelo ²		
	β_i	EEM	Sig	RMSE	R ² _{Aj}	Sig
DMS_{in vivo} (g/kg MS)						
CIEV ($\alpha=0.05$)						
Intercepta	899	79.7	***	62.3	0.463	**
Ac/Pro	-126	32.7	**			
CIEV ($\alpha= 0.10$ y 0.15)						
Intercepta	613	106	***	50.3	0.669	***
Ttmax (h)	6.9	2.64	*			
Ac/Pro	-104	27.3	**			
A (ml/g MS)	0.5	0.16	*			
DFDN_{in vivo} (g/kg FDN)						
CIEV ($\alpha=0.05, 0.10$ y 0.15)						
Intercepta	263	67.2	***	48.8	0.497	**
Ttmax (h)	6.6	2.30	*			
AGV _{Total}	22.8	6.94	**			
EM_{in vivo} (Mcal/kg MS)						
CIEV ($\alpha=0.05$)						
Intercepta	2.69	0.40	***	0.245	0.389	*
Ttmax (h)	0.03	0.013	*			
Ac/Pro	-0.35	0.127	*			
CIEV ($\alpha=0.10$ y 0.15)						
Intercepta	2.12	0.486	***	0.231	0.471	**
Ttmax (h)	0.03	0.012	*			
Ac/Pro	-0.27	0.125	*			
A (ml/g MS)	0.001	0.0007	†			

¹ EEM = error estándar de la media β_i ; parámetro estimado; CIEV: criterio de inclusión y exclusión de variables por procedimiento Stepwise (α).

² RMSE: raíz cuadrada del cuadrado medio del error; R²_{Aj}: coeficiente de determinación ajustado; Sig.: significancia; NS: no significativo; †, P<0.10; *, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001.

Para predecir el VN de los ensilajes también fue planteado el Modelo 9 que incluían variables derivadas de la PG de los sustratos C, RIA y RIDN en forma conjunta y el Modelo 10 que además contaba a las fracciones analíticas como variables de ingreso de información (Cuadro 4.10). Las variables propuestas en estos modelos fueron aquellas previamente identificadas de interés en los Modelos 1, 4, (5+6) y (7+8) (Cuadro 4.4 y Cuadro 4.5). Fueron eliminadas por colinearidad solo en el Modelo 9 Lag y TTmax derivadas de la PG de C, Tmax de RIA y Lag y Tmax de RIDN. Mientras que en Modelo 10 no se detectaron efectos de colinearidad entre variables propuestas.

Cuadro 4.10 Análisis de colinearidad de las variables propuestas para estimar la DMS, DFDN y EM *in vivo* (g/kg MS, g/kg FDN y Mcal/kg MS) de forrajes ensilados de gramíneas con grano y pastura base leguminosas a partir de variables derivadas de la producción de gas *in vitro* del forraje completo, residuo insoluble en agua y en detergente neutro (C; RIA; RIDN) (Modelo 9) y adicionalmente fracción analítica (FA) (Modelo 10).

Variables independientes	Estimación de DMS, DFDN y EM (n=18) ¹	
	Modelo 9	Moldelo 10
Propuestas	C(Lag, Tmax, TTmax, Ac/Pro, μ 50); RIA(Lag, Tmax, TTmax, AGV _{Total}); RIDN(Lag, Tmax, TTmax, Ac/Pro, AGV _{Total} , A)	C(Tmax, Ac/Pro, μ 50); RIA(Lag, Tmax, TTmax, AGV _{Total}); RIDN(TTmax, T50, Ac/Pro, AGV _{Total} , A); FA(PB, FDA, Lig/FDA, Alm)
Eliminadas por colinearidad	C(Lag, TTmax); RIA(Tmax); RIDN(Lag, Tmax)	NC
Seleccionadas	C(Tmax, Ac/Pro, μ 50); RIA(Lag, TTmax, AGV _{Total}); RIDN(TTmax, Ac/Pro, AGV _{Total} , A)	C(Tmax, Ac/Pro, μ 50); RIA(Lag, Tmax, TTmax, AGV _{Total}); RIDN(TTmax, T50, Ac/Pro, AGV _{Total} , A); FA(PB, FDA, Lig/FDA, Alm)

¹ DMS, digestibilidad de la materia seca; DFDN, digestibilidad de la fibra insoluble en detergente neutro; EM, energía metabolizable; NC, no corresponde.

El resultado final de la selección de modelos para la predicción de DMS y DFDN con las variables derivadas de la PG de C, RIA y RIDN, Modelo 9, coincidió con el obtenido en el Modelo 4 (Cuadro 4.7 y Cuadro 4.11). La información más relevante para las predicciones de la DMS y DFDN las aportaron Tmax y Ac/Pro de C. En tanto que las variables aportadas por RIA y RIDN no permitieron adicionar

información para mejorar el nivel de ajuste en forma significativa. Por otro lado la mejor estimación de la EM se obtuvo con el modelo factorial que incorporó RIA(AGV_{Total}) y RIDN(TTmax) (R^2_{Aj} 0.65 y RMSE 0.182), dejando fuera del modelo a las restantes variables, siendo el mismo resultado para un CIEV de 0.05 hasta 0.15. En cambio en el Modelo 4 habían sido incluidas Ac/Pro y μ_{50} de C pero a partir de $\alpha=0.10$ y alcanzando un mejor ajuste del modelo con R^2_{Aj} 0.71 y RMSE 0.167 (Cuadro 4.7). En ninguno de los casos presentados en el Cuadro 4.11 fueron mejorados los niveles de ajuste y predicción de los modelos mencionados con anterioridad en el presente trabajo (i.e. Ec. 1, 2, 3 y 4).

Cuadro 4.11 Resultados de la selección de modelos para estimar la DMS, DFDN y EM (g/kg MS ó FDN; Mcal/kg MS) de forrajes ensilados de gramíneas con grano y de pastura base leguminosas a partir de la producción de gas *in vitro* del forraje completo y de los residuos insolubles en agua y detergente neutro (C, RIA, RIDN) (Modelo 9).

Modelo 9	Parámetros ¹			Modelo ²		
	β_i	EEM	Sig	RMSE	R^2_{Aj}	Sig
DMS_{in vivo} (g/kg MS)						
CIEV ($\alpha=0.05, 0.10$ y 0.15)						
Intercepta	545	30.2	***			
C(Tmax) (h)	13.3	2.10	***	29.4	0.881	***
C(Ac/Pro)	-8.4	1.89	***			
DFDN_{in vivo} (g/kg FDN)						
CIEV ($\alpha=0.05, 0.10$ y 0.15)						
Intercepta	622	23.7	***			
C(Ac/Pro)	-9.7	2.66	**	49.1	0.422	**
EM_{in vivo} (Mcal/kg MS)						
CIEV ($\alpha=0.05, 0.10$ y 0.15)						
Intercepta	1.15	0.248	***			
RIA(AGV _{Total})	0.11	0.022	***	0.182	0.645	***
RIDN(TTmax)	0.02	0.020	*			

¹ EEM = error estándar de la media β_i ; parámetro estimado; CIEV: criterio de inclusión y exclusión de variables por procedimiento Stepwise (α). ² RMSE: raíz cuadrada del cuadrado medio del error; R^2_{Aj} : coeficiente de determinación ajustado; Sig.: significancia; NS: no significativo; †, $P<0.10$; *, $P<0,05$; **, $P<0.01$; ***, $P<0.001$.

Cuadro 4.12 Modelos para estimar DMS, DFDN y EM (g/kg MS ó FDN; Mcal/kg MS) de ensilajes a partir de variables derivadas de la producción de gas *in vitro* del forraje completo y los residuos insolubles en agua y detergente neutro (C, RIA, RIDN) y de la fracción analítica (FA) (Modelo 10).

Modelo 10	Parámetros ¹			Modelo ²		
	β_i	EEM	Sig	RMSE	R ² _{Aj}	Sig
DMS_{in vivo} (g/kg MS)						
CIEV ($\alpha=0.05$)						
Intercepta	450	43.9	***	21.3	0.937	***
RIA(Tmax)	10.8	2.21	***			
FA(Lig/FDA)	0.6	0.10	***			
FA(Alm)	-2.1	0.26	***			
CIEV ($\alpha=0.05, 0.10$ y 0.15)						
Intercepta	717	29.7	***	29.4	0.888	***
RIDN(T50)	2.3	1.00	*			
FA(Lig/FDA)	-1194	105.4	***			
DFDN_{in vivo} (g/kg FDN)						
CIEV ($\alpha=0.05$)						
Intercepta	640	25.6	***	47.1	0.515	***
FA(Lig/FDA)	-655	154.4	***			
CIEV ($\alpha=0.10$ y 0.15)						
Intercepta	640	79.7	***	45.2	0.632	***
FA(Lig/FDA)	-905	255.9	**			
FA(Alm)	-0.57	0.227	*			
C(Tmax)	12.7	7.81	†			
EM_{in vivo} (Mcal/kg MS)						
CIEV ($\alpha=0.05$)						
Intercepta	2.97	0.105	***	0.102	0.911	***
RIA(T50)	-0.022	0.0068	**			
FA(FDA)	-0.007	0.0008	***			
FA(Lig/FDA)	0.008	0.0009	***			
CIEV ($\alpha=0.10$ y 0.15)						
Intercepta	1.60	0.360	***	0.155	0.813	***
FA(Lig/FDA)	-2.92	0.928	**			
FA(Alm)	-0.004	0.0010	***			
C(Tmax)	0.07	0.028	*			
RIA(AGV _{Total})	0.15	0.038	**			

¹ EEM = error estándar de la media β_i ; parámetro estimado; CIEV: criterio de inclusión y exclusión de variables por procedimiento Stepwise (α). ² RMSE: raíz cuadrada del cuadrado medio del error; R²_{Aj}: coeficiente de determinación ajustado; Sig.: significancia; NS: no significativo; †, P<0.10; *, P<0,05; **, P<0.01; ***, P<0.001.

