



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

TESIS DE DOCTORADO EN AGRONOMÍA

**Efecto del ambiente ruminal y la fuente de fibra sobre la dinámica de desaparición de la materia orgánica y sus componentes en bovinos en confinamiento.**

Lic. en Química Daniela Alejandra Ortiz

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

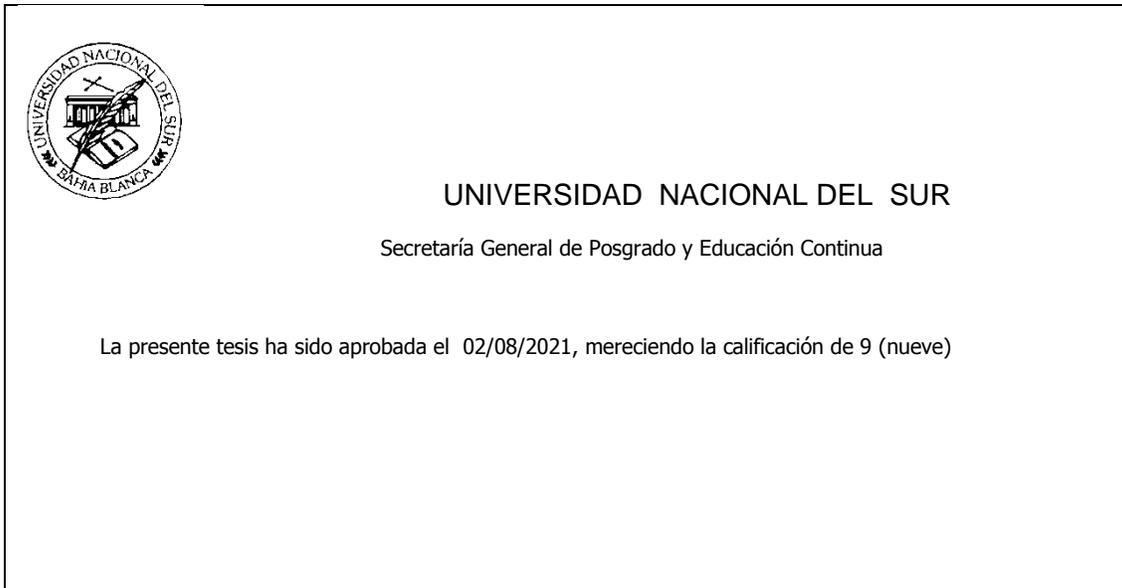
2021

## **PREFACIO**

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Agronomía, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo las instalaciones de la EEA Anguil La Pampa y en el ámbito del Departamento de Agronomía durante el período comprendido entre el 16 de Diciembre del 2016 y el 2 de agosto del 2021, bajo la dirección del Dr. Aníbal J. Pordomingo, INTA y Co-dirección del Dr. Roberto A. Distel.

(En el caso de Directores de otras instituciones, se agregará a continuación la Institución a la que pertenecieran)

EEA- INTA Anguil, La Pampa



**Certifico que fueron incluidos los cambios y correcciones sugeridas por los jurados.**



**Firma del Director**

## **AGRADECIMIENTOS**

---

*Deseo expresar mi agradecimiento a Nestor Juan, mi director de carrera, por su dedicación, confianza y apoyo durante la realización de esta tesis.*

*A Anibal Pordomingo y Roberto Distel, director y co-director de tesis, por la dedicación y enseñanzas.*

*A INTA por las becas otorgadas para la realización del pos-grado y al Depto. Agronomía-UNS.*

*A todos los integrantes del Laboratorio de Calidad de forrajes y Alimentos de la EEA INTA Anguil por su contribución a esta Tesis y fundamentalmente a mi familia.*

## RESUMEN

---

Se evaluó la degradabilidad de la fracción fibrosa de diferentes forrajes en ambientes ruminales con presencia creciente de grano y el efecto del agregado de bicarbonato de sodio como buffer ruminal. Para ello se plantearon dos experimentos. En el Experimento 1 se evaluó la degradabilidad de las fracciones fibrosas (tallo + hoja, sin grano) de ensilajes de maíz (SPM), de sorgo granífero (SSG) y de sorgo forrajero (SSF), forraje de pasto llorón (PLL) y celulosa (CEL), en ambientes ruminales generados por la incorporación de: 0, 30 y 60 % de grano de maíz (GM) en la dieta (0GM, 30GM y 60GM, respectivamente). Se utilizaron tres vacas con fístula ruminal, en un diseño Cuadrado Latino 3 x 3. En el Experimento 2 se evaluó la degradabilidad de las fracciones fibrosas (sin grano) de plantas de maíz (PM), sorgo granífero (PSG) y sorgo forrajero (PSF), forraje de pasto llorón (PLL) y celulosa pureza 98% (CEL), en cuatro ambientes ruminales resultantes de la combinación de dos niveles de grano de maíz y dos niveles de bicarbonato de sodio (BS) (0GM; 0GM+BS; 60GM; 60GM+BS). Se utilizaron cuatro vacas con fístula ruminal en un diseño Cuadrado Latino 4 x 4. En ambos experimentos se caracterizaron los ambientes ruminales mediante la determinación del pH ruminal y el contenido de amoníaco (N-NH<sub>3</sub>). Se determinó *in situ* la degradabilidad de la MS (DgMS) de los distintos materiales fibrosos. Los contenidos de fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA) y proteína bruta (PB) en los materiales evaluados antes y después de su degradación ruminal se determinaron utilizando técnicas convencionales de química húmeda y tecnología NIRS con calibraciones desarrolladas para tal fin. En el Experimento 1, el efecto de la adición de GM a la dieta provocó la disminución del pH y del N-NH<sub>3</sub> ruminal en relación inversa a la proporción de grano en la dieta. La inclusión de grano de maíz en la dieta provocó una disminución de DgMS. La degradabilidad de las fracciones de FDN y FDA se vería afectada negativamente con la adición de GM. Dietas 0GM favorecen un ambiente ruminal capaz de aprovechar la degradación de carbohidratos estructurales, lo cual se traduciría en una mayor DFDN y DFDA, en contraste con lo que sucedería con dietas 60GM. El aprovechamiento de carbohidratos estructurales (Celulosa y hemicelulosa, principalmente) de las fracciones fibrosas

provenientes de ensilajes de maíz y sorgo (sin grano) sería siempre mayor que en aquellas provenientes de pasto llorón. Cuando la celulosa se presentó totalmente disponible para su degradación (CEL) no se vió afectada por inclusiones del 30% de GM a la dieta, mientras que el agregado del 60% de GM sí afectó la degradación del polisacárido, en especial en el horario de las 48 horas de incubación. En el caso de los materiales fibrosos evaluados la estructura de la pared celular afecta el comportamiento de la degradación de la celulosa inserta en matrices más complejas. Un mayor contenido de celulosa lignificada de difícil degradación se podría presentar en PLL, comparada con la celulosa que podría encontrarse en SPM, SSG y SSF o totalmente disponible en CEL. También es posible que el ambiente de rumen que limita la degradabilidad de la fibra no sea el mismo para cada tipo de forraje, es decir que la microflora podría adaptarse a las condiciones que impone la dieta y modificar así los límites de pH que provocan efectos negativos. En cuanto a la fracción proteica, la adición de maíz no afectó su degradación ruminal (DPB) en ninguno de los materiales estudiados. En el Experimento 2 la adición de BS como buffer dietario no afectó el pH ruminal ni la concentración de N-NH<sub>3</sub>. Tampoco se observó un efecto sobre la DgMS, ni en la degradabilidad ruminal de las fracciones FDN, FDA y PB. Sin embargo en el horario de las 48 horas de incubación el agregado del BS provocó que la degradabilidad de CEL en la dieta 60GM+BS, presentara valores similares a los encontrados en dietas 0GM y 0GM+BS. Esto refuerza la idea de que para mejorar la utilización de la fracción fibrosa en dietas de alta densidad energética habría que aumentar la disponibilidad de la fracción potencialmente digestible (celulosa y hemicelulosa), los estudios deben estar orientados a encontrar la forma de aumentar de la disponibilidad de la fracción de carbohidratos potencialmente digestibles, como la celulosa. Esto puede lograrse mediante la utilización de fuentes de fibra de mayor calidad o a través del tratamiento (químico o enzimático) de las fibras, más que al hecho de recurrir al uso de buffers dietarios. Por lo observado en este experimento podría hipotetizarse que la adición de BS podría ser más efectiva cuando la proporción de concentrado fuera mayor a la utilizada en el presente estudio, o también cuando el concentrado de la dieta fuera un

almidón más rápidamente fermentecible, o fuera suministrado por períodos de tiempo más largos. También se observa que la adición de BS sería más efectiva cuanto más disponible se encuentren los carbohidratos estructurales en las matrices fibrosas.