Al incorporar en el Modelo 10 también a las fracciones analíticas entre las VI a seleccionar, éstas muestran alta capacidad predictiva por sobre las variables derivadas de la PG (Cuadro 4.12). Sin embargo, los modelos finalmente seleccionados y que mejor capacidad predictiva de DMS, DFDN y EM presentaron, fueron los que incluyeron además un término con información derivada de la PG. En el caso de la DMS fue RIA(Tmax) ó RIDN(T50); para DFDN fue C(Tmax); y finalmente para EM C(Tmax) ó RIA(T50). El Modelo 10 para predecir DMS alcanzó un $R^2_{Aj}=0.937$ como valor máximo y superior al presentado en la Ec. 3 y un RMSE 28% inferior, pero con el inconveniente de requerir la preparación del sustrato RIA para la PG *in vitro*. Por los resultados presentados en Cuadro 4.12 podrían ser propuestas para predecir DMS, DFDN y EM de forrajes ensilados a partir del Modelo 10 las siguientes cinco ecuaciones,

$$\text{DMS (g/kg MS)} = 450 + 10.8 * \text{RIA(Tmax)} + 0.6 * (\text{Lig/FDA}) \quad (\text{Ec. 5})$$

$$\text{DMS (g/kg MS)} = 717 + 2.3 * \text{RIDN(T50)} - 1194 * (\text{Lig/FDA}) \quad (\text{Ec. 6})$$

$$\text{DFDN (g/kg FDN)} = 640 - 905 * (\text{Lig/FDA}) - 0.57 * (\text{Alm}) + 12.7 * \text{C(Tmax)} \quad (\text{Ec. 7})$$

$$\text{EM (Mcal/kg MS)} = 2.97 - 0.022 * \text{RIA(T50)} - 0.007 * (\text{FDA}) + 0.008 * (\text{Lig/FDA}) \quad (\text{Ec. 8})$$

$$\begin{aligned} \text{EM (Mcal/kg MS)} = & 1.60 - 2.92 * (\text{Lig/FDA}) - 0.004 * (\text{Alm}) + 0.07 * \text{C(Tmax)} + \\ & + 0.15 * \text{RIA(AGV}_{\text{Total}}) \quad (\text{Ec. 9}) \end{aligned}$$

Donde Alm y FDA se encuentran expresados en g/kg MS, Tmax y T50 en ml/g MS.h y RIA(AGV_{Total}) en mmol/g MS. La ecuación 7 fue la que presentó mejor ajuste para predecir DFDN (R^2_{Aj} 0.63; RMSE 45.2; $P < 0.0001$) respecto a todos los modelos antes descritos, registrando mayor R^2_{Aj} y RMSE que la Ec. 2 (*i.e.* R^2_{Aj} 0.63 y 0.57; RMSE 45.2 y 42.3) En este caso la variable C(Tmax) no presenta dificultades para su obtención ya que no requiere disponer de equipamiento de

laboratorio especializado u oneroso. Por último, las ecuaciones 8 y 9 fueron las de mejor ajuste (R^2_{Aj} 0.91 y 0,81, RMSE 0.102 y 0,155) para predecir la EM incluyendo a RIA(T50) ó C(Tmax) como VI junto a FDA y Lig/FDA ó Alm. Sin embargo la mejora alcanzada en la precisión de la ecuación 8 respecto de la 9 promueve el análisis de la cinética de PG del RIA.

Luego del análisis de los modelos seleccionados quedarían identificadas las Ec. 1,3, 5 y 6 para predecir DMS; Ec. 2 y 7 para DFDN y Ec. 4, 8 y 9 para EM. Las ecuaciones 3 y 4 contienen términos que requieren la determinación de AGV y sus proporciones. Esta determinación presenta como desventaja para la utilización de las ecuaciones la complejidad en la obtención del resultado por la necesidad del equipo necesario y la mano de obra especializada. Además, la adición de dichos términos no mejoró los ajustes para predecir la DMS y EM, ya que fueron ampliamente superados por Ec. 5 y 8, respectivamente (*i.e.* 28 y 25% menos de RMSE). También, como alternativas, aunque de menor precisión que 5 y 8, podrían ser tenidas en cuenta Ec. 6 y 9. En tanto que la PG no permitió alcanzar el ajuste logrado por las fracciones de la PC en la predicción de la DFDN. En cualquiera de los casos descriptos la Ec. 2 surgió como la más promisoría.

4.5. Discusión

La técnica de producción de gas supone que la MSD *in vitro* puede ser explicada por la PGA a tiempos prolongados de incubación. Por lo tanto sería esperable que la PG surgiera como una VI seleccionada en alguno de los modelos propuestos para predecir el VN. Sin embargo, otras variables fueron de mayor interés como fue el caso de aquellas asociadas a la cinética de PG. Se podrían mencionar RIA(Tmax), C(Tmax) y RIA(T50) en las Ec. 5, 7 y 8, respectivamente. Por otro lado, las variables derivadas de la PG no fueron suficientes para alcanzar buenos niveles de ajuste en los modelos descriptos, debiendo ser incluida en cualquiera de los casos al menos una fracción analítica (e.g. FDA_{mo} , $aFND_{mo}$, Lig_{AS} y Alm). Menke y otros (1979) Chenost y otros (2001) y Gosselink y otros (2004) también mencionaron dificultades en las predicciones de distintos forrajes con las PGA. Cabe destacar que las determinaciones de química húmeda, posiblemente por la rapidez, facilidad y bajo costo fueron las más utilizadas para el desarrollo de ecuaciones de predicción del VN de los ensilajes (Cuadro 4.13).

En el Cuadro 4.13 se presenta un compilado de ecuaciones de predicción para forrajes ensilados de DMS, DMO, DFDN y EM propuestas por varios autores. Solo Menke y Steingass (1988) y Kamalak y otros (2005) agruparon ensilajes de pastura y planta entera de maíz como se propuso en este trabajo. En coincidencia con este trabajo, el uso de ovinos alimentados a nivel de mantenimiento como método de referencia *in vivo* aparece como el más difundido. Únicamente De Boever y otros (2005) trabajaron con un método *in vitro* de punto final como referencia lo que le permitió reducir el error en el modelo propuesto (*i.e.* DMS RSD 13g/kg MS). La mayoría de los investigadores mantienen separados estos dos grupos de forrajes ensilados posiblemente a causa de la variación en composición y

diferencias en el proceso de degradación. Tal como se discutió con anterioridad en los Capítulos 2. y Capítulo 3. respecto de las interacciones observadas entre forrajes y tratamientos aplicados.

A pesar de separar los ensilajes por grupos de forrajeras no se observaron mejoras en los niveles de ajuste de las ecuaciones citadas en la bibliografía. En este sentido algunos autores trabajaron con un elevado número de ensilajes (e.g. >50 UE) sin encontrar diferencias con aquellos que usaron una menor cantidad. En este trabajo se usaron 18 UE y los ajustes logrados en las ecuaciones propuestas fueron similares a los reportados en la bibliografía (e.g. R^2 0.50 a 0.90 y RSD 25 a 50 g/kg). En tanto que la DFDN fue la que mayores dificultades presentó al igual que para Givens y otros (1993) y para Yan y Agnew (2004a); quienes no lograron superar R^2 0.60 y RSD 46, similar a lo ocurrido con las Ec. 2 y 7 (i.e. R^2 0.52 a 0.63 y RSD 47 y 45, respectivamente).

La menor capacidad predictiva de la PGA a diferentes tiempos de incubación respecto a otras variables podría estar explicada por los cambios ocurridos en los perfiles de fermentación entre SGgr, SL y sus RI ya discutidos en la sección 3.5. del Capítulo 3. . Estos cambios modifican las contribuciones de gas directa e indirecta y con ello las diferencias relativas entre forrajes que no se corresponden con lo observado *in vivo*. Como ejemplo de esto se observó que la relación entre la MSD y PGA a 72 h *in vitro* para SGgr y SL fue diferente, aunque muy variable en ambos casos (i.e. B_1 0.21 y -0.35; R^2 0.22 y 0.46 para SGgr y SL, respectivamente; Figura 4.6, A). En los SL se observó una relación negativa entre la PGA y MSD, explicada al menos en parte por el mayor contenido de PB de los sustratos ($P < 0.0001$).

Cuadro 4.13 Ecuaciones de predicción de digestibilidad de la materia seca, orgánica y fibra insoluble en detergente neutro (DMS, DMO y DFDN) y contenido de energía metabolizable (EM) para forrajes ensilados publicadas por diversos autores.

Autor	FE ¹	Ref ²	N° ³	Ecuación ⁴	R ²	RSD ⁵
<i>Digestibilidad de la material seca (DMS; g/kg MS)</i>						
(Givens y otros, 1989)	P	O-M	124	993 - 0.927 * FDA	(1)	-
(Givens y otros, 1993)	P	O-M	37	891 - 0.903 * FDA	(2)	-
(Jones y otros, 1980)	P+Mz	O-AdL	11	646 - 7.1 * MS + 56.9 * Lig + 0.5 * (PB/FDN) - 1.7 * (FDA/Lig)		0.79
(Kamalak y otros, 2005)	P+Mz	O-AdL	5	(2.58+560*c)*10		0.74
	P+Mz	O-AdL	5	(7.56+0.888*b)*10		0.92
	P+Mz	O-AdL	5	(7.93+0.847*(a+b))*10		0.86
	P+Mz	O-AdL	5	(6.6+76*c+1.94*b-1.12*(a+b))*10		0.96
	P+Mz	O-AdL	5	(-3.12+275*c+0.579*(a+b))*10		0.96
(Marten y otros, 1975)	S	O-M	26	854.9 - 0.75 * FDA		0.80
	Mz	O-M	25	828.7 - 0.78 * FDA	(3)	0.61
(Yan y Agnew 2004b)	P	O-M	136	1296 + 0.485 * PB - 1.72 * Cen - 0.986 * FDN	(4)	0.67
<i>Digestibilidad de la material orgánica (DMO; g/kg MO)</i>						
De Boever y otros (1996)	P	OB-M	64	902 - 0.588 * Lig	(5)	0.53
	P	OB-M	64	928.5 - 0.581 * Lig - 0.010 MS	(6)	0.59
	P	OB-M	64	846.9 - 0.622 * Lig + 0.102 * FDA - 0.046 * FDN	(7)	0.65
De Boever y otros (2005)	Mz	TyT	30	8.45 + 0.897 * MO _{f72h}		0.78
Ferret y otros (1997)	Mz	O-AdL	11	830.5 - 4.3 * Lig	(8)	0.77
Flores y otros (2003)	Mz	O-M	67	847.1 - 0.409 * FDN	(9)	0.24
	Mz	O-M	67	758.0 - 3.616 * Lig	(10)	0.25
	Mz	O-M	67	827 - 0.621 * FDA	(11)	0.28
	Mz	O-M	67	785.1 - 0.685 * FDA + 0.896 * PB	(12)	0.30
	Mz	O-M	67	708.2 - 4.492 * Lig + 1.072 * PB	(13)	0.44
	Mz	O-M	67	1069 - 0.972 * FDA - 0.50 * MS	(14)	0.50
	Mz	O-M	67	1041.8 - 1.190 * FDA + 2.145 * Cen - 0.477 * MS	(15)	0.58
	P	O-M	194	680.6 - 0.424 * FDA + 1,071 * PB	(16)	0.50
	P	O-M	194	806.2 - 0.797 * FDA + 0.32 * (FDA/PB)	(17)	0.52
	P	O-M	194	786.9 - 0.426 * FDN + 0.827 * PB	(18)	0.53
	P	O-M	194	1094 - 1.013 * FDN - 1.563 * PB + 0.0466 * (FDN/PB)	(19)	0.56
	P	O-M	194	839.4 - 0.419 * FDN + 0.723 * PB - 0.685 * Lig	(20)	0.58
	P	O-M	194	1106.9 - 0.937 * FDN - 1.38 * PB - 0.639 * Lig + 0.0411 (FDN/PB)	(21)	0.60
Garcia-Rodriguez y otros (2005)	Mz	O-M	-	565.0 + 0.18 * B + 4384.2 * c - 3.57 * PB - 33.65 * MS		0.50
	Mz	O-M	-	515.7 + 0.20 * B + 3863.5 * c + 0.77 * PB - 1.74 * MS - 42.35 * pH		0.57
	P	O-M	-	226.0 + 1.40 * B + 1777.1 * c - 0.25 * FDN + 0.79 * PB		0.80
	P	O-M	-	474.4 - 1.57 * A + 0.87 * B + 2558.2 * c - 0.37 * FDA + 0.62 * PB + 31.80 * pH		0.84
Givens y otros (1995)	Mz	O-M	106	877 - 0.44 * FDN	(22)	0.44
	Mz	O-M	106	859 - 0.723 * FDA	(23)	0.43
	Mz	O-M	106	609 + 0.33 * Alm	(24)	0.31
Nousiainen y otros (2003)	P	O-M	25	1192 - 0.79 * FDN	(25)	0.81
	P	O-M	25	1199 - 1.42 * FDA	(26)	0.85
	P	O-M	25	931 - 5.718 * Lig	(27)	0.80
	P	O-M	25	1088 - 0.43 * FDN - 3.1 * Lig	(28)	0.87
	P	O-M	25	1115 - 0.91 * FDA - 2.4 * Lig	(29)	0.88
	P	O-M	25	1109 - 1.26 * FDA + 0.2 * PB	(30)	0.86

Continuación Cuadro 4.13

Autor	FE ¹	Ref ²	N° ³	Ecuación ⁴	R ²	RSD ⁵	
<i>Digestibilidad de la materia orgánica (DMO; g/kg MO)</i>							
Rinne y otros (2006)	Leg	O-M	33	994 - 0.79 * FDN	(31)	0.82	26.2
	Leg	O-M	33	916 - 0.83 * FDA	(32)	0.82	26.1
	Leg	O-M	33	819 - 2.46 * Lig	(33)	0.81	27.3
	Leg	O-M	33	411 + 1.88 * PG 24h (ml/g FDN)	(34)	0.71	33.3
	Leg	O-M	33	350 + 1.88 * PG 48h (ml/g FDN)	(35)	0.67	35.6
	Leg	O-M	33	344 + 1.84 * PG 72h (ml/g FDN)	(36)	0.66	36.1
Yan y Agnew (2004b)	P	O-M	136	1301 + 0.50 * PB - 1.446 * Cen - 0.997 * FDN	(37)	0.68	-
<i>Digestibilidad de la fibra insoluble en detergente neutro (DFDN; g/kg FDN)</i>							
Givens y otros (1993)	P	O-M	13	1160 - 1.36 * FDA	(38)	0.59	46.0
	P	O-M	13	1167 - 0.805 * FDN	(39)	0.42	55.0
Yan y Agnew (2004b)	P	O-M	136	1153 + 1.131 * PB - 1.88 * Cen - 0.853 * FDN	(40)	0.55	-
<i>Energía metabolizable (EM; Mcal/kg MS)</i>							
De Boever y otros (1996)	P	OB-M	64	(13.97 - 0.0122 * Cen - 0.0786 * Lig) / 4.186	(41)	0.78	0.20
	P	OB-M	64	(14.73 - 0.0131 * Cen - 0.0778 * Lig - 0.0022 * MS) / 4.186	(42)	0.84	0.10
	P	OB-M	64	(15.67 - 0.0138 * Cen - 0.0809 * Lig - 0.0023 * MS - 0.0048 * PB) / 4.186	(43)	0.86	0.10
	P	OB-M	64	(13.97 - 0.0127 * Cen - 0.0701 * Lig - 0.0015 * MS - 0.0053 * PB + 0.0249 * EE) / 4.186	(44)	0.87	0.09
Menke y Steingass (1988)	P+Mz	O-M	62	(14.64 - 0.0154 * FDA) / 4.186	(44)	0.86	-
	P+Mz	O-M	62	(15.13 - 0.0206 * FC) / 4.186		0.92	-
	P+Mz	O-M	62	(13.99 - 0.0158 * FDA + 0.0244 * EE) / 4.186		0.89	-

¹ FE: forraje ensilado de pastura consociada (P), leguminosas (Leg) y planta entera de maíz o sorgo (Mz ó S).² Ref: método de referencia usado; *in vivo* con ovinos o bovinos a mantenimiento o *ad libitum* (O, B, M ó AdL); TyT, método *in vitro* de Tilley y Terry (1963).³ N°: número de muestras usadas en el desarrollo de la ecuación.⁴ Los números entre paréntesis identifican la ecuación que fue comparada con los resultados del presente trabajo. Variables independientes en g/kg MS; MS: materia seca; Cen: cenizas; FDN: fibra insoluble en detergente neutro; FDA: fibra insoluble en detergente ácido; Lig: lignina; PB: proteína bruta; EE: extracto etéreo; FC: fibra cruda; PG: producción de gas a la 24, 48 ó 72 horas; Alm: almidón; a, b y c: parámetros de la cinética de PG estimados por el modelo de Ørskov y McDonald (1979); MOf72h: materia orgánica fermentada a 72 horas de incubación *in vitro*.⁵ RSD = error estandar.

Durante el proceso de degradación del sustrato la PB libera al medio amoníaco que desplaza el equilibrio del buffer de incubación en el sentido contrario a lo mencionado para el caso de los AGV, capturando CO₂ en solución. Como resultado de este desplazamiento se reduce el volumen de gas liberado (Schofield, 2000). En los SL el mayor contenido de PB coincide con aquellos de mayor digestibilidad lo que explicaría la menor PGA a mayor MSD *in vitro* (Figura 4.6). Esta variabilidad en la PGA podría explicar la baja capacidad predictiva de la variables de ella derivadas cuando se incubaba forraje ensilado completo y en fresco tal como fue usado en este trabajo. Por otro lado y en acuerdo con lo anterior, los

lavados de los RI eliminan la mayor proporción de fuentes nitrogenadas lo cual explicaría la relación establecida entre MSD y PGA, lineal y positiva (*i.e.* R^2 0.83; Figura 4.6, B). Permitiendo además establecer una relación de menor variabilidad que la de los sustratos completos incubados en fresco.

Fueron descritas en la bibliografía ecuaciones que incluyeron a la PGA como predictor del VN de alimentos para animales, aunque con niveles de ajuste inferiores a los encontrados en el presente trabajo. Además los sustratos fueron incubados en seco y molidos, aunque el contenido de humedad fue corregido por alguna de las determinaciones de referencia para ensilajes en la mayoría de los casos (*e.g.* estufa vs tolueno o liofilización). Gosselink y otros (2004) encontraron que para predecir la DMO de pasturas, la PGA a las 20 horas fue la variable de mayor importancia, respecto de los otros tiempos de incubación en la selección de modelos (*i.e.* R^2 0.55 y RMSE 31 g/kg MO). Aunque para mejorar la precisión de las ecuaciones de predicción era necesario incluir FDN y PB (*i.e.* R^2 0.60 y RMSE 29 g/kg MO) ó recurrir a la digestibilidad *in vitro* de Tilley y Terry (1963) para alcanzar $R^2=0.71$ y RMSE=24 g/kg MO. En coincidencia a lo reportado por De Boever y otros (2005) quienes para predecir la DMO de ensilajes de planta entera de maíz utilizaron la MO fermentada a la 72 horas medida como la desaparición de sustrato *in vitro*. En dicho trabajo no fueron incluidas como variables de interés en los modelos seleccionados la PG hasta la hora 3, de 3 a 20 h y a las 72 h, tiempo medio para alcanzar las PG en cada intervalo y Tmax entre 3 y 20 h. Por otro lado, para predecir DMO de ensilajes de pastura las fracciones analíticas FDA_{mo} , $aFDN_{mo}$ y Lig_{as} fueron las que explicaban la mayor proporción de la variabilidad total cuando se ajustaba con ellas un modelo de regresión lineal múltiple (*i.e.* $R^2=0.65$ y RMSE=29 g/kg MO; De Boever y otros (1996). En cambio, Ribeiro y Moreira (2000) trabajando con forrajes de pastura no encontraron buenos ajustes para predecir

DMS *in vivo* a partir de la PG, tanto desde los parámetros que describen la cinética de PG, como de la misma PGA. Aunque el único que no resultó estadísticamente significativo fue el ajustado a la PGA a tiempo infinito ($R^2=0.22$ y $P=0.205$).

A pesar de la amplia gama de métodos alternativos estudiados por varios autores para predecir DMS, DMO DFDN o EM de los forrajes ensilados, muchos de ellos coinciden en que los métodos *in vitro* de punto final son los más adecuados (Marten y otros, 1975; Givens y otros, 1993; Givens y otros, 1995; De Boever y otros, 1996; Flores y otros, 2003; De Boever y otros, 2005; Rinne y otros, 2006). Entre los métodos *in vitro* citados se encontraron el de Goering y Van Soest (1970), pepsina + celulasa y el de Tilley y Terry (1963). Con éste último fueron publicados ajustes superiores a 90% con errores inferiores a 20 g/kg MO. En el Cuadro 4.13 se presenta una recopilación de ecuaciones propuestas por varios de los autores citados. Otros autores también publicaron ecuaciones para predecir el VN de ensilajes de maíz y pastura a partir de los resultados de química húmeda convencional (Marten y otros, 1975; Jones y otros, 1980; Menke y Steingass, 1988; Givens y otros, 1989; Givens y otros, 1993; Ferret y otros, 1997 Flores y otros, 2003; Nousiainen y otros, 2003; Yan y Agnew, 2004a) (Cuadro 4.13). Incluso reportando en algunos casos que la PG *in vitro* no resultó apropiada para predecir el VN de los ensilajes (Menke y Steingass, 1988). En contraposición a lo citado anteriormente, Rinne y otros (2006) reportaron ecuaciones de regresión lineal simple con adecuados ajustes para predecir DMO de ensilajes de maíz a partir de la PG a las 24, 48 y 72 h de la FDN de los sustratos estudiados (*i.e.* R^2 0.70 y RMSE 33.3 g/kg MS). Sin embargo la FDN, FDA y Lig resultaron aun mejores predictores que la PGA (*i.e.* R^2 0.82 y RMSE 27.3 g/kg MS).

Algunas de las dificultades encontradas por los autores al aplicar las variables derivadas de la PG fueron explicadas o atribuidas al uso del ensilaje seco en estufa que subestima la digestibilidad del forraje a causa de la pérdida de los compuestos volátiles (Brown y Radcliffe, 1971; Deaville y Givens, 1998; Dumont y otros, 2005). La solución propuesta fue corregir el contenido de MS de los ensilajes por la determinación por tolueno o liofilización. Sin embargo, además de la subestimación de la digestibilidad debe ser tomada en cuenta la reducción de la tasa de degradación a causa de las transformaciones ocurridas durante el secado como ya se comentó en la sección 3.5. del Capítulo 2.

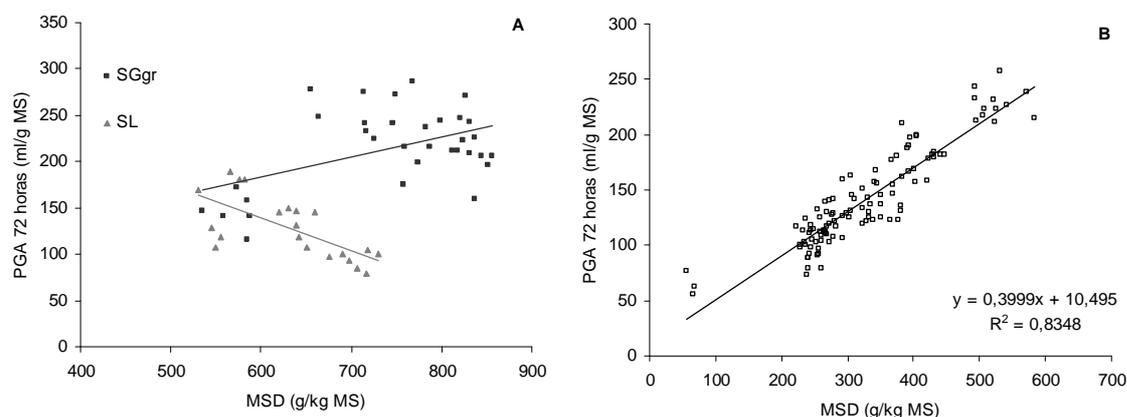


Figura 4.6 Relación entre la materia seca desaparecida (MSD) y la producción de gas acumulada a las 72 horas (PGA) para ensilajes de gramínea con grano (SGgr; ■) y pasturas base leguminosas (SL; Δ) incubadas en fresco en **A** y para los residuos insolubles en agua y detergente neutro de todos los ensilajes en **B** (□).