Por último, la tecnología NIRS mostró un gran potencial para la predicción de la composición química de residuos degradados a nivel ruminal de los materiales fibrosos estudiados en los Experimentos 1 y 2 y podrían ser empleadas en análisis rutinario. De todos modos, para FDN y FDA la inclusión de un mayor número de muestras con variabilidad espectral en los conjuntos de calibración, podría mejorar sensiblemente los modelos.

**Palabras claves:** fibra, degradabilidad ruminal, dietas alto almidón, bicarbonato de sodio, NIRS.

## ABSTRACT

---

The objective of this research was to study the degradability kinetics of the fibrous fraction of different forages in ruminal environments with increasing corn grain diet content, and the impact of addition sodium bicarbonate as a ruminal buffer. Two experiments were carried out. Experiment 1 explored the degradability of the fibrous fractions (all grain removed) of three types of silage : corn silage (CS), grain sorghum silage (SSG), and forage sorghum silage (SSF), weeping love grass forage (WL) and 98%-purity cellulose (CEL). Ruminal environments were generated by adding 0, 30 and 60 % of corn grain (CG) to the diet (0CG, 30CG and 60CG, respectively). Three ruminal fistulated cows were used in this experiment. Treatments were tested in a 5x3 factorial (5 materials x 3 ruminal environments), on a latin square design (3x3). Experiment 2 explored the degradability of the fibrous fractions (without grain) of corn plant (CP), grain sorghum plant (SG) and forage sorghum plant (SF), weeping love grass forage (WL) and 98% pure cellulose (CEL). Ruminal environments were the result of the combination of corn grain (CG) and sodium bicarbonate (SB) addition to the diets. Four treatments were generated: T1 = 0CG, T2 = 0CG+SB, T3 = 60CG and T4 = 60CG+SB. Four ruminal fistulated cows were used in this experiment. Treatments were tested in a 5x4 factorial (5 materials x 4 ruminal environments), on a latin square design (4x4). In both experiments, the ruminal environment was described by ruminal pH and the ammonia content (N-NH<sub>3</sub>). The *in-situ* DM degradability (DgDM) of the different fibrous materials was determined. Contents of NDF, ADF and CP from the fibrous materials degradation were determined before and after ruminal through wet chemistry and NIRS. Specific NIRS calibrations were previously developed for this purpose. In Experiment 1, the addition of corn grain (CG) to the diet decreased pH and ammonia concentration, and this effect was greater as the proportion of GM in the diet increased. This increased decreased DgMS. In contrast to 60CG diets, the 0CG and 30CG diets were able to provide a ruminal environment well fitted for degrading structural carbohydrates, which resulted in greater ruminal degradability of the NDF and ADF fractions. The use of structural carbohydrates (cellulose and hemicellulose, mainly) from the fibrous

fractions from corn and sorghum silages (without grain) would always be greater than those from weeping grass. When cellulose was fully available for degradation (CEL), it was not affected by inclusions of 30% of GM in the diet, while the addition of 60% of GM did affect the degradation of the polysaccharide, especially in the hours of 48 hours of incubation. The cell wall structure of the fibrous materials evaluated, affects the degradation of cellulose because a higher content of lignified cellulose could be presented in PLL, compared to cellulose that could be found in SPM, SSG and SSF or totally available in CEL. It is also possible that the rumen environment that limits fiber degradability is not the same for each type of forage, that is, the microflora could adapt to the conditions imposed by the diet and thus modify the pH limits that cause negative effects. In Experiment 2, the addition of sodium bicarbonate (SB) did not affect the ruminal pH or ammonia concentration. No differences were detected for DgMS, or on the ruminal degradability of the NDF (DNDF), ADF (DADF) or CP (DCP) fractions. However, in the 48-hour incubation, the addition of BS caused the degradability of CEL in the 60GM + BS diet to present values similar to those of 0GM and 0GM+BS diets. This strengthens the idea that in order to improve the use of the fibrous fraction in high energy density diets, the availability of the potentially digestible fraction (cellulose and hemicellulose) should be increased. This can be achieved through the use of higher quality fiber sources or chemical or enzymatic treatment on the fibers. The addition of SB could be more effective when the proportion of concentrate was higher than that used in the present study, or also when the concentrate of the diet was a more rapidly fermentable starch, or was supplied for longer periods of time. It is also observed that the addition of SB would be more effective the more available the structural carbohydrates are in the fibrous matrices. Finally, NIRS technology showed great potential for predicting the chemical composition of degraded residues at the ruminal level of the fibrous materials studied in Experiments 1 and 2 and could be used in routine analysis. However, for FDN and FDA, the inclusion of a greater number of samples with spectral variability in the calibration sets could significantly improve the models.

**Keywords:** fiber, rumen degradability, starch rich diets, sodium bicarbonate, NIRS.

## ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	II
RESUMEN.....	III
ABSTRACT .....	VI
ÍNDICE .....	VIII
Índice de Tablas .....	XI
Índice de Figuras .....	XIII
CAPITULO 1: AMBIENTE RUMINAL Y TIPO DE FIBRA EN RUMIANTES .....	1
<b>1.1 INTRODUCCION GENERAL .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Diferencias potenciales de la fracción fibrosa .....	1
1.1.2 Técnicas para estimar la digestibilidad .....	6
1.1.3 Metabolismo de los hidratos de carbono .....	9
1.1.4 Metabolismo de las proteínas .....	12
1.1.5 El grano en la dieta: efecto sobre el pH ruminal y la degradabilidad de la fibra .....	13
1.1.6 Uso de Buffers: Bicarbonato .....	19
1.1.7 Descripción del problema .....	21
CAPITULO 2: CINÉTICA DE DEGRADABILIDAD RUMINAL DE DISTINTAS FUENTES DE FIBRA EN AMBIENTES RUMINALES CON 0, 30 Y 60% DE GRANO DE MAÍZ ENTERO EN LA DIETA .....	25
<b>2.1 INTRODUCCION.....</b>	<b>25</b>
<b>2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
2.2.1 Sitio experimental .....	28
2.2.2 Animales, alimentación y diseño experimental .....	28
2.2.3 Determinación del pH y del nitrógeno amoniacal ruminal .....	29
2.2.4 Materiales fibrosos evaluados .....	30
2.2.5 Análisis químicos de los materiales fibrosos.....	31
2.2.6 Incubación en el rumen .....	31
2.2.7 Determinaciones .....	32
2.2.8 Análisis estadístico .....	33
<b>2.3 RESULTADOS Y DISCUSION .....</b>	<b>35</b>
2.3.1 Parámetros asociados al ambiente ruminal: Evolución del pH y el N-NH <sub>3</sub> .....	35
2.3.2 Degradabilidad ruminal de las fracciones de MS, FDN, FDA y PB .....	40
<b>2.4 CONCLUSIONES .....</b>	<b>49</b>

## CAPITULO 3: CINÉTICA DE DEGRADABILIDAD RUMINAL DE DISTINTAS FUENTES DE FIBRA CON GRANO DE MAÍZ Y BICARBONATO DE SODIO EN LA DIETA ..... 59

<b>3.1</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>59</b>
<b>3.2</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>62</b>
3.2.1	Sitio experimental.....	62
3.2.2	Animales, alimentación y diseño experimental.....	62
3.2.3	Determinación del pH y del nitrógeno amoniacal ruminal.....	63
3.2.4	Materiales fibrosos evaluados.....	64
3.2.5	Análisis químicos de los materiales fibrosos.....	64
3.2.6	Incubación en rumen.....	64
3.2.7	Determinaciones.....	65
3.2.8	Degradabilidad ruminal de la materia seca (MS), fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA) y proteína bruta (PB).....	65
3.2.9	Diseño experimental y análisis estadístico.....	66
<b>3.3</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSION.....</b>	<b>68</b>
3.3.1	Parámetros asociados al ambiente ruminal: Evolución del pH y el N-NH <sub>3</sub> .....	68
3.3.2	Degradabilidad ruminal de las fracciones de MS, FDN, FDA y PB.....	70
<b>3.4</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>77</b>

## CAPITULO 4: DESARROLLO DE CALIBRACIONES NIRS PARA LA PREDICCIÓN DE LOS PARÁMETROS FDN, FDA Y PB EN RESIDUOS FIBROSOS DE MATERIAL DEGRADADO *IN SITU*..... 85

<b>4.1</b>	<b>INTRODUCCION.....</b>	<b>85</b>
4.1.1	Métodos de referencia.....	85
4.1.2	Bases de la Espectroscopía en Infrarrojo Cercano (NIRS).....	86
4.1.3	La quimiometría aplicada a la tecnología NIRS.....	87
4.1.4	El proceso de modelado.....	88
4.1.5	Elección del conjunto de calibración.....	88
4.1.6	Calidad de los datos de referencia y obtención de la señal analítica.....	88
4.1.7	Calibración: el cálculo del modelo.....	89
4.1.8	Análisis exploratorio de datos espectrales en el proceso de calibración.....	90
4.1.9	Pre-tratamientos espectrales.....	91
4.1.10	Regresión lineal.....	93
4.1.11	Validación del modelo.....	94
4.1.12	Tecnología NIRS para análisis de Fibras y PB.....	94
<b>4.2</b>	<b>MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>95</b>
4.2.1	Muestras.....	95
4.2.2	Tecnología NIRS.....	95
<b>4.3</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSION.....</b>	<b>98</b>
4.3.1	Espectros.....	98
4.3.2	Calibración y matrices de validación.....	100