En coincidencia a lo reportado en este trabajo, Chenost y otros (2001) encontraron que la tasa de PG (c , ml/h) estimada según el modelo de Ørskov y McDonald (1979), fue el mejor predictor de DMO de forrajes de pastura (*i.e.* R^2 0.89 y 0.97 y RMSE 21.6 y 8.8 g/kg MS para gramíneas y alfalfa, respectivamente). En coincidencia con esto Kamalak y otros (2005) también encontraron buenos ajustes al predecir la DMS con c , pero éstos aumentaban considerablemente cuando se adicionada un término con $(a + b)$ (*i.e.* R^2 0.74 y 0.96; RMSE 56 y 21 g/kg MS).

García-Rodríguez y otros (2005) encontraron respuestas similares para forrajes ensilados de pastura y maíz, aunque debieron incorporar además el contenido de PB como VI en los modelos propuestos.

Las ecuaciones del Cuadro 4.13 podrían ser usadas como alternativas a las propuestas en este trabajo (*i.e.* Ec. 1 a 9). Sin embargo debían ser evaluadas a fin de establecer su coincidencia con los ensilajes de producción local. Fueron usadas aquellas ecuaciones para las cuales se disponía de la información requerida (*e.g.* las ecuaciones fueron numeradas del 1 al 44 en el cuadro para su identificación). Dado que las estimaciones eran específicas por tipo de ensilaje se analizaron por SGgr, SL y base de datos completa. Los resultados predichos fueron correlacionados con los observados *in vivo* de DMS, DMO, DFDN y EM para seleccionar las ecuaciones más apropiadas. En cualquiera de los casos estudiados las mejores correlaciones se observaron para la base de datos completa sin distinción entre SGgr y SL. Aquellas elegidas se describen en el Cuadro 4.14 y fueron las que alcanzaron coeficientes de correlación superiores a 0.90 para DMO y 0.70 para DMS y EM. La estimación de DFDN reportada por Givens y otros (1993) y Yan y Agnew (2004a) no mostró correlaciones significativas; la ecuación 38 alcanzó el valor más alto con $r = 0.49$ para SL, aunque no resultó significativo ($P > 0.05$).

Las ecuaciones para DMO 6, 8, 10, 13, 27 y 33 del Cuadro 4.13 fueron las más apropiadas predecir los valores observados *in vivo*. A su vez, solo la 33 estimó resultados equivalentes a los observados (*i.e.* $\beta_0=0$ y $\beta_1=1$); por lo tanto sería la más apropiada de todas las presentadas para predecir DMO. En cambio las usadas para DMS y EM no se correlacionaron con los valores observados (*i.e.* $R^2_{aj} < 0.50$). Sin embargo, las ecuaciones propuestas en este trabajo resultaron superadoras a las

de la bibliografía (*i.e.* Ec. 1 a 9); aunque en algunos casos presentaron la desventaja de requerir un mayor número de determinaciones de laboratorio.

Cuadro 4.14 Ecuaciones de transformación de los valores predichos por las ecuaciones de la bibliografía (x) a los observados *in vivo* (y) ($n=18$).

Ecuación ¹	β_0	β_1	R^2_{aj}	RSD	Sig
<i>Digestibilidad de la materia seca (g/kg MS)</i>					
1	83.9	0.82	0.449	63.1	**
2	125.1	0.66	0.450	63.0	**
3	177.0	0.68	0.451	63.0	**
<i>Digestibilidad de la materia orgánica (g/kg MO)</i>					
6	-2813	3.9	0.864	29.1	***
8	325.5	0.51	0.865	28.9	***
10	289.1	0.61	0.866	28.8	***
13	310.2	0.57	0.814	34.0	***
27	392.4	0.39	0.866	28.9	***
33	16.9	0.90	0.866	28.8	***
<i>Energía metabolizable (Mcal/kg MS)</i>					
41	1.73	0.32	0.498	0.22	***
42	1.70	0.33	0.514	0.22	***
43	1.75	0.30	0.505	0.22	***

¹ El número de ecuación corresponde al consignado entre paréntesis en el Cuadro 4.13
RSD: desvío estándar de los residuales; R^2_{aj} : coeficiente de determinación ajustado; Sig.: significancia; NS: no significativo; †, $P<0.10$; *, $P<0.05$; **, $P<0.01$; ***, $P<0.001$.

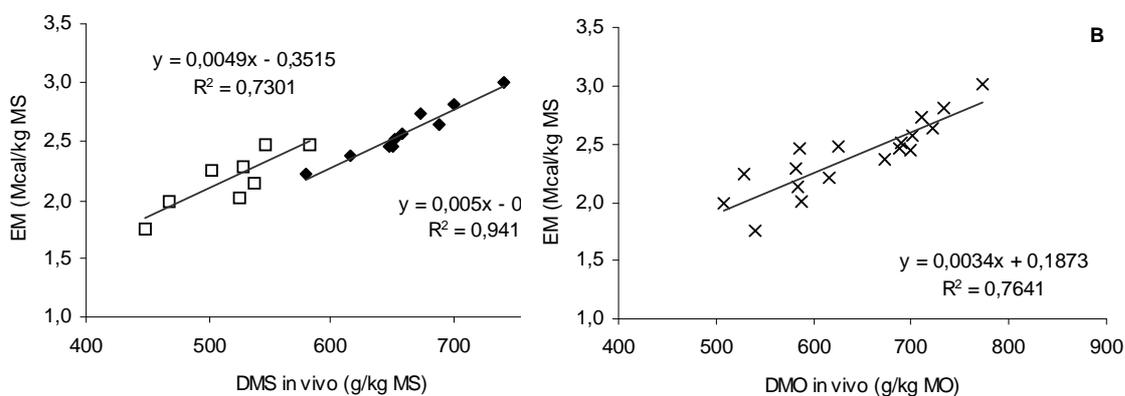


Figura 4.7 Relación entre el contenido de energía metabolizable (EM) y la digestibilidad de la materia seca y orgánica *in vivo* (DMS, **A** y DMO, **B**) de forrajes ensilados con más (◆, $n=10$) y menos (□, $n=8$) de 100 g de almidón /kg MS o todos los datos (x, $n=18$).

La concentración energética y el contenido de PB de los alimentos son requeridos para la formulación de raciones. Las ecuaciones de predicción de la DMS y DMO son una herramienta para alcanzar por último la estimación de la EM. Para los forrajes ensilados estudiados en este trabajo se detectó que la transformación de la DMS a EM era dependiente de la EB del ensilaje. Algunos autores sugieren la medición o estimación de esta variable para mejorar el grado de ajuste de los modelos (Givens y otros, 1989, Flores y otros, 2003; Yan y Agnew, 2004b). Dado que la determinación de la EB es costosa y en el caso de los ensilajes presenta la dificultad adicional de requerir la liofilización del forraje se propuso una fórmula para la estimación de la EM a partir de la DMS (e.g. la liofilización minimiza la pérdida de los compuestos volátiles de alta densidad energética como los AGV). Fue necesario ajustar la ecuación para los ensilajes con más o menos de 100 g Alm / kg MS (Figura 4.7).

4.6. Conclusión

Las ecuaciones que se detallan a continuación fueron seleccionadas a partir de la evaluación por química húmeda y producción de gas *in vitro* para ensilajes de gramíneas con grano y pastura a base de leguminosas (Cuadro 4.15). Siendo consideradas las más relevantes Ec. 5 y 8 para DMS y EM, respectivamente por su facilidad de aplicación y menor costo respecto de las otras.

Cuadro 4.15 Ecuaciones de predicción desarrolladas en el presente trabajo.

Ecuaciones	R^2_{aj}	RSD
Digestibilidad de la materia seca (DMS; g/kg MS)		
Ec. 1 $770 - 1149 * (\text{Lig}/\text{FDA})$	0.85	33.2
Ec. 3 $545 + 13.3 * T_{\text{max}} - 8.4 \text{ Ac}/\text{Pro}$	0.88	29.4
Ec. 5 $450 + 10.8 * \text{RIA}(T_{\text{max}}) + 0.6 * (\text{Lig}/\text{FDA})$	0.94	21.3
Ec. 6 $717 + 2.3 * \text{RIDN}(T_{50}) - 1194 * (\text{Lig}/\text{FDA})$	0.89	29.4
Digestibilidad de la fibra insoluble en detergente neutro (DFDN; g/kg FDN)		
Ec. 2 $547 + 0.23 * {}_a\text{FDN}_{\text{mo}} - 811 * (\text{Lig}/\text{FDA})$	0.57	42.3
Ec. 7 $640 - 905 * (\text{Lig}/\text{FDA}) - 0.57 * (\text{Alm}) + 12.7 * \text{C}(T_{\text{max}})$	0.63	45.2
Energía metabolizable (Mcal/kg MS)		
Ec. 4 $2.29 + 8.54 * \mu_{50} - 0.05 * \text{Ac}/\text{Pro}$	0.71	0.17
Ec. 8 $2.97 - 0.022 * \text{RIA}(T_{50}) - 0.007 * (\text{FDA}) + 0.008 * (\text{Lig}/\text{FDA})$	0.89	0.10
Ec. 9 $1.60 - 2.92 * (\text{Lig}/\text{FDA}) - 0.004 * (\text{Alm}) + 0.07 * \text{C}(T_{\text{max}}) + 0.15 * \text{RIA}(\text{AGV}_{\text{Total}})$	0.81	0.16

¹ Variables independientes en g/kg MS corregida por liofilización; ${}_a\text{FDN}_{\text{mo}}$: fibra insoluble en detergente neutro libre de cenizas y con α -amilasa; FDA_{mo} : fibra insoluble en detergente ácido libre de cenizas; Lig: lignina; Alm: almidón.

Variables en ml/g MS.h, T_{max} : tasa máxima de producción de gas; μ_{50} : tasa específica de producción de gas al tiempo en que se produce el 50% del total de gas

T_{50} : tiempo en que se produce el 50% del total de gas liberado (h); $\text{AGV}_{\text{Total}}$: ácidos grasos volátiles totales (mmol/g MS incubada)

Las ecuaciones alcanzadas para predecir DFDN presentaron pobres niveles de ajuste en forma consistente a lo reportado por otros autores. Sería necesario continuar explorando las razones de la elevada variabilidad en los resultados obtenidos. Aunque el papel que juega el almidón en la reducción de la digestión de la celulosa pareciera ser el factor determinante.

Las diversas ecuaciones de predicción reportadas en la bibliografía, en su mayoría, no resultaron apropiadas para predecir la DMS, DMO y EM de los forrajes ensilados producidos localmente y a escala comercial. Resulta razonable que aquellas que fueron desarrolladas en la región resulten más adecuadas. En este sentido, fueron alcanzados adecuados niveles de ajuste con errores similares a los reportados por la bibliografía y en algunos casos inferiores. Si bien las fracciones analíticas como ${}_a\text{FDN}_{\text{mo}}$, Lig/FDA y almidón fueron fundamentales para el desarrollo de las ecuaciones, otras variables derivadas de la PG fueron necesarias para reducir la magnitud de los errores de la predicción. En este sentido, las tasas de PG y los tiempos en que éstas ocurrieron (*i.e.* Tmax, $\mu 50$ y T50) fueron de mayor utilidad que las PGA. Además los parámetros de la cinética de PG de los residuos insolubles en agua y detergente neutro (*i.e.* RIA y RIDN) permitieron mejorar la precisión de la predicción de DMS en la Ec. 5 y 6 respecto de la 1 (*i.e.* RSD 21.3 y 29.4 vs 33.2). Algo similar ocurrió con la Ec. 8 respecto de las 4 y 9. Finalmente, la aplicación de las ecuaciones propuestas requiere la expresión de las fracciones analíticas en base seca corregida por liofilización así como la incubación de los ensilajes en fresco pero molidos con hielo seco.