4.3.3	Residuo de Pasto llorón degradado <i>in situ</i> .....	100
4.3.3.1	Análisis exploratorio de datos .....	100
4.3.3.2	Calibración.....	101
4.3.4	Ensilajes de Maíz y Sorgos .....	103
4.3.4.1	Análisis exploratorio de datos .....	103
4.3.4.2	Calibración.....	103
4.3.5	Planta de Maíz y Sorgo.....	104
4.3.5.1	Análisis exploratorio de datos .....	104
4.3.5.2	Calibración.....	105
<b>4.4</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>107</b>
	CONCLUSIONES E IMPLICANCIAS .....	127
	BIBLIOGRAFIA.....	129

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Composición química de las dietas utilizadas en el ensayo de degradabilidad <i>in situ</i> .....	51
Tabla 2.2. Composición química de los materiales fibrosos evaluados en el ensayo de degradabilidad <i>in situ</i> .....	51
Tabla 2.3. Parámetros asociados al ambiente ruminal: pH y N-NH <sub>3</sub> .....	52
Tabla 2.4. Interacción Mat x GM para Degradabilidad ruminal de la celulosa .....	53
Tabla 2.5 Interacción Mat x GM para Degradabilidad de la materia seca (DgMS) .....	54
Tabla 2.6. Interacción H x Mat para Degradabilidad de la materia seca (DgMS) y degradabilidad de la proteína bruta (DPB). .....	55
Tabla 2.7. Interacción GM x H para Degradabilidad de la materia seca (DgMS).....	56
Tabla 3.1. Composición química de las dietas utilizadas en el ensayo de degradabilidad <i>in situ</i> .....	78
Tabla 3.2. Composición química de los materiales fibrosos incubados en rumen. ....	78
Tabla 3.3. Parámetros asociados al ambiente ruminal: pH y N-NH <sub>3</sub> .....	79
Tabla 3.4. Interacción Tratamiento x GM para Degradabilidad ruminal de celulosa. ....	80
Tabla 3.5. Interacción GM x H para DFDN, DFDA y DPB. ....	81
Tabla 3.6. Interacción MAT x H para DFDN, DFDA y DPB. ....	82
Tabla 3.7. Interacción Mat x GM para DFDN, DFDA y DPB.....	83
Tabla 4.1. Conformación de los distintos conjuntos de calibración de los grupos de estudio.....	108
Tabla 4.2. Asignación de bandas en la región NIR para productos agrarios (Williams, 2001) .....	108

Tabla 4.3. Descripción estadística de los conjuntos de calibración finales. ....	108
Tabla 4.4. Estadísticas de predicción y tratamientos matemáticos utilizados en las ecuaciones desarrolladas para forraje de pasto llorón (PLL).....	109
Tabla 4.5. Estadísticas de predicción y tratamientos matemáticos las ecuaciones desarrolladas para ensilaje de sorgo y maíz (sin grano) (SSYM).....	110
Tabla 4.6. Estadísticas de predicción y tratamientos matemáticos las ecuaciones desarrolladas para planta de sorgo y maíz (sin grano) (PMYS). ....	111

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Representación esquemática de una célula del parénquima de una planta. (Extraído de Ascon-Bieto y Talon, 2008).....	22
Figura 1.2. Representación esquemática de Método Van Soest.....	22
Figura 1.3. Microflora ruminal. ....	23
Figura 1.4. Metabolismo Ruminal de Hidratos de Carbonos. ....	23
Figura 1.5. Metabolismo ruminal de Proteínas.....	24
0GM: 0% de grano de maíz en la dieta; 30GM: 30% de grano de maíz en la dieta; 60GM: 60% de grano de maíz en la dieta.....	51
FDN: fibra detergente neutro (%); FDA: fibra detergente ácido (%); DMS: digestibilidad de la materia seca (%); EM: energía metabolizable (Mcal/kgMS) y PB: proteína bruta (%). Los resultados son expresados en base seca. ....	51
Figura 2.1. Degradabilidad ruminal de la fracción de FDN (DFDN) de los materiales (Mat) a) PLL: forraje de pasto llorón, b) SSF: ensilaje de sorgo forrajero, c) SPM: ensilaje de planta de maíz sin grano y d) SSG: ensilaje de sorgo granífero sin grano en dietas con 0% (...), 30% (- - -) y 60% (___) de grano de maíz (GM). GM $P = 0,4794$ ; Mat $P < 0,0001$ ; Hora $P < 0,0001$ ; GM x Mat $P = 0,1070$ ; GM x Hora $P = 0,4469$ ; Mat x Hora $P < 0,0001$ ; GM x Mat x Hora $P = 0,0158$ .....	57
Figura 2.2. Degradabilidad ruminal de la fracción FDA de los materiales (Mat) a) PLL: forraje de pasto llorón, b) SSF: ensilaje de sorgo forrajero, c) SPM: ensilaje planta de maíz sin grano y d) SSG: ensilaje de sorgo granífero sin grano en dietas con 0% (...), 30% (- - -) y 60% (___) de grano de maíz (GM). GM $P = 0,5186$ ; Mat $P < 0,0001$ ; Hora $P < 0,0001$ ; GM x Mat $P = 0,0963$ ; GM x Hora $P = 0,4893$ ; Mat x Hora $P < 0,0001$ ; GM x Mat x Hora $P = 0,0028$ .....	58
Figura 3.1. Patrón de degradabilidad in situ de la MS (DgMS) de los materiales (Mat) a) forraje de pasto llorón (PLL), b) planta de sorgo forrajero (PSF), c) planta de sorgo granífero sin grano (PSG), d) planta de maíz sin grano (PM) y e) celulosa (CEL) en dietas con 0% (...) y 60% (___) de grano de maíz. GM = grano de maíz, BS= bicarbonato de sodio, H: horas de incubación. GM $P < 0,0001$ ; BS $P = 0,3278$ ; H $P < 0,0001$ ; Mat $P < 0,0001$ ; GM x Mat $P = 0,0008$ ; GM x Hora $P < 0,0001$ ; Mat x H $P = 0,0001$ ; GM x Mat x H $P = 0,0016$ . ....	84

Figura 4.1. Espectro electromagnético y movimientos vibracionales posibles en el la region NIR. ....	112
Figura 4.2. Asignación de la absorción de la radiación en el rango espectral del NIR. Principales sobretonos y bandas de combinación generadas por los distintos tipos de vibración de moléculas. ....	113
Figura 4.3 Espectros NIR de a) una muestra de suero y b) espectro puros solapados de glucosa y principales componenetes del suero que influyen en la determinacion de glucosa. ....	114
.....	115
Figura 4.4. Grafico 3-D para un conjunto de muestras A (+) y B (■) distribuidas en los ejes de componentes principales 2,3 y 4 donde se puede observar un outlier espectral (⊕) fuera del cubo sobre la componente principal 4. ....	115
Figura 4.5. Espectros de residuos de degradación <i>in situ</i> de forraje de pasto llorón (PLL). En color azul se encuentra el promedio espectral del grupo. ....	116
Figura 4.6. Espectros de residuos de degradación in situ de residuos de ensilaje de sorgo y maíz (sin grano) (SSYM). En color azul se encuentra el promedio espectral del grupo. ....	117
Figura 4.7. Espectros de residuos de degradación in situ de residuos de residuos de planta de sorgo y maíz (sin grano) (PSYM). En color azul se encuentra el promedio espectral del grupo. ....	118
Figura 4.8. Gráfico 3-D de residuos de forraje de pasto llorón (PLL) degradados <i>in situ</i> . Los ejes corresponden a las componentes principales 2, 3 y 4, las muestras que integran el conjunto de calibración están indicadas con: + y las muestras de la población con: □, para los parámetros FDN (Fibra Detergente Neutro) y FDA (Fibra Detergente Acido)...	119
Figura 4.9. Curva de calibración entre valores de referencia (LABORATORIO) y valores predichos por NIRS para FDN (Fibra Detergente Neutro) en residuos de digestión in situ de forraje de pasto llorón (PLL). SECV: error estándar de validación cruzada; R2cv: coeficiente de determinación de la validación cruzada.....	119
Figura 4.10. Curva de calibración entre valores de referencia (LABORATORIO) y valores predichos por NIRS para FDA (Fibra Detergente Acido) en residuos de digestión in situ de forraje de pasto llorón (PLL). SECV: error estándar de validación cruzada; R2cv: coeficiente de determinación de la validación cruzada.....	120

Figura 4.11. Gráfico 3-D de residuos de forraje de pasto llorón (PLL) degradados *in situ*. Los ejes corresponden a las componentes principales 1, 2 y 3, las muestras que integran el conjunto de calibración están indicadas con: + y las muestras de la población con: □, para PB (Proteína Bruta). ..... 120