Capítulo 5.

Conclusiones generales

La inclusión de los forrajes ensilados en las dietas de rumiantes utilizadas en nuestro país se ha duplicado en los últimos diez años y las perspectivas continúan en aumento. En el contexto actual donde la ganadería fue desplazada por la agricultura hacia zonas menos productivas, pero la demanda de sus productos se mantiene, resulta indispensable conocer las ineficiencias del sistema productivo a fin de minimizarlas. De este modo sería posible asegurar la sustentabilidad productiva y económica así como la rentabilidad del sistema pecuario a pesar de la menor productividad de las nuevas regiones ganaderas. En este sentido, la valoración nutricional de los ensilajes cobra cada vez mayor importancia y es por eso que el objetivo del presente proyecto fue generar conocimientos y criterios que mejoren la evaluación de la calidad de los forrajes ensilados.

La evaluación de la calidad de los alimentos tiene como principales objetivos estimar la densidad energética y el nivel de consumo máximo que se permite lograr. En el caso de los forrajes ensilados es reconocida la dificultad que existe para alcanzar adecuados niveles de predicción de las variables mencionadas anteriormente. Estas dificultades fueron atribuidas entre otras a la complejidad en composición de los materiales ensilados, principalmente a los hidratos de carbono estructurales y no estructurales y a la proporción de sustancias volátiles que los integran.

Para la evaluación de alimentos por química húmeda existe acuerdo entre numerosas fuentes, acerca del procesamiento por estufa y posterior molienda de las

muestras. En cambio, cuando el análisis a practicar es *in vitro* de punto final o cinética de digestión no existe en la bibliografía un criterio único de trabajo.

Uno de los puntos más discutidos acerca del procesamiento de los ensilajes para su análisis es el modo de presentación. La pregunta que surge es si la muestra debe estar seca o fresca para el estudio *in vitro*. En este trabajo se detectó que la respuesta a esa pregunta varía en función de la variable en estudio y del objetivo final del análisis. La DMS *in vivo* fue sobreestimada por la MSD tanto con sustrato fresco como seco a las 72 h. Sin embargo, la variabilidad de los resultados se redujo cuando el sustrato se presentó en seco. Es decir que el secado en estufa y posterior molienda no debe ser descartado como procedimiento de rutina para la estimación de la digestibilidad de los ensilajes si se realiza la corrección por las pérdidas de sustancias volátiles ocurrida y se conoce la magnitud de la sobreestimación.

Sin embargo, cuando el interés del investigador es describir la cinética de digestión y no el punto final del proceso, el sustrato debería ser usado en fresco y molido con hielo seco, ya que el secado retrasa la PG del alimento incubado *in vitro* aumentando la fase *Lag*, disminuyendo las tasas de PG y provocando cambios en la composición de los AGV producidos. La molienda con hielo seco debe asegurar que más de 60% del alimento se encuentre en partículas de menos de 1.19 mm. En caso contrario la MSD, FDND, FDAD, tasas de PG y PGA hasta las 24 h serán menores cuando sea usado sustrato fresco.

Actualmente, es reconocido que las variables que describen la cinética de digestión de los alimentos se encuentran relacionadas con la estimación del consumo de materia seca aunque no existen ecuaciones de amplia difusión para forrajes ensilados. En tanto que la estimación de la DMS y EM a partir de las

variables que describen la cinética de digestión *in vitro* son aún más escasas y de menor capacidad predictiva que otras. En contraposición a esto último, en este trabajo se encontró que las variables relacionadas con la velocidad de PG (*i.e.* Tmax, μ 50 y T50) fueron más explicativas que la PGA a 72 h en las ecuaciones de estimación de la DMS y EM. La mejora en los resultados obtenidos en este trabajo respecto a los de la bibliografía probablemente se encuentre asociadas a la descripción de la cinética de PG alcanzada con el sustrato fresco.

La incubación *in vitro* de los RI fue usada por algunos autores para comparar alimentos de diferente contenido de carbohidratos fermentescibles, pero no como fuente de información para predecir la digestibilidad y densidad energética. La comparación de los RIA y RIDN permitió caracterizar los grupos de ensilajes estudiados, SL y SGgr, y detectar diferencias entre ellos respecto del diferente aporte de carbohidratos de rápida, media o lenta degradabilidad. Sin embargo, el cálculo de las curvas de substracción para describir la cinética de PG de las sustancias solubilizadas en cada lavado no resultó apropiado debido a las diferencias ocurridas en el patrón de fermentación de AGV de cada sustrato (*i.e.* C, RIA y RIDN). La relación entre MSD y PGA no fue constante debido a cambios en la contribución del gas directo e indirecto.

El estudio de correlación de las variables derivadas de la incubación *in vitro* para los sustratos C, RIA y RIDN fue de utilidad para identificar las fuentes de información más adecuadas para predecir DMS, DFDN y EM de los ensilajes. Las variables Lag, Tmax y TTmax de RIA mostraron una alta correlación con MSD; mientras que Lag y Ac/Pro de RIDN se correlacionaron negativamente. A diferencia de lo esperado, el efecto negativo de la menor capacidad de fermentación de RIDN resultó de menor impacto sobre la MSD del ensilaje que la tasa de PG del RIA.

Las ecuaciones disponibles en la bibliografía para estimar DMS, DMO, DFDN y EM de los forrajes ensilados no fueron desarrolladas en nuestro país y utilizan como fuente de información principal la composición de la pared celular. Hasta el momento no fueron difundidos trabajos locales que validen el uso de alguna de las mencionadas ecuaciones en las condiciones locales de producción de ensilajes. Según los resultados obtenidos, algunas de las ecuaciones para DMO se detectaron como promisorias para el uso local (*i.e.* $R^2_{aj} > 0.80$); aunque con la posterior transformación en EM el error de estimación aumentará. En trabajos futuros deberían ser puestas a prueba con un mayor número de ensilajes que permitan alcanzar un resultado concluyente. Cabe destacar que la Lig del ensilaje fue incluida como fuente de información con efecto negativo en todas las mencionadas ecuaciones. Por otro lado, ninguno de los modelos para predecir DMS y EM que fueron testeados resultaron adecuados (*i.e.* $R^2_{aj} \leq 0.50$) con las muestras de ensilaje utilizadas en el presente trabajo.

En las ecuaciones de predicción de DMS, DFDN y EM desarrolladas en este trabajo fueron indispensables las fracciones analíticas como ${}_a\text{FDN}_{mo}$, Lig/FDA y almidón. Sin embargo, otras variables derivadas de la PG fueron necesarias para reducir la magnitud de los errores de la predicción, reforzando el valor práctico de éste método. Por otro lado, las tasas de PG y los tiempos en que éstas ocurrieron (*i.e.* Tmax, μ_{50} y T50) fueron de mayor utilidad que las PGA; y tal como fue identificado en el estudio de correlación entre la MSD y las cinéticas de PG de los RI, éstos permitieron mejorar la precisión de las predicciones.

Las ecuaciones de predicción desarrolladas en este trabajo presentan un avance sobre las descritas en la bibliografía tanto por los niveles superiores de ajuste alcanzado como por la innovación respecto de las fuentes de información

utilizadas provenientes de la cinética de PG. En este sentido, resulta importante destacar que fue necesario el trabajo con sustrato fresco molido con hielo seco y con los residuos insolubles en agua y detergente neutro para mejorar los resultados reportados por otros autores. Futuras investigaciones serán necesarias para mejorar o validar las ecuaciones propuestas, así como también la experimentación *in vivo* que permita ampliar la base de datos de referencia disponible.

Bibliografía

- Adesogan, A. T. 2002. What are feeds worth?: A critical evaluation of selected nutritive methods. Pages 33-47 *in* Proceedings 13th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium. Pag. 33-47.
- Adesogan, A. T., E. Owen, y D. I. Givens. 1998. Prediction of the in vivo digestibility of whole crop wheat from in vitro digestibility, chemical composition, in situ rumen degradability, in vitro gas production and near infrared reflectance spectroscopy. *Anim. Feed Sci. Technol.* **74**:259-272.
- Aerts, J. V., D. L. D. Brabander, B. G. Cottyn, F. X. Buysse, y R. J. Moermans. 1974. Comparison of methods for dry matter determination of high moisture roughages and faeces. *J. Sci. Food Agric.* **25**:619-627.
- Alomar, D., R. Fuchslocher, y S. Stockebrand. 1999. Effects of oven- or freeze-drying on chemical composition and NIR spectra of pasture silage. *Anim. Feed Sci. Technol.* **80**:309-319.
- Anaya, D. 1995. Ensilado de pasturas: producción de inoculantes y efecto de aditivos nutritivos sobre las bacterias lácticas. Tesis de grado. Facultad de Agronomía - Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires. 45 p.
- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis (15th Ed.). Association of Official Analytical Chemists. Arlington, USA.
- AOAC. 2000. Official Methods of Analysis (17th Ed.). Association of Official Analytical Chemists. Washington, USA.
- Argillier, O., Y. Barrière, M. Lila, F. Jeanneteau, K. Gélinet, y V. Ménanteau. 1996. Genotypic variation in phenolic components of cell-walls in relation to the digestibility of maize stalks. *Agronomie* **16**:123-130.
- Ariza, P., A. Bach, M. D. Stern, y M. B. Hall. 2001. Effects of carbohydrates from citrus pulp and hominy feed on microbial fermentation in continuous culture. *J. Anim. Sci.* **79**:2713-2718.
- Ashbell, G., Z. G. Weinberg, Y. Hen, y I. Filya. 2002. The effects of temperature on the aerobic stability of wheat and corn silages. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **28**:261-263.
- Aufrère, J. 1982. Etude de la prevision de la digestibilité des fourrages par une methode enzymatique. *Ann. Zootech.* **31**:111-130.
- Bach, A., y S. Calsamiglia. 2006. La fibra en los rumiantes: ¿Química o física? Pages 99-113 *in* XXII Curso de especialización - FEDNA, Barcelona. http://produccionbovina.com/informacion_tecnica/manejo_de_alimento/100-fibra_en_rumiantes.pdf.
- Barnet, A. J. G. 1951. The colorimetric determination of lactic acid in silage. *Biochem. J.* **49**:527-529.
- Bernardos, M. 2008. Alteraciones de la composición química y la digestión in vitro de muestras de planta entera de maíz y sorgo sometidas a distintos métodos

- de secado. Tesis de grado. Dpto. Producción Animal, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires. 29 p.
- Beuvink, J. M. W. 1993. Measuring y modelling in vitro gas production kinetics to evaluate ruminal fermentation of feedstuffs. Institute for Animal Nutrition, Lelystad Netherlands. 94 p.
- Beuvink, J. M. W., y S. F. Spoelstra. 1992. Interactions between substrate, fermentation end-products, buffering systems and gas production upon fermentation of different carbohydrates by mixed rumen microorganisms in vitro. *Appl. Microbiol. Biochem.* **37**:505-509.
- Beuvink, J. M. W., y S. F. Spoelstra. 1994. In vitro gas production kinetics of grass silages treated with different cell-wall degrading enzymes. *Grass Forage Sci.* **49**:277-283.
- Blümmel, M., K. P. Aiple, R. Steinwender, y K. Becker. 1999. A note on the stoichiometrical relationship of chain fatty acid production and gas formation in vitro in feedstuffs of widely differing quality. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **81**:157-167.
- Blümmel, M., y K. Becker. 1997. The degradability characteristics of fifty-four roughages and roughage neutral-detergent fibres as described by in vitro gas production and their relationship to voluntary feed intake. *Br. J. Nutr.* **77**:757-768.
- Blümmel, M., y E. R. Ørskov. 1993. Comparison of in vitro gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* **40**:109-119.
- Bragachini, M., P. Cattani, M. Gallardo, y J. Peiretti. 2008. Forrajes conservados de alta calidad y aspectos relacionados al manejo nutricional. Manual Técnico Nro. 6. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Manfredi, Córdoba. 365 p.
- Brooks, A., y M. K. Theodorou. 1997. Manual for gas production technique. Institute of Grassland and Environmental Research (IGER), Aberystwyth, UK. 7 p.
- Brown, G. D., y J. C. Radcliffe. 1971. Prediction of in vivo dry matter, organic matter, and energy digestibilities of silage in in vitro digestion techniques. *Aust. J. Agric. Res.* **22**:787-796.
- CACF- Cámara Argentina de Contratistas Forrajeros. 2009. Jornada de maíz para silaje. *in.*
http://www.ensiladores.com.ar/tecnica/silo_argentina/CACF_Silo_Argentina.pdf.
- Calabrò, S., M. I. Cutrignelli, G. Piccolo, F. Bovera, F. Zicarelli, M. P. Gazaneo, y F. Infascelli. 2005. In vitro fermentation kinetics of fresh and dried silage. *Anim. Feed Sci. Technol.* **123-124**:129-137.
- Campos, F. P., A. A. Moares Sampaio, P. Figueiredo Vieira, M. L. Vieira Bose, y P. Sarmiento. 2002. Ruminal parameters analyzed in remaining digestion residue of roughages in the in vitro / gas system. *Scientia Agricola* **59**:573-579.
- Caramella, L. E., M. Wawrzkievicz, y G. Jaurena. 2006. Desaparición de sustrato de alfalfa in vitro con un sistema tampón alternativo e impacto de la preparación

de la muestra. Pages 68-69 *in* 29 Congreso Argentino de Producción Animal. AAPA, Mar del Plata - Buenos Aires - Argentina.

- Cone, J. W., A. H. Van Gelder, y F. Driehuis. 1997. Description of gas production profiles with a three-phasic model. *Anim. Feed Sci. Technol.* **66**:31-45.
- Chamberlain, D. G., y J.-J. Choung. 1995. The importance of rate of ruminal fermentation of energy sources in diets for dairy cows. Pages 1-27 *in* G. C. Garnsworthy y D. J. A. Cole, editors. *Recent Advances in Animal Nutrition*. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- Chenost, M., J. Aufrère, y D. Macheboeuf. 2001. The gas-test technique as a tool for predicting the energetic value of forage plants. *Anim. Res.* **50**:349-364.
- Chesson, A., y C. W. Forsberg. 1988. Polysaccharide degradation by rumen microorganisms. Pages 251-284 *in* P. N. Hobson, editor. *The rumen microbial ecosystem*. Elsevier Applied Science, London y New York.
- Damiran, D., T. DelCurto, D. W. Bohnert, y S. L. Findholt. 2008. Comparison of techniques and grinding size to estimate digestibility of forage based ruminant diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* **141**:15-35.
- Danley, M. M., y R. L. Vetter. 1971. Changes in carbohydrate and nitrogen fractions and digestibility of forages: Method of sample processing *J. Anim. Sci.* **33**:1072-1077.
- De Boever, J. L., J. M. Aerts, J. M. Vanacker, y D. L. De Brabander. 2005. Evaluation of the nutritive value of maize silages using a gas production technique. *Anim. Feed Sci. Technol.* **123-124**:255-265.
- De Boever, J. L., B. G. Cottyn, F. X. Buyse, F. W. Wainman, y J. M. Vanacker. 1986. The use of an enzymatic technique to predict digestibility, metabolizable and net energy of compound feedstuffs for ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* **14**:203-214.
- De Boever, J. L., B. G. Cottyn, D. L. De Brabander, J. N. Vanacker, y C. V. Boucqué. 1996. Prediction of the feeding value of grass silages by chemical parameters, *in vitro* digestibility and near-infrared reflectance spectroscopy. *Anim. Feed Sci. Technol.* **60**:103-115.
- Deville, E. R., y D. I. Givens. 1998. Investigation of direct gas production from silage fermentation acids. Pages 64 *in* P. B. S. A. Science, editor. *Annual Meeting*, Scarborough.
- Deinum, B. 1988. Genetic y environmental variation in quality of forage maize in Europe. *Neth. J. Agric. Sci.* **36**:400-403.
- Deinum, B., y A. Maassen. 1993. Effects of drying temperature on chemical composition and *in vitro* digestibility of forages. *Anim. Feed Sci. Technol.* **46**:75-86.
- Dewhurst, R. J., A. J. F. Webster, F. W. Wainman, y P. J. S. Dewey. 1986. Prediction of the true metabolizable energy concentration in forages for ruminants. *Anim. Prod.* **43**:183-194.
- Doane, P. H., A. N. Pell, y P. Schofield. 1997a. The effect of preservation method on the neutral detergent soluble fraction of forages. *J. Anim. Sci.* **75**:1140-1148.

- Doane, P. H., A. N. Pell, y P. Schofield. 1997b. Ensiling effects on the ethanol fractionation of forages using gas production. *J. Anim. Sci.* **76**:888-895.
- Doane, P. H., A. N. Pell, y P. Schofield. 1998. Ensiling effects on the ethanol fractionation of forages using gas production. *J. Anim. Sci.* **76**:888-895.
- Doane, P. H., P. Schofield, y A. N. Pell. 1997c. Neutral detergent fiber disappearance and gas and volatile fatty acid production during the in vitro fermentation of six forages. *J. Anim. Sci.* **75**:3342-3352.
- Driehuis, F., S. J. W. H. Oude Elferink, y P. G. Van Wikselaar. 2001. Fermentation characteristics and aerobic stability of grass silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria. *Grass Forage Sci.* **56**:330-343.
- Dumont, J. C. L., R. G. Anrique, y D. C. Alomar. 2005. Efecto de dos sistemas de determinación de materia seca en la composición química y calidad del ensilaje directo de avena en diferentes estados fenológicos. *Agric. Tec.* **65**:388-396.
- Feasenhiser, D. 2005. The effect of organic selenium on rumen volatile fatty acid production in continuous culture. *Cantaurus* **13**:10-13.
- Fernández, I., P. Nozière, y B. Michalet-Doreau. 2004. Site y extent of starch digestion of whole-plant maize silages differing in maturity stage and chop length, in dairy cows. *Livest. Prod. Sci.* **89**:147-157.
- Ferreira, G., y D. R. Mertens. 2005. Chemical y physical characteristics of corn silages and their effects on in vitro disappearance. *J. Dairy Sci.* **88**:4414-4425.
- Ferret, A., J. Gasa, J. Plaixat, F. Casañas, L. Bosch, y F. Nuez. 1997. Prediction of voluntary intake and digestibility of maize silages given to sheep from morphological and chemical composition, in vitro digestibility or rumen degradation characteristics. *Anim. Sci.* **64**:493-501.
- Filya, I. 2004. Nutritive value y aerobic stability of whole crop maize silage harvested at four stages of maturity. *Anim. Feed Sci. Technol.* **116**:141-150.
- Flores, G., P. Castro, y A. González-Arráez. 2003. Predicción de la digestibilidad in vitro de la materia orgánica de ensilajes de hierba y maíz por métodos de laboratorio. Pages 111-132 in FEDNA, editor. XIX Curso de especialización FEDNA, Madrid.
- Fonseca, A. J. M., A. A. Dias-da-Silva, y E. R. Ørskov. 1998. In sacco degradation characteristics as predictors of digestibility and voluntary intake of roughages by mature ewes. *Anim. Feed Sci. Technol.* **72**:205-219.
- Fox, D. G., y C. L. Fenderson. 1978. Influence of NPN treatment, oven temperature and drying time on error in determining true corn silage dry matter. *J. Anim. Sci.* **47**:1152-1156.
- France, J., M. S. Dhanoa, M. K. Theodorou, S. J. Lister, D. R. Davies, y D. Isaac. 1993. A model to interpret gas accumulation profiles associated with in vitro degradation of ruminant feeds. *J. Theor. Biol.* **163**:99-111.
- Friggens, N. C., J. D. Oldham, R. J. Dewhurst, y G. Horgan. 1998. Proportions of volatile fatty acids in relation to the chemical composition of feeds based on grass silage. *J. Dairy Sci.* **81**:1331-1344.

- Gaggiotti, M. C., L. A. Romero, O. A. Bruno, C. E.A., y O. R. Quaino. 1996. Tabla de composición química de los alimentos. INTA. Centro Regional Santa Fe. EEA Rafaela. Editorial Perfil. 66 p.
- Garcia-Rodriguez, A., N. Mandaluniz, G. SLores, y L. M. Oregui. 2005. A gas production technique as a tool to predict organic matter digestibility of grass and maize silage. *Anim. Feed Sci. Tech.* **123-124**:267-276.
- Givens, D. I. 1986. New methods for predicting the nutritive value of silage. Pages 66-75 *in* B. Stark y M. Wilkinson, editors. *Developments in silage*. Chalcombe Publications.
- Givens, D. I., B. G. Cottyn, P. J. S. Dewey, y A. Steg. 1995. A comparison of the neutral detergent-cellulase method with other laboratory methods for predicting the digestibility in vivo of maize silages from three European countries. *Anim. Feed Sci. Technol.* **54**:55-64.
- Givens, D. I., J. M. Everington, y A. H. Adamdon. 1989. The digestibility and metabolizable energy content of grass silage y their prediction from laboratory measurements. *Anim. Feed Sci. Technol.* **24**:27-43.
- Givens, D. I., A. R. Moss, y A. H. Adamdon. 1993. Prediction of the digestibility and energy value of grass silage conserved in big bales. *Anim. Feed Sci. Technol.* **41**:297-312.
- Goering, H. K., y P. J. Van Soest. 1970. Forage fiber analyses (Apparatus, reagents, procedures and some applications). *in* U. ARS, editor. *Agricultural Handbook No. 379*, Washington, DC, USA. 20 p.
- Gosselink, J. M. J., J. P. Dulphy, C. Poncet, M. Jailler, S. Tamminga, y J. W. Cone. 2004. Prediction of forage digestibility in ruminants using in situ and in vitro techniques. *Anim. Feed Sci. Technol.* **115**:227-246.
- Grabber, J. H., D. Mertens, H. Kim, C. Funk, F. Lu, y J. Ralph. 2009. Cell wall fermentation kinetics are impacted more by lignin content and ferulate cross-linking than lignin composition. *J. Sci. Food Agric.* **89**:122-129.
- Guaita, M. S., y H. H. Fernández. 2005. Tablas de composición química de alimentos para rumiantes. Centro Regional Buenos Aires Sur - Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, Balcarce - Buenos Aires. 60 p.
- Hall, M. B., B. A. Lewis, P. J. Van Soest, y L. E. Chase. 1999. A simple method for estimation of neutral detergent-soluble fiber. *J. Sci. Food Agric.* **74**:441-449.
- Hall, M. B., A. N. Pell, y L. E. Chase. 1998. Characteristics of neutral detergent soluble-fiber fermentation by mixed ruminal microbes. *Anim. Feed Sci. Technol.* **70**:23-39.
- Hatfield, R. D., y P. J. Weimer. 2006. Degradation characteristics of isolated and in situ cell wall lucerne pectic polysaccharides by mixed ruminal microbes. *J. Sci. Food Agric.* **69**:185-196.
- Hill, J., G. Q. Xiao, y A. S. Ball. 2001. Effect of inoculation of herbage prior to ensiling with *Streptomyces achomogenes* ISP 5028 on chemical composition of silage. *Anim. Feed Sci. Technol.* **89**:83-96.
- Hoffman, P. C., K. M. Lundberg, L. M. Bauman, y R. D. Shaver. 2003. In vitro NDF digestibility of forages: The 30 vs 48 hr, debate. Pages 6 *in* *Extension Focus*