Figura 4.12. Curva de calibración entre valores de referencia (LABORATORIO) y valores predichos por NIRS para PB (Proteína Bruta) en residuos de digestión *in situ* de forraje de pasto llorón (PLL). SECV: error estándar de validación cruzada;  $R^2_{cv}$ : coeficiente de determinación de la validación cruzada. .... 121

Figura 4.13. Gráfico 3-D de residuos de ensilajes de sorgo y maíz (sin grano) (SSYM) degradados *in situ*. Los ejes corresponden a las componentes principales 2, 3 y 4, las muestras que integran el conjunto de calibración están indicadas con: + y las muestras de la población con: □, para los parámetros FDN (Fibra Detergente Neutro) y FDA (Fibra Detergente Acido). ..... 121

Figura 4.14. Curva de calibración entre valores de referencia (LABORATORIO) y valores predichos por NIRS para FDN (Fibra Detergente Neutro) en residuos de digestión *in situ* de ensilajes de maíz y sorgo (sin grano) (SSYM). SECV: error estándar de validación cruzada;  $R^2_{cv}$ : coeficiente de determinación de la validación cruzada. .... 122

Figura 4.15. Curva de calibración entre valores de referencia (LABORATORIO) y valores predichos por NIRS para FDA (Fibra Detergente Acido) en residuos de digestión *in situ* de ensilajes de maíz y sorgo (sin grano) (SSYM). SECV: error estándar de validación cruzada;  $R^2_{cv}$ : coeficiente de determinación de la validación cruzada. .... 122

Figura 4.16. Gráfico 3-D de residuos de ensilajes de sorgo y maíz (sin grano) (SSYM) degradados *in situ*. Los ejes corresponden a las componentes principales 2, 3 y 4, las muestras que integran el conjunto de calibración están indicadas con: + y las muestras de la población con: □, para PB (Proteína Bruta). ..... 123

Figura 4.17. Curva de calibración entre valores de referencia (LABORATORIO) y valores predichos por NIRS para PB (Proteína Bruta) en residuos de digestión *in situ* de ensilajes de maíz y sorgo (sin grano) (SSYM). SECV: error estándar de validación cruzada;  $R^2_{cv}$ : coeficiente de determinación de la validación cruzada. .... 123

Figura 4.18. Gráfico 3-D de residuos de ensilajes de sorgo y maíz (sin grano) (PMYS) degradados *in situ*. Los ejes corresponden a las componentes principales 2, 3 y 4, las muestras que integran el conjunto de calibración están indicadas con: + y las muestras de la población con: □, para los parámetros FDN (Fibra Detergente Neutro) y FDA (Fibra Detergente Acido). ..... 124

Figura 4.19. Curva de calibración entre valores de referencia (LABORATORIO) y valores predichos por NIRS para FDN (Fibra Detergente Neutro) en residuos de digestión *in situ*

de planta de maíz y sorgo (sin grano) (PMYS). SECV: error estándar de validación cruzada;  $R^2_{cv}$ : coeficiente de determinación de la validación cruzada. .... 124

Figura 4.20. Curva de calibración entre valores de referencia (LABORATORIO) y valores predichos por NIRS para FDA (Fibra Detergente Acido) en residuos de digestión *in situ* de planta de maíz y sorgo (sin grano) (PMYS). SECV: error estándar de validación cruzada;  $R^2_{cv}$ : coeficiente de determinación de la validación cruzada..... 125

Figura 4.21. Gráfico 3-D de residuos de ensilajes de sorgo y maíz (sin grano) (PMYS) degradados *in situ*. Los ejes corresponden a las componentes principales 2, 3 y 4, las muestras que integran el conjunto de calibración están indicadas con: + y las muestras de la población con: □, para PB (Proteína Bruta). .... 125

Figura 4.22. Curva de calibración entre valores de referencia (LABORATORIO) y valores predichos por NIRS para PB (Proteína Bruta) en residuos de digestión *in situ* de planta de maíz y sorgo (sin grano) (PMYS). SECV: error estándar de validación cruzada;  $R^2_{cv}$ : coeficiente de determinación de la validación cruzada..... 126

## **CAPITULO 1: AMBIENTE RUMINAL Y TIPO DE FIBRA EN RUMIANTES**

---

### **1.1 INTRODUCCION GENERAL**

El proceso de intensificación en la ganadería argentina actual ha conducido a profundos cambios, entre ellos, la modificación de los tradicionales sistemas de alimentación (Giordano et al., 2013; Pordomingo, 2013). Si bien la ganadería argentina se ha caracterizado por sus sistemas pastoriles, se observa una disminución de la utilización de pasturas de calidad en la terminación de animales y un aumento en la terminación en corrales (Rearte, 2003). Esta situación implica un mayor uso de granos, ensilajes de planta entera y subproductos agroindustriales en las dietas (Elizalde y Riffel, 2011). En varios de estos sistemas, basados en oferentes fibrosos con inclusión de granos u otra fuente de almidón, los henos o los ensilajes son los responsables no solo del aporte de fibra para mantener la funcionalidad ruminal, sino de aporte de energía digestible de su fibra. La utilización de la fracción fibrosa de los forrajes es relevante y el grado de aprovechamiento depende de complejas interacciones de nutrientes y procesos degradativos en el rumen. La composición química, la estructura física, la forma y comportamiento degradativo de la fibra en el rumen son limitantes o condicionantes del ritmo de fermentación y del consumo. En raciones con alta densidad energética el contenido de fibra pasa a tomar un papel importante, con requisitos mínimos estrictos que logran evitar desequilibrios físicos y fermentativos (Calsamiglia, 1997; Pordomingo, 2007).

#### **1.1.1 Diferencias potenciales de la fracción fibrosa**

La fibra en la ración tiene una acción doble dentro del rumiante: por un lado, su composición química regula el ritmo de fermentación y, por otro, su estructura física altera los tiempos de masticación y secreción salivar (Bach y Calsamiglia,

2002). A nivel productivo, la fibra es responsable de la motilidad ruminal, la rumia y el sostenimiento del equilibrio bioquímico y fermentativo del rumen y la consecuente absorción de metabolitos por parte del epitelio ruminal (Pordomingo, 2017). En los sistemas de base pastoril, semipastoril o en encierres basados en alimentos fibrosos (ensilajes), otra función que desempeña es la de degradarse en procesos fermentativos a formas simples de ácidos grasos de cadena corta. Es así como la fibra es capaz de ofrecer energía digestible a través de la fermentación de la pared celular (PC) de las células vegetales por los microorganismos ruminales (Wilson, 1993). La mejora de la digestibilidad de la dieta por adecuación o sincronía de nutrientes durante la fermentación y captura en biomasa microbiana como absorción directa se correlaciona con la fermentabilidad de la fibra (Orskov, 1971; Church, 1988). Es por ello que el estudio de la formación, composición y aporte nutricional de la fibra que compone la PC reviste siempre particular interés.

En la célula vegetal, la PC se deposita en capas. Así, durante la división celular se deposita la primera capa, originando la lámina media, formada fundamentalmente por polisacáridos pécticos, que mantiene la unión entre las células adyacentes. Entre la lámina media y la membrana plasmática se sigue depositando el material que va a constituir la PC primaria de escaso grosor (0,1-1,0  $\mu\text{m}$ ). En algunos tipos de células especializadas, una vez que dejan de crecer se depositan nuevas capas de material en la cara interna de la pared, constituyéndose así la PC secundaria, más gruesa que la primaria (Revilla y Zarra, 2008) (Figura 1.1). Con este arreglo final es que las células se agrupan para dar lugar a los diferentes tejidos que constituyen la planta. Los tejidos vegetales disponen de una arquitectura capaz de influir en la accesibilidad a la PC imposibilitando que las principales bacterias ruminales celulíticas accedan a cada célula y se adhirieran a la PC para una degradación efectiva de la fracción fibrosa. Wilson y Mertens (1995) afirman que las limitaciones anatómicas son tan o hasta veces más importantes que las limitaciones impuestas por la composición química de la PC. Años más tarde Wilson y Hatfield (1997) reportaron que los problemas

de accesibilidad se incrementan a medida que aumenta el grosor de la PC secundaria con la madurez del órgano.

Nutricionalmente es práctico distinguir en la célula vegetal fracciones conformadas por carbohidratos estructurales y no estructurales. Los primeros se corresponden con la PC, constituida principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina, los cuales pueden representar entre el 30 y 80 % del peso de la materia orgánica (MO). Las ligninas pueden alcanzar una proporción de hasta un 35% en algunos tipos de PC secundarias (Revilla y Zarra, 2008). La otra fracción se denomina contenido celular (CC), y lo constituyen proteínas, almidón, oligosacáridos, azúcares, lípidos, ácidos orgánicos y cenizas solubles. Estas fracciones, conforme avanza la madurez de la planta, van modificando sus proporciones, por lo cual, mientras que la PC se incrementa el CC disminuye (Stritzler et al., 2011).

La composición y estructura de la PC influyen en la utilización de los forrajes por los rumiantes (Cherney et al., 1986; Fritz et al., 1990). Esta estructura es compleja y variable, tanto química como histológicamente. Su composición varía entre especies, entre tejidos de una misma especie y entre células. Todas estas diferencias condicionan el modo de ataque microbiano a los polisacáridos estructurales y, en último término, la tasa y extensión de la degradación por los microorganismos (Calsamiglia, 1997). Por esto, la digestibilidad de los nutrientes suministrados dependerá de la composición química y cómo estos se encuentran unidos para dar forma a la estructura del forraje.

Desde el punto de vista químico la fracción fibrosa del forraje es un agregado de componentes, constituido fundamentalmente por un entramado tridimensional de celulosa, hemicelulosa y lignina, frecuentemente asociados a minerales y otros componentes, como pectina (Calsamiglia, 2008). Los constituyentes potencialmente digestibles de la PC son la celulosa y la hemicelulosa; en términos generales, la digestibilidad de estos dos polisacáridos varía entre el 52 y el 90% (Van Soest, 1994).

La hemicelulosa y la lignina forman una red hidrofóbica, en la cual las microfibrillas de celulosa están embebidas (Carpita et al., 1993). La red y los grupos acetilo de la hemicelulosa pueden restringir el acceso de las bacterias y de enzimas celulolíticas hacia las microfibrillas. Otro factor que puede influir en el acceso enzimático es el índice de cristalización de las microfibras de celulosa y la superficie disponible (Kumar et al., 2009; Chang et al., 2000; Allen y Mertens 1988).

La digestibilidad de la Materia Seca (DMS) de la PC es muy variable, por lo que la energía disponible a partir de los forrajes es limitada por la concentración de PC, que se digiere más lentamente que el contenido celular y en forma incompleta (Stritzler et al., 2011; Buxton y Redfearn, 1997). La variación en la DMS de la PC está asociada, principalmente, a la presencia de la lignina (Stritzler et al., 2011; Torrecillas, 2004; Buxton y Redfearn, 1997; Van Soest, 1967). Sin la presencia de este componente, la celulosa y hemicelulosa, son totalmente fermentecibles (Torrecillas, 2004). Spada y Mombelli (2007) determinaron una disminución en la digestibilidad de dos puntos porcentuales por cada incremento porcentual de lignina.

La lignina es el principal constituyente de la PC que limita la digestión de los polisacáridos celulosa y hemicelulosa (Jung, 1989; Jung y Allen, 1995; Grant et al., 1995; Van Soest, 1993) y el efecto se debe principalmente a la fuerte asociación física con los polisacáridos dentro de la matriz de la PC, y a las uniones covalentes éster y éter que dicho compuesto forma con los polisacáridos, limitando la accesibilidad a la PC de las enzimas microbianas del rumen (Grant et al., 1995).

La lignina es un polímero de alcoholes cuyos precursores más importantes son el p-cumaril, coniferil y sinapil (Jung y Allen, 1995). La lignificación se produce por sucesivas deposiciones de los polímeros en la PC hasta formar un compuesto en el cual los polímeros son unidos unos con otros de manera física y química. Este proceso comienza en la pared primaria, sigue por la laminilla media y termina en la pared secundaria. Estas diferencias en la deposición causan heterogeneidad en la estructura de la lignina dependiendo de las secciones morfológicas

(Terashima et al., 1993). Durante la maduración de la PC la composición de la lignina cambia desde el tipo guaiacil (predomina el alcohol coniferil) hacia el tipo siringil (predomina el alcohol sinapil) (Akin y Chesson, 1989; Terashima et al., 1993; Jung y Allen, 1995). Las unidades guaiacil pueden formar más enlaces con los polisacáridos que las unidades de sinapil. Esto genera una mayor relación lignina/polisacáridos en la PC primaria y laminilla media que en la PC secundaria, donde la lignina es más rica en unidades de siringil. En consecuencia, la lignina formada durante estados tempranos (rica en guaiacil) es densa y ejerce un efecto de mayor inhibición de la hidrólisis de los polisacáridos de la PC que la formada más tardíamente (Terashima et al., 1993; Jung y Deetz, 1993). Este mecanismo de biogénesis determina las propiedades físicas y químicas de la lignina, y sus efectos (Terashima et al., 1993).

Por último cabe destacar que las características nutricionales de la fibra no solo dependen de su composición, sino de las interacciones entre sus componentes y de la forma en la que se presenta al animal (Calsamiglia, 1997). Por estas razones, no es suficiente con considerar únicamente el análisis químico como método de valoración de calidad de forraje, y es necesario observar el tamaño de partícula y el manejo de la ración. Hecho que ha dado a lugar al concepto de fibra efectiva o fibra funcional. La fibra efectiva puede definirse como la capacidad de la fibra para estimular la masticación, la rumia, y la secreción salivar. Todos estos procesos son afectados por el tipo, la forma y el tamaño de la fibra. En base a estos principios se han desarrollado índices de valor forrajero (Sudweeks et al., 1981; Santini et al., 1983) que estiman el tiempo de masticación y/o rumia por Kg de MS y que han servido de base para estimar el valor de la fibra efectiva (FDN-e). Con el fin de mantener el llenado ruminal y las condiciones fermentativas adecuadas, se recomienda que el 80% de FDN se aporte en FDN-e (Calsamiglia 1997).

### 1.1.2 Técnicas para estimar la digestibilidad

El valor nutritivo de los forrajes es función de la digestibilidad de los mismos (Lechtenberg et al., 1972). La digestibilidad es el principal parámetro que define la calidad de un recurso forrajero, con la cual se determina la concentración de energía metabolizable (AFRC, 1993). La digestibilidad se puede estimar con animales (*in vivo*) o con métodos indirectos. La metodología *in vivo* es laboriosa, requiere mucho tiempo y gran cantidad de recursos económicos y humanos, por lo que es utilizada solamente con fines experimentales (Adesogan, 2002). Debido a las dificultades que presenta la medición de la digestibilidad *in vivo*, se utilizan diversas técnicas indirectas para estimarla, entre las cuales se encuentran las técnicas de digestibilidad *in vitro*, la degradabilidad *in situ* y las ecuaciones de predicción a partir de la composición química del forraje (Adesogan, 2002).

La técnica *in vitro* de Tilley y Terry (1963) requiere de 48 h para la etapa de incubación con líquido ruminal, seguida de otra etapa que simula la digestión en intestino. Con esta técnica no se obtiene información sobre la cinética de la digestión ruminal. La técnica *in situ* de Mehrez y Ørskov (1977) supera ésta limitante permitiendo estudiar la extensión y la cinética de degradación del alimento. La técnica *in situ* ha sido utilizada por varios años para proveer de estimaciones de la tasa y de la extensión de la degradación de los alimentos (Getachew et al., 2004). Tiene como objetivo principal medir la degradabilidad ruminal de la materia seca u orgánica de los alimentos, como así también de sus componentes como proteína o pared celular, cuando son expuestos a las condiciones ruminales. Para ello, los alimentos son colocados en bolsitas porosas que se incuban en el rumen introduciéndolas a través de una fístula permanente en el saco dorsal de este órgano. El tamaño de los poros de la bolsita debe permitir la entrada del líquido ruminal y de los microorganismos a la vez que debe evitar las pérdidas de material sin degradar. La incubación de las bolsitas por distintos lapsos de tiempo proporciona importante información sobre la cinética de la degradación del alimento (Adesogan, 2002; Pedraza Olivera, 2001).