- on Forage Series. Univ. of Wisconsin, Madison. <http://www.uwex.edu/ces/crop/uwforage/30vs48-FOF.htm>.
- Huhtanen, P., J. I. Nousiainen, H. Khalili, S. Jaakkola, y T. Heikkilä. 2003. Relationship between silage fermentation characteristics and milk production parameters: analyses of literature data. *Livest. Prod. Sci.* **81**:57-73.
- Huntington, G. B. 1997. Starch utilization by ruminants: from basics to the bunk. *J. Anim Sci.* **75**:852-867.
- Jaurena, G. 1996. Análisis de la contribución de los granos como aditivos para ensilajes de alfalfa. Proteólisis ruminal. MSc. Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago de Chile. 71p.
- Jaurena, G. 1998. Efecto de la acidez de los silajes sobre la producción de gas in vitro. *in XXII Congreso Argentino de Producción Animal*, . Río Cuarto, Córdoba. 18: 89-90.
- Jaurena, G., y J. L. Danelón. 2006. Tabla de composición de alimentos para ruminantes de la región pampeana Argentina, 1a ed. edition. Hemisferio Sur, Buenos Aires. 61p.
- Jaurena, G., D. Fiedler, y J. L. Danelón. 1997. Efecto del secado del forraje sobre la producción de gas y de los ácidos grasos volátiles con licor ruminal in vitro. *Rev. Arg. Prod. Anim.* **17 (supl. 1)**:36-37.
- Jaurena, G., y G. Pichard. 2001. Contribution of storage and structural polysaccharides to the fermentation process and nutritive value of alfalfa ensiled alone or mixed with cereal grains. *Anim. Feed Sci. Technol.* **92**:159-173.
- Jaurena, G., y M. Wawrzkievicz 2009. Guía de procedimientos analíticos. Programa para el mejoramiento de la evaluación de forrajes y alimentos. Centro de Investigación y Servicios en Nutrición Animal, Buenos Aires, Argentina. 37p.
- Johnson, L., J. Harrison, D. Davidson, W. Mahanna, y K. Shinnars. 2003. Corn silage management: effects of hybrid, maturity, inoculation, and mechanical processing on fermentation characteristics. *J. Dairy Sci.* **86**:287-308.
- Jones, G. M., R. E. Larsen, y N. M. Lanning. 1980. Prediction of silage digestibility and intake by chemical analyses or in vitro fermentation techniques. *J. Dairy Sci.* **63**:579-586.
- Jung, H. G., y M. S. Allen. 1995. Characteristics of plant cell walls affecting intake and digestibility of forages by ruminants. *J. Anim. Sci.* **73**:2774-2790.
- Jung, H. G., y F. M. Engels. 2002. Alfalfa stem tissues: cell wall deposition, composition, and degradability. *Crop Sci.* **45**:542-534.
- Kamalak, A., Ö. Canbolat, Y. Gürbüz, y O. Özay. 2005. Prediction of dry matter intake and dry matter digestibilities of some forages using the gas production technique in sheep. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* **29**:517-523.
- Kamalak, A., A. Erol, Y. Gurbuz, O. Ozay, O. Canbolat, y R. Tumer. 2003. Evaluation of dry matter yield, chemical composition and in vitro dry matter digestibility of silage from different maize hybrids. *Livest. Res. Rural Develop.* **15 (11)** <http://www.lrrd.org/lrrd15/11/kama1511.htm>.

- Kasuya, N., Q. Xu, Y. Kobayashi, K. Fukuda, O. Enishi, K. Iiyama, y H. Itabashi. 2008. Cell wall degradation of tropical and temperate forage grasses measured by nylon bag y in vitro digestion techniques. *Anim. Sci. J.* **79**:200-209.
- Khorvash, M., D. Colonbatto, K. A. Beauchemin, G. R. Ghorbani, y A. Samei. 2006. Use of absorbants and inoculant to enhance the quality of corn silage. *Can. J. Anim. Sci.* **86**:97-107.
- Lam, T. B. T., K. Iiyama, y B. A. Stone. 2003. Hot alkali-labile linkages in the wall of the forage grass *Phalaris aquatica* and *Lolium perenne* and their relation to in vitro wall digestibility. *Phytochem.* **64**:603-607.
- Lowman, R. S., A. E. Brooks, M. K. Theodorou, M. S. Dhanoa, y D. Cubbedford. 1998. The effect of head-space pressure on gas production profiles. Pages 205 *in* In vitro techniques for measuring nutrient supply to ruminants. *Br. Soc. of An. Sci. Occasional Publication No. 22*, Reading.
- Lowman, R. S., M. K. Theodorou, y D. Cuddeford. 2002. The effect of sample processing on gas production profiles obtained using the pressure transducer technique. *Anim. Feed Sci. Technol.* **97**:221-237.
- Lynd, L. R., P. J. Weimer, W. H. van Zyl, y I. S. Pretorius. 2002. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**:506-577.
- Marounek, M., S. Bartos, y P. Brezina. 1985. Factors inSLuencing the production of volatile fatty acids from hemicellulose, pectin and starch by mixed culture of rumen microorganisms. *Z. Tierphysiol. Tierernahr. Futtermittelkd.* **53**:50-58.
- Marten, G. C., R. D. Goodrich, A. R. Schmid, J. C. Meiske, R. M. Jordan, y J. Linn, G. 1975. Evaluation of laboratory methods for determining quality of corn and sorghum silages: II. Chemical methods for predicting in vivo digetibility. *Agron. J.* **67**:243-276.
- McDonald, P., N. Henderson, y S. Heron. 1991a. *The Biochemistry of Silage*. Chalcombe Publisher, Marlow, Great Britain. 340p.
- McDonald, P., N. Henderson, y A. W. Mac Gregor. 1991b. Chemical changes and losses during the ensilage of wilted grass. *J. Sci. Food Agric.* **19**:125-132.
- McLeod, M. N., y D. J. Minson. 1976. The analytical and biological accuracy of estimating the dry mater digestibility of different legume species. *Anim. Feed Sci. Technol.* **1**:61-72.
- Menke, K. H., L. Raab, A. Salewski, H. Steingass, D. Fritz, y W. Schneider. 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas productio when they are incubated with rumen liquor in vitro. *J. Agric. Sci.* **93**:217-222.
- Menke, K. H., y H. Steingass. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Dev.* **28**:209-221.
- Mertens, D. R. 1996. Methods in modelling feeding behaviour and intake in herbivores. *in* IV Int. Symp. Nutr. Herbivores. Inst. Natl. Agron., Paris-Grignon (France). *Ann. Zootech.* 45 (1):153-164.

- Mertens, D. R. 2000. Interpretation of forage analysis reports. *in* National Alfalfa Symposium, 30th. California Alfalfa Symposium, Las Vegas, NV.
- Minson, D. J. 1982. Effects of chemical and physical composition of herbage eaten upon intake. Pages 167-182 *in* J. B. Hacker, editor. Nutritional Limits to animal production from pastures. CSIRO Division of Tropical Crops and Pastures, Farnham Royal (UK).
- Minson, D. J., y R. J. Lancaster. 1963. The effect of oven temperature on the error of estimating the dry matter content of silage. *New Zealand J. Agric. Res.* **6**:140.
- Minson, D. J., y M. N. McLeod. 1972. The *in vitro* technique: Its modification for estimating digestibility of large numbers of tropical pasture samples. In Division of Tropical pastures technical paper No. 8. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization. Australia. 1-15.
- Miron, J., D. Ben-Ghedalia, y M. Morrison. 2001. Invited review: Adhesion mechanism of rumen cellulolytic bacteria. *J. Dairy Sci.* **84**:1294-1309.
- Moss, A. R., y D. I. Givens. 1994. The chemical composition, digestibility, metabolisable energy content and nitrogen degradability of some protein concentrates. *Anim. Feed Sci. Technol.* **47**:335-351.
- Moss, A. R., D. I. Givens, y R. H. Phipps. 1992. Digestibility and Energy Value of Combinations of Forage Mixtures. *Anim. Feed Sci. Technol.* **39**:151-172.
- Mould, F. L., T. Smith, E. Owen, y R. H. Phipps. 1999. The relationship between DOMD and gas release estimated *in vitro* using the reading pressure technique system for four maize silage of different maturity. *Proc. Br. Society An. Sci.* p. 150.
- Muck, R. E. 1988. Factors influencing silage quality and their implications for management. *J. Dairy Sci.* **71**:2992-3002.
- Nadeau, E. M. G., D. R. Buxton, E. Lindgren, y P. Lingvall. 1996. Kinetics of cell-wall digestion of orchardgrass and alfalfa silages treated with cellulase and formic acid. *J. Dairy Sci.* **79**:2207-2216.
- Nataraja, M. B., U. Krishnamoorthy, y P. Krishnappa. 1998. Assessment of rumen *in vitro* incubation (gas production) technique and chemical analyses by detergent system to predict metabolizable energy content in mixed diets of lactating cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* **74**:169-177.
- NFTA. 2006. Forage analysis procedures. Appendix A - Calculated values. *in* National Forage Testing Association - http://www.foragetesting.org/lab_procedure/appendixa.html.
- NFTA. 2008. Forage Analysis Procedures. National Forage Testing Association. p. 112.
- Niwińska, B. 2009. Effect of carbohydrates in grass silage-based diets on *in sacco* ruminal degradability of barley (*Hordeum vulgare* L. cv. Lomerit) grain ground to different particle sizes. *Czech. J. Anim. Sci.* **54**:260-269.
- Nousiainen, J., M. Rinne, M. Hellämäki, y P. Huhtanen. 2003. Prediction of the digestibility of the primary growth of grass silages harvested at different stages of maturity from chemical composition and pepsin-cellulase solubility. *Anim. Feed Sci. Technol.* **103**:97-111.