La producción de gas *in vitro* es otra técnica empleada en la evaluación de alimentos. Las muestras de alimento se incuban con licor ruminal y una solución buffer a una temperatura constante de 39°C (Menke et al., 1979). La muestra es degradada y fermentada produciendo ácidos grasos volátiles (AGV), acético, propiónico y butírico principalmente, y generando gas (CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> y H<sub>2</sub>) (Theodorou et al., 1994; Getachew et al., 2004; Rymer et al., 2005). Esta técnica se basa en la medición del gas proveniente directamente de la fermentación y del CO<sub>2</sub> que es liberado cuando los AGV reaccionan con el medio buffer de bicarbonato (Getachew et al., 1998). Por lo tanto, la producción de gas ocurre simultáneamente a la fermentación y en proporción a la digestión de la muestra (Schofield, Pitt y Pell, 1994). Los sistemas utilizados para medir la producción de gas se dividen en los que miden el volumen de gas producido a presión constante y los que miden la producción de gas manteniendo un volumen constante. El primer sistema tiene la ventaja de ser económico, pero es menos sensible. En el segundo sistema la presión se acumula en los recipientes y su medición a diferentes intervalos de tiempo permite obtener el perfil de producción de gas. Un inconveniente de mantener el volumen constante es que la presión aumente de forma tal que pueda afectar la solubilidad de los gases producidos. Existe un tercer sistema que mide la producción de gas a presión y volumen constante por medio de manómetros o sensores que pueden ser de operación manual, semiautomáticos o totalmente automáticos (Rymer et al., 2005; Posada y Noguera, 2005). Esta técnica permite evaluar simultáneamente gran cantidad de muestras, estima con mayor precisión la fracción soluble del alimento y es menos dependiente del animal que la técnica *in situ* (Valentin et al., 1999; De Boever et al., 2005). Asimismo, permite el estudio de la extensión y cinética de degradación del alimento a través del volumen de gas producido durante el proceso fermentativo (Dhanao et al., 2000). Entre los factores que afectan en gran medida la producción de gas se encuentran: la composición del medio utilizado, la cantidad de sustrato y la fuente de inóculo. Sin embargo, las fuentes de variación pueden ser corregidas con el uso de muestras estándares en cada corrida (Menke et al., 1979; Van Gelder et al., 2005). La limitante más influyente en este método

es la falta de conformidad y uniformidad en las metodologías; esto es algo en lo que Williams (2000) hizo énfasis en su investigación, convirtiéndose en una dificultad constante para el desarrollo de los ensayos. (Vargas-Bayona et al., 2013)

El desafío de las técnicas de evaluación de alimentos es cuantificar lo más fielmente posible el resultado del proceso de digestión de los alimentos dentro del animal. Para ello las técnicas *in situ* y de producción de gas *in vitro*, a pesar de sus limitaciones, siguen siendo una valiosa herramienta disponible para su uso en la nutrición animal (Pedraza Olivera, 2001).

Finalmente, se dispone de ecuaciones empíricas de predicción de la digestibilidad, las cuales la estiman a partir de la composición química y son ampliamente utilizadas por los laboratorios de nutrición (Weiss, 1993). Entre ellas se encuentra la ecuación sumativa de Van Soest (1967), basada en el método de determinación de fibras que lleva su nombre.

La determinación del contenido de fibras por Van Soest se usa como criterio para la formulación de raciones en la mayoría de los sistemas de alimentación (NRC, 2000). Este método se basa en someter una muestra de forraje a la digestión mediante ebullición en una solución de detergente neutro donde lo retenido en el filtro es material de la PC llamado FDN (Fibra Detergente Neutro) (Figura 1.2). Este material insoluble se compone de celulosa, hemicelulosa y lignina, además otros componentes minoritarios como residuos de almidón, cenizas y nitrógeno. La porción de FDN que es parcialmente digestible y la porción digestible varían según la especie, madurez y condiciones ambientales bajo las cuales la planta creció (Van Soest, 1967). La pregunta a menudo no es cuánto material de PC está presente, sino cómo los diversos tejidos aumentan o impiden la tasa de degradación por los microorganismos. La FDN se utiliza como índice de volumen de la ración y supone un límite a la capacidad de ingestión de la ración (Martens, 1997). Su contenido está negativamente asociado a la capacidad de consumo voluntario del alimento. Trabajos desarrollados en la Universidad de Wisconsin sugieren que la capacidad de ingestión de los animales puede

calcularse como el 1,2% del peso vivo en forma de FDN (Mertens, 1987). Por encima de éste nivel, la FDN puede limitar la ingestión de forraje, y en ningún caso debería superar el 1,4-1,5% del peso vivo.

El método secuencial de Van Soest propone someter la muestra a una segunda digestión mediante la ebullición en detergente en medio ácido. La FDA (Fibra Detergente Acido) (Figura 1.2) es el material insoluble resultante y está constituida fundamentalmente por celulosa y lignina, aunque suelen existir otros componentes minoritarios como nitrógeno y/o minerales. La fracción de FDA deriva de ambas PC, la primaria y la secundaria, incluyendo el tejido de la planta lignificado de la lamela media (Jung H.G., 2012). La falta de disponibilidad de esta fracción se debe en parte a factores físico-químicos como incrustación, lignificación, cristalización de la celulosa y la organización estructural en la fracción de la PC (Coleman et al., 2008). Para optimizar el contenido energético de la ración el contenido de FDA debería reducirse al máximo, pero manteniendo los aportes mínimos capaces de mantener el “equilibrio ruminal”.

Diversas y modernas técnicas instrumentales analíticas basadas en las propiedades físicas y químicas de las muestras han sido desarrolladas en respuesta a la necesidad de una alternativa al método tradicional de Van Soest. El método NIRS (por sus siglas en inglés Near Infra Red Spectroscopy) ha sido uno de los más exitosos debido a que es una técnica analítica no destructiva, rápida, amigable con el medio ambiente. Sin embargo, siempre es necesario del uso de técnicas de referencia (química húmeda) para el desarrollo y mantenimiento de las ecuaciones de calibración NIRS (Deaville, E.R. y Flinn, P.C., 2000; Osborne, 2000).

### **1.1.3 Metabolismo de los hidratos de carbono**

Los rumiantes son animales peculiares en su anatomía y fisiología digestiva debido a la presencia de una cámara de fermentación pre-gástrica, el rumen, que alberga una compleja población microbiana (bacterias, protozoos, hongos,

arqueas y virus; Figura 1.3). Esa fermentación permite generar energía química, biomasa microbiana proteica, vitaminas, aminoácidos esenciales y coenzimas, péptidos de *novo* y otros nutrientes aprovechables por el hospedante a partir de recursos vegetales que de otra forma no le serían digestibles (Yáñez-Ruiz, 2016).

La fermentación microbiana de los alimentos genera principalmente ácidos grasos volátiles, proteína microbiana, calor y gases ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_4$  y  $\text{H}_2$ ). Los ácidos grasos volátiles (AGV) y la proteína microbiana constituyen los grandes oferentes de nutrientes energéticos y proteicos que recibe el rumiante, aún en dietas con alto contenido de almidones y alta digestibilidad (Figura 1.4) (Yáñez-Ruiz, 2016). Los productos que se obtienen al final del proceso fermentativo dependen, en gran parte, del tipo de microorganismos presentes en el rumen, de la composición de la ración (Bannink et al., 2008), del pH del medio ruminal y de la frecuencia de alimentación. Cuando la ración se basa en forrajes, se produce menor cantidad de AGV que en raciones a base de alimentos proteicos o almidonosos de alta degradabilidad. En la alimentación en base a forrajes la proporción de ácido acético es elevada (entre 60-70%) comparada con la generada en dietas de bajo contenido de fibra (Bath y Rook, 1965; Church et al., 1988). En las dietas en base a granos se observa una disminución en la proporción de ácido acético y un aumento la proporción de ácido propiónico (Cone y Becker, 2012).

Los carbohidratos suponen más de un 70% del total de nutrientes aportados en la dieta de los rumiantes. Entre ellos, las fracciones más estudiadas han sido tradicionalmente los polisacáridos fibrosos y el almidón. Sin embargo, los azúcares simples y reductores han adquirido un interés creciente en la alimentación de estos animales. Se consideran como azúcares la fracción de carbohidratos no estructurales solubles en agua o en etanol al 80% (Southgate, 1991). Entre ellos, se incluyen monosacáridos, fundamentalmente glucosa y fructosa, disacáridos de origen vegetal como sacarosa (unidades de glucosa y fructosa) o animal como lactosa (unidades de glucosa y galactosa) y, en menor medida, oligosacáridos de tres y cuatro unidades, como rafinosa (galactosa, fructosa y glucosa), maltotriosa (tres unidades de glucosa) y estaquiosa (dos unidades de galactosa unidas a

glucosa y fructosa). En las primeras horas de fermentación estos azúcares simples se solubilizan en el líquido ruminal, degradándose de manera rápida y completa (Santini, 2014; Chruch, 1988). Sin embargo, ellos sólo constituyen una pequeña parte del material potencialmente degradable. A medida que el proceso fermentativo continúa el sustrato fibroso es hidratado y colonizado por los microorganismos ruminales (Fuentes, 2016).

La fibra se fermenta en el rumen por la acción de las bacterias fibrolíticas (Satoshi y Kobayashi, 2009). El proceso es relativamente lento, y el primer paso para que suceda la degradación es la adhesión de los microorganismos a la pared vegetal, proceso que se realiza a una velocidad inversamente proporcional al grado de lignificación. Las bacterias ruminales sólo pueden atacar en la superficie inmediata, por lo que a veces sufren de una limitación estructural al acceso a la matriz de la pared celular. Sin embargo, los hongos ruminales sí parecen ser capaces de penetrar físicamente dentro de la pared secundaria, por lo que esta asociación es beneficiosa para lograr una mayor fermentación. La degradación progresa por la acción de las enzimas de bacterias y hongos, produciendo glucosa o pentosas como productos intermedios que son utilizadas en vías fermentativas que conducen a la producción de acetato como producto final más importante en términos cuantitativos (Owens y Goetsch, 1993). La glucosa y el resto de los azúcares son absorbidos y metabolizados por los microorganismos para su propio crecimiento.

Por último, para lograr la hidrólisis del almidón, es necesario un conjunto de enzimas que actúan a distintos niveles de la cadena de moléculas de glucosa (Santini y Elizalde, 1993). Los enlaces en el almidón, por ser tipo alfa, son desdoblados tanto por los microorganismos amilolíticos como por la amilasa pancreática del animal, y las bacterias absorben su unidad estructural, la glucosa (Cone y Becker, 2012).

#### 1.1.4 Metabolismo de las proteínas

Aunque normalmente se hace referencia al contenido en proteína bruta de los alimentos, sería más apropiado referirse a los compuestos nitrogenados, ya que en la práctica el contenido en proteína de un alimento se determina mediante un análisis de Nitrógeno (N) de acuerdo al método N Kjeldahl (AOAC, 1990) y se multiplica el resultado por el factor 6,25, asumiendo un contenido medio de 16% de N en estas proteínas. Los alimentos contienen también compuestos nitrogenados de naturaleza no proteica, como ácidos nucleicos, aminos, amidas, aminoácidos libres (AA), péptidos y amoníaco. Estos compuestos se engloban en la fracción de N no proteico (NPN) y pueden cuantificarse como el N presente en el filtrado obtenido tras la precipitación de la proteína verdadera con ácido túngstico o ácido tricloroacético (Licitra et al., 1996).

Las proteínas de los alimentos son hidrolizadas por enzimas bacterianas hasta péptidos de cadena corta y aminoácidos. Los aminoácidos resultantes son utilizados por los microorganismos para su propio metabolismo, directamente para sintetizar su proteína, o pueden ser degradados hasta ácidos orgánicos,  $\text{NH}_3$  y  $\text{CO}_2$  (Bach et al., 2005) (Figura 1.5). Los ácidos orgánicos pueden ser utilizados como fuente energética o como esqueletos carbonados para la síntesis de otros aminoácidos. Los grupos amino son liberados al medio ruminal como producto de desecho, y se convierten, por adiciones de  $\text{H}^+$  en el ambiente reductor del rumen, en amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) (Relling y Mattioli, 2003). La concentración de este último es un indicador de la actividad proteolítica en el rumen. El amoníaco también puede ser empleado por los microorganismos para la síntesis de su propia proteína (Mehrez et al., 1977; McDonald et al., 1995; Aschenbach et al., 2011). Existen bacterias que hidrolizan carbohidratos, las cuales utilizan únicamente amoníaco como fuente de nitrógeno (Russell et al., 1992). En consecuencia, si en el rumen no se encuentran las concentraciones adecuadas de amoníaco, las bacterias no degradarán eficientemente los carbohidratos estructurales de la dieta. Se ha reportado que el rango óptimo, en el cual debe variar la concentración de  $\text{NH}_3$  es

de 5,6 - 10,0 mg de  $\text{NH}_3$ /100 ml de fluido ruminal (Satter y Slyter, 1974; Van Soest, 1994).

Los factores más importantes que afectan la degradación microbiana de las proteínas de la dieta son el tipo de proteína, las interacciones con otros nutrientes, principalmente los compuestos energéticos, y la población microbiana predominante, la cual depende del tipo de ración, la tasa de pasaje y el pH ruminal (Bach et al., 2005). El ritmo y extensión de la degradación proteica dependerá del tipo y concentración de enzimas producidas, así como del número de enlaces peptídicos susceptibles de ser escindidos. La estructura secundaria y terciaria de las proteínas determina la accesibilidad de las proteasas microbianas a algunos de los enlaces peptídicos y por ello condiciona la degradabilidad de la proteína. Las proteínas que contienen numerosos enlaces covalentes (por ejemplo puentes disulfuro en albúminas e inmunoglobulinas) o aquellas en las que estos enlaces se han formado como consecuencia de los tratamientos con ácido o calor son menos accesibles para los microorganismos y por ello se degradan más lentamente (Bach et al., 2005).

En dietas con una proporción alta de concentrados, aún si el pH es alto, predominan las bacterias que degradan el almidón y la digestión de la fibra es limitada por la reducción en el número de bacterias celulolíticas, con mayor probabilidad de reducir también la tasa de degradación de la proteína (Mould y Ørskov, 1983). El retardo se debería a que hay proteína unida a la fibra que solamente es degradada por las bacterias proteolíticas después de la despolimerización microbiana de la celulosa (Debroas y Blanchart, 1993).

#### **1.1.5 El grano en la dieta: efecto sobre el pH ruminal y la degradabilidad de la fibra**

La incorporación de grano a la dieta trae aparejados efectos en la utilización de los nutrientes de la misma. En algunas circunstancias, se dan efectos asociativos entre los componentes del forraje y el grano, que a menudo se deben

a interacciones digestivas y metabólicas que cambian la ingesta de energía digestible, y por lo tanto de energía metabolizable (EM). El efecto asociativo positivo ocurre cuando el consumo de EM es mayor que el que se espera de los componentes de la dieta (forraje y grano) si hubieran sido administrados por separado, mientras que los efectos asociativos negativos ocurren cuando el consumo de EM es menor de lo esperado. Dentro de los efectos positivos asociados podemos ver que la incorporación de grano a la dieta incrementa el consumo voluntario y/o la digestión del forraje debido a la provisión de nutrientes deficientes en el forraje, y que usualmente son importantes, tanto para los microorganismos ruminales como para el animal (Dixon y Stockdale, 1999).

Los efectos asociativos negativos ocurren cuando los granos constituyen una proporción sustancial de dietas mixtas, lo cual puede causar grandes pérdidas de eficiencia de conversión. Estos efectos se ven reflejados en la disminución del consumo voluntario y/o la digestión de la fracción forraje. Suelen tener importantes consecuencias negativas sobre la eficiencia en dietas formuladas con forrajes de alta digestibilidad suplementadas con granos. También puede tener efectos importantes en dietas formuladas con forrajes de baja a moderada digestibilidad. En cuyo caso los efectos negativos se deben a que los carbohidratos fácilmente fermentables (CFF) del grano, reducen la tasa de digestión microbiana ruminal de los componentes fibrosos del forraje, y por lo tanto se reduce la ingesta y/o digestión de forrajes en todo el tracto gastrointestinal del rumiante (Dixon y Stockdale, 1999).

La digestión ruminal de los componentes fibrosos depende del mantenimiento del pH ruminal. Eso se ha demostrado tanto *in vitro* (Terry et al. 1969; Stewart 1977; Hiltner y Dehority 1983) como *in vivo* (Mold y Ørskov 1983). Es por ello que la pieza central del control del equilibrio ruminal es el pH. De éste depende, directa o indirectamente, la supervivencia de las bacterias fibrolíticas, el equilibrio de la microflora ruminal y, finalmente, la concentración relativa de los principales ácidos grasos volátiles (AGV) (Calsamiglia 1997). El pH ruminal es la consecuencia del equilibrio entre la capacidad tampón del medio ruminal y la

producción de ácido. En condiciones normales el pH ruminal varía entre valores de 6 y 7 (Calsamiglia et al., 2002).

La capacidad tampón del medio ruminal está dada por la cantidad de saliva producida durante la masticación del alimento y la rumia, y por la capacidad tampón de los alimentos ingeridos por el rumiante (Church, 1988). La cantidad de saliva que es producida depende del tiempo y ritmo de ingestión y rumia, que son influenciados por la proporción de forraje en la dieta, el tamaño de fibra y la humedad del alimento, así como también por comportamiento alimentario del animal. Por otro lado, la capacidad tampón de los alimentos ingeridos depende de la capacidad de intercambio iónico de la ración y de la fermentación de la proteína a amoníaco (Van Soest et al., 1991). La capacidad buffer de los alimentos varía considerablemente, y se debe a la concentración de grupos cargados como proteínas y ligninas que intercambian cationes (por ejemplo,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ) por protones (Dijkstra et al., 2012). Los granos de cereales tienen una capacidad buffer relativamente baja porque el intercambio iónico en polisacáridos no iónicos tales, como almidón, es pequeño. Forrajes y alimentos con un bajo contenido de proteínas, incluyendo ensilado de maíz, tienen una capacidad buffer intermedia, mientras que las legumbres y alimentos con un alto contenido de proteínas tienen una capacidad buffer elevada. Entre los forrajes, la capacidad buffer tiende a aumentar con la madurez (Dijkstra et al., 2012).