- NRC. 1985. Nutrient Requirements of Sheep, Sixth Revised Edition edition, Washington, D.C. 99p.
- NRC. 2001. National Research Council. Nutrient Requirements of Dairy Cattle, 7th Rev. edition. National Academy Press, Washington, DC, 381 p.
- Nsahlai, I. V., D. E. K. A. Siaw, y P. O. Osaji. 1994. The relationship between gas production y chemical composition 23 Browses of the Genus Sesbania. *J. Sci. Food Agric.* **65**:13-20.
- Oba, M., y M. S. Allen. 1999. Effects of brown midrib 3 mutation in corn silage on dry matter intake and productivity of high yielding dairy cows. *J. Dairy Sci.* **82**:135-142.
- Ørskov, E. R. 1986. Starch digestion and utilization in ruminants. *J. Anim. Sci.* **63**:1624-1633.
- Ørskov, E. R., y I. McDonald. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighed accordign to rate of passage. *J. Agric. Sci.* **92**:499-503.
- Owens, F. N., R. A. Zinn, y Y. K. Kim. 1986. Limits to starch digestion in the ruminant small intestine. *J. Anim. Sci.* **63**:1634-1648.
- Pell, A. N., y P. Schofield. 1993. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion in vitro. *J. Dairy Sci.* **76**:1063-1073.
- Piwonka, E. J., y J. L. Firkins. 1996. Effect of glucose fermentation on fiber digestion by ruminal microorganisms in vitro. *J. Dairy Sci.* **79**:2196-2206.
- Playne, M. J., y P. McDonald. 1966. The buffering constituents of herbage and of silage. *J. Sci. Food Agric.* **17**:264-268.
- Porter, M. G., D. C. Patterson, R. W. Steen , y F. J. Gordon. 1984. Determination of dry matter and gross energy of grass silage. Proceedings of the 7th silage conference, The Queen's University, Belfast. Paper 45.
- Pozzo, L. A. 1999. Confección de silajes de maíz y sorgo granífero. *in*. http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_y_manejo_reservas/reservas_silos/37-silajes_confeccion.htm.
- Ribeiro, J. M. C. R., y O. M. S. C. Moreira. 2000. Comments on feed evaluation methods used in the project. Pages 79-91 *in* CIHEAM - Options Mediterraneennes. Estação Zootécnica Nacional, Instituto Nacional de Investigação Agraria (INIA), Vale de Santarém, Portugal.
- Riboulet, C., B. Lefèvre, D. Dénoue, y Y. Barrière. 2008. Genetic variation in maize cell wall for lignin content, lignin structure, p-hydroxycinnamic acid content, and digestibility in set of 19 lines at silage harvest maturity. *Maydica* **53**:11-19.
- Rinne, M., A. Olt, J. Nousiainen, A. Seppälä, M. Tuori, C. Paul, M. D. Fraser, y P. Huhtanen. 2006. Prediction of legume silage digestibility from various laboratory methods. *Grass Forage Sci.* **61**:354-362.
- Ruppel, K. A., R. E. Pitt, L. E. Chase, y D. M. Galton. 1995. Bunker silo management and its relationship to forage preservation on dairy farms. *J. Dairy Sci.* **78**:141-153.

- Russell, J., J. D. O'Connor, D. G. Fox, P. J. Van Soest, y C. J. Sniffen. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. 1. Ruminal fermentation. *J. Anim. Sci.* **70**:3551-3561.
- Russell, J. B., y D. B. Dombrowski. 1980. Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. *Appl. Env. Microbiol.* **39**:604-610.
- Rymer, C. 2000. The measurement of forage digestibility in vivo. Pages 113-134 *in* D. I. Givens, E. Owen, R. E. F. Axford, y H. M. Omed, editors. Forage evaluation in animal nutrition. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Rymer, C., A. R. Moss, E. R. Deaville, y D. I. Givens. 1998. Factors affecting the amount of indirect gas produced by the in vitro gas production technique. Pages 89 *in* In vitro techniques for measuring nutrient supply to ruminants. Br. Soc. Anim. Sci. Occasional Publication No. 22, Reading.
- Sánchez, D. E., L. C. Arreaza, y B. Abadía. 2005. Estudio de la cinética de degradación in vitro de cuatro forrajes tropicales y una leguminosa de clima templado. *Corpoica* **6**:58-68.
- Sanderson, R., S. Lister, y M. S. Dhanoa. 1997. Effect the particle size on in vitro fermentation of silage differing in dry matter content. Pages 197 *in* B. S. A. S. editor. Proc. Br. Soc. Anim. Sci., Scarborough.
- Sawai, A., T. Kondô, y S. Ara. 1983. Inhibitory effects of phenolic acids esteres on degradability of forage fiber. *J. Japan. Grassl.* **29**:175-179.
- Schmidt, A. R., R. D. Goodrich, R. M. Jordon, G. C. Marten, y J. C. M. . 1976. Relationships among agronomic characteristics of corn and sorghum cultivars and silage quality. *Agron. J.* **68**:403-406.
- Schneider, B. H., y W. P. Flatt. 1975. The evaluation of feeds through digestibility experiments, Ed. by The University of Georgia Press, Athens, G.A. 423p.
- Schofield, P. 2000. Gas production methods. Pages 209-232 *in* J. P. F. D'Mello, editor. Farm animal metabolism and nutrition. Cab International, Wallingford.
- Schofield, P., y A. N. Pell. 1995a. Measurement and kinetic analysis of the neutral detergent-soluble carbohydrate fraction of legumes and grasses. *J. Anim. Sci.* **73**:3455-3463.
- Schofield, P., y A. N. Pell. 1995b. Validity of using accumulated gas pressure readings to measure forage digestion in vitro: A comparison involving three forages. *J. Anim. Sci.* **78**:2230-2238.
- Shaver, R. D. 2004. Forage quality variation. Pages 1-13 *in* Mid-South Ruminant Nutrition Conference.
- Sijnienski, A., G. Jaurena, M. Wawrzkiwicz, J. L. Danelón, M. Gallardo, y M. Gaggiotti. 2005. Impacto de la acidez ruminal sobre la digestion in vitro de alfalfa (*Medicago sativa* L.) fresca y silaje de maiz. *Rev. Arg. Prod. Anim.* **25**:8-9.
- Sniffen, C. J., J. D. O'Connor, P. J. Van Soest, D. G. Fox, y J. B. Russell. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *J. Anim. Sci.* **70**:3562-3577.

- Stekar, J. M. A., V. Stibilj, A. Golob, y M. Kodra. 1991. Quality and nutritive value of maize silage prepared from different hybrids. *Options Méditerranéennes* **16**:137-139.
- Stern, M. D., A. Bach, y S. Calsamiglia. 1997. Alternative techniques for measuring nutrient digestion in ruminants. *J. Anim. Sci.* **75**:2256-2276.
- Sullivan, J. T. 1966. Studies of the hemicelluloses of forage plants. *J. Anim. Sci.* **25**:83-86.
- Taghizadeh, A., M. Hatami, G. A. Moghadam, y A. M. Tahmasbi. 2006. Relationship between in vitro gas production and dry matter degradation of treated corn silage by urea and formaldehyde. *J. Anim. Vet. Adv.* **5**:1193-1198.
- Tandecarz, M. 2007. Impacto del contenido de grano del silaje de maíz sobre la digestión in vitro de la alfalfa y del silaje de maíz frescos. Tesis de grado. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires. 51p.
- Taverna, M. A. 1997. La calidad como factor de competitividad. *Rev. Arg. Prod. Anim.* **17**:203-208.
- Theodorou, M. K. 1993. A new laboratory procedure for determining the fermentation kinetics of ruminants feeds. *Cien. Inv. Agr.* **20**:332-344.
- Theodorou, M. K., B. G. Lowman, D. R. Davies, D. Cuddeford, y E. Owen. 1998. Principles of techniques that rely on gas measurement in ruminant nutrition. Pages 55-63 *in* In vitro techniques for measuring nutrient supply to ruminants, Br. Soc. Anim. Sci. Occasional Publication No. 22, Reading.
- Theodorou, M. K., B. A. Williams, M. S. Dhanoa, A. B. McAllan, y J. France. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* **48**:185-198.
- Theurer, C. B. 1986. Grain processing effects on starch utilization by ruminants. *J. Anim. Sci.* **63**:1649-1662.
- Tilley, J. N. A., y R. A. Terry. 1963. A two stage technique for in vitro dogestion of forage crops. *J. Br. Grassl. Soc.* **18**:104-111.
- Titgemeyer, E. C., L. D. Bourquin, y G. C. J. Fahey. 1992. Dissappearance of cell wall monometric componentes from fracciones chemically isolated from alfalfa leaves and stems following in-situ ruminal dogestion. *J. Sci. Food Agric.* **58**:451-463.
- Undersander, D., D. R. Mertens, y N. Thiex. 1993. Forage Analysis Procedures. *in*. National Forage Testing Association - http://www.foragetesting.org/index.php?page=lab_procedures.
- Valentin, S. F., P. E. V. Williams, J. M. Forbes, y D. Sauvant. 1999. Comparison of the in vitro gas production technique and the nylon bag degradability technique to measure short- and long-term processes of degradation of maize silage in dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* **78**:81-99.
- Van Soest, P. J. 1963. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *J. Ass. Offic. Anal. Chem.* **46**:829-835.

- Van Soest, P. J. 1994. Nutritional ecology of the ruminant, 2nd edition. Comstock Publishing Associates, Cornell University Press, Ithaca and London. 476 p.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, y B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* **74**:3583-3597.
- Wawrzkiwicz , M., y J. L. Danelon. 2004. Mejoramiento de la técnica de producción de gas in vitro para evaluar alimentos para rumiantes. *Rev. Arg. Prod. Anim.* **24**:187-197.
- Weiss, W. P. 1994. Estimation of digestibility of forages by laboratory methods. Pages 644 *in* G. C. J. Fahey, editor. Forage quality, evaluation and utilization. Am. Soc. Agron., Madison, WI.
- Weiss, W. P. 1998. Estimating the available energy content of feeds for dairy cattle. *J. Dairy Sci.* **81**:830-839.
- Whittenbury, R., P. McDonald, y D. G. Bryan-Jones. 1967. A short review of some biochemical and microbiological aspects of ensilage. *J. Sci. Food Agric.* **18**:441-444.
- Williams, B. A. 2000. Cumulative gas-production techniques for forage evaluation. Pages 475 p *in* D. I. Givens, E. Owen, H. M. Omed, y R. E. F. Axford, editors. Forage evaluation in ruminant nutrition. CAB International, Wallingford (UK).
- Williams, B. A., A. J. Oostdam, J. C. J. Groot, H. Boer, y S. Tamminga. 2000. Effects of ageing on the in vitro fermentation of cell walls and cell contents of entire, fractionated and composite leaves of Italian ryegrass. *J. Sci. Food Agric.* **80**:484-490.
- Wolf, D. R., J. G. Coors, K. A. Albrecht, D. J. Undersander, y P. R. Carter. 1993. Forage quality of maize genotypes selected for extreme fiber concentrations. *Crop Sci.* **33**:1353-1359.
- Xiccato, G., M. Cinetto, A. Carazzolo, y M. E. Cossu. 1994. The effect of silo type y dry matter content on the maize silage fermentation process y ensiling loss. *Anim. Feed Sci. Technol.* **49**:313-323.
- Yan, T., y R. E. Agnew. 2004a. Prediction of metabolisable energy concentrations from nutrient digestibility and chemical composition in grass silages offered to sheep at maintenance. *Anim. Feed Sci. Technol.* **117**:197-213.
- Yan, T., y R. E. Agnew. 2004b. Prediction of nutritive values in grass silages: I. Nutrient digestibility and energy concentrations using nutrient compositions y fermentation characteristics. *J. Anim. Sci.* **82**:1367-1379.
- Yemm, E. W., y A. J. Willis. 1954. The estimation of carbohydrates in plants extracts by Antrone. *Biochem. J.* **57**:508-514.