Cuando sucede un consumo elevado de carbohidratos rápidamente fermentables, el pH ruminal puede disminuir rápidamente por la insuficiencia del sistema tampón o buffer mencionado anteriormente. Esa disminución del pH ruminal genera una reducción de la tasa de fermentación de la fibra reduciendo la capacidad buffer que aporta la dieta (Yang y Beauchemin, 2007; Yang y Beauchemin, 2009; Colman et al., 2013). A esto se le suma un efecto de retraso o disminución de la capacidad efectiva de la mucosa ruminal para la absorción y metabolismo de los AGV y un aumento de la proporción de AGV disociados (fracción aniónica). Así se provoca un aumento de la concentración de estos ácidos y se acentúa la baja del pH. La reducción del pH provoca un cambio en el

perfil de fermentación degradando los carbohidratos no estructurales (almidón y azúcares) hacia un aumento en la producción de ácido propiónico y ácido láctico posteriormente (Dirksen, 1969). La fermentación de almidones resulta en el desarrollo de un perfil de población bacteriana que fermenta la glucosa hacia propiónico y láctico (Calsamiglia et al., 2012). El suministro de dietas almidonosas resulta en una reducción de la relación acético: propiónico, aunque no está claro si este efecto se debe a una reducción del pH o a una modificación de la población microbiana. En condiciones *in vivo*, estos dos eventos ocurren de forma simultánea, por lo que los efectos observados pueden ser confundidos.

Si el animal continúa consumiendo glúcidos rápidamente fermentables el pH ruminal puede caer a valores por debajo de 5 y aumenta el riesgo de acidosis aguda. En contraste con la acidosis aguda, en la acidosis subclínica el rumen se ubica en un estado de desequilibrio transitorio y el pH cae a valores comprendidos entre 5 y 5,6 (Martin et al., 2006a; Nagaraja y Titgemeyer, 2007). La incidencia y severidad de estos problemas dependen de múltiples factores, tales como la cantidad y el tipo de forraje, la cantidad y tipo de grano, el tamaño de partícula (fibra efectiva), el tiempo de rumia, la frecuencia y el sistema de alimentación y el uso de aditivos (Tessmann et al., 1991; Krause y Oetzel, 2006; González et al., 2012; Zebeli et al., 2012). Calsamiglia et al. (2012) han propuesto que la acidosis ruminal debe ser atribuida a la combinación de los efectos provocados tanto por un pH ácido como por el elevado aporte de concentrado (almidón) en la dieta. Adicionalmente, Lechatier y Peyraud (2011) concluyen que se debe tener en cuenta no solo el contenido de almidón sino también las características fermentativas del concentrado (rápida o lentamente degradables) al formular dietas, además de tener siempre presente el suministro de fibra efectiva.

El incremento paulatino de la proporción de concentrado en la dieta y el descenso en el pH ruminal ocasionan cambios en la microbiota ruminal que favorecen a los microorganismos productores de lactato, con efectos adversos sobre las bacterias fibrolíticas (Zebeli y Metzler-Zebeli, 2012). En el proceso de adaptación a dietas con hasta un 80 % de alimentos concentrados se han

observado cambios significativos en la abundancia, la diversidad y la estructura de las comunidades bacterianas. Las especies bacterianas más favorecidas por esta situación en el rumen inicialmente son: *Proteobacteria*, *Megasphaera elsdenii*, *Streptococcus bovis*, *Selenomonas ruminantium* y *Prevotella bryantii*, mientras que en situaciones de acidosis ruminal, tanto aguda como crónica, dominan especies tales como *S. bovis*, *M. elsdenii*, *Escherichia coli* y *Prevotella albensis* (Zebeli y Metzler-Zebeli, 2012). Sin embargo, las especies fibrolíticas (*Butyrivibrio fibrisolvens* y *Fibrobacter succinogenes*) se ven desfavorecidas en estas condiciones. El efecto del descenso del pH ruminal sobre el retardo en la degradación de la fibra en el rumen ha sido explicado a través de la influencia negativa sobre las bacterias fibrolíticas (Erfle et al, 1982; Mould y Ørskov, 1983; Mould et al., 1984; Hoover, 1986). Russell y Wilson (1996) demostraron que las bacterias celulolíticas no pueden crecer en medios ácidos con celobiosa como nutriente. Estas bacterias son muy sensibles a una reducción del pH, lo que implica que a medida que disminuye el pH en el rumen se provoca un efecto negativo sobre la degradabilidad de la fibra. A pH ruminal entre 5,4 y 6,0 se reducen la adherencia de las bacterias y la actividad enzimática celulolítica, así como también la tasa de replicación de bacterias fibrolíticas (Cheng et al., 1980; Russell y Dombrowski, 1980). Valores de pH inferiores a 5,2 hacen que las bacterias puedan perder su capacidad de adherencia, se puedan lizar y pueda cesar la hidrólisis de la celulosa y otros carbohidratos estructurales (Mourino et al., 2001).

El efecto del pH sobre la fermentación microbiana en el rumen dependería no sólo de la magnitud de la disminución del pH sino, además, del tiempo durante el cual el pH se mantiene por debajo de su nivel óptimo (de Veth y Kolver, 2001; Cerrato-Sanchez et al., 2007b; Cerrato-Sanchez et al., 2007a). En los trabajos de Cerrato-Sanchez et al. (2008) no se observaron cambios apreciables en la fermentación ruminal *in vitro* cuando el pH se mantuvo a 5,6 durante 4 h/día o a 5,1 durante 2 h/ día; pero cuando el pH se mantuvo a 5,1 durante 4 h/ día se observó una inhibición significativa de la fermentación microbiana.

Por otro lado, la combinación de almidón con distintos tipos de materiales fibrosos arroja diferentes resultados en cuanto a degradabilidad de la fibra. Burroughs (1949) investigó este efecto utilizando marlo de maíz y heno de alfalfa. En el trabajo se observó que con cada incremento de almidón la digestibilidad del marlo disminuyó, sin embargo, este efecto no fue observado en la digestibilidad de alfalfa. La interacción entre el nivel de almidón y la fuente de fibra fue explicada en base a la adecuación relativa de nutrientes requeridos por los microorganismos ruminales y la capacidad de los forrajes de suministrarlos. El heno de alfalfa dispone de una elevada cantidad de nutrientes esenciales, mientras que en el marlo de maíz tiene un limitado aporte de nutrientes que dificulta el crecimiento de bacterias celulolíticas, causando disminución de la digestibilidad de la fracción fibrosa. Por otro lado, Dixon y Stockdale (1999) expusieron que cuando se proporcionaba grano de maíz en dietas con forrajes deficientes en nutrientes se podía observar un efecto positivo asociado a un incremento en el consumo voluntario y/o digestión.

Russell (1998) utilizó un sistema *in vitro* sencillo para demostrar que las modificaciones de la relación acetato: propionato se debían a un efecto combinado de la reducción del pH y del substrato de fermentación, siendo más importante éste último (75% de los efectos). En tanto Calsamiglia et al. (2008) concluyeron que la digestibilidad de la materia orgánica, la digestibilidad de la fibra y la concentración molar de acetato estaban asociadas fundamentalmente a la modificación del pH. Sin embargo, los cambios en la concentración molar de propionato y la producción total de ácidos grasos volátiles se asociaron al efecto combinado del pH y el tipo de dieta, mientras que los cambios asociados al metabolismo del N se asociaron principalmente al substrato fermentado. En síntesis, puede presuponerse que la degradabilidad de la fibra del material a evaluar depende del nivel de almidón en la dieta, del tipo de fermentación del concentrado y de la composición química e histológica del recurso fibroso.

Si bien el mencionado efecto del pH sobre la degradación de la fibra ha sido comprobado, la magnitud de dicho efecto sobre fibras de distinta composición u

origen ha sido menos estudiado. En los sistemas de producción en base a ensilaje de planta entera de maíz o de sorgo con contenidos variables de grano se presume que la respuesta animal resulta no sólo de la utilización del grano sino de la fibra del alimento. Sin embargo, se desconoce el grado y tasa de degradación de esas fuentes fibrosas en ese medio ruminal cuando varía el nivel de almidón aportado por el ensilaje. Pordomingo et al. (2012) no encontraron diferencias en aumento de peso vivo (ADPV) ni en consumo de materia seca (CMS) cuando agregaron grano de maíz quebrado a dietas basadas en ensilaje de maíz. Los autores sugirieron que esto pudo deberse a un retraso en la degradación ruminal de la fracción fibrosa del ensilaje, por lo que concluyeron que el incremento del contenido de grano en la dieta no necesariamente mejora el engorde cuando la dieta base está formulada con ensilaje. Conclusiones similares fueron alcanzadas por Kent et al. (2011), quienes no encontraron correlación entre el contenido de grano del ensilaje de sorgo y la respuesta animal. En el citado trabajo, los autores reportaron aumentos de peso similares entre animales con dietas basadas en ensilajes de sorgo granífero, silero o del tipo forrajero (sin grano) con digestibilidades de la materia seca (DMS) de 63,2%, 61,5 % y 62,5 % respectivamente. Por otro lado, con una amplitud en la DMS de 6,6 puntos porcentuales (72,9 y 66,4 %), Dalke et al. (1993) obtuvieron igual ADPV en 5 de los 6 tratamientos utilizando ensilaje de sorgo granífero y forrajero.

#### **1.1.6 Uso de Buffers: Bicarbonato**

El bicarbonato es un buffer que ingresa al rumen fundamentalmente por secreción hacia el lumen por el epitelio ruminal (Dijkstra et al., 2012). También se produce durante la masticación con producción de saliva (Erdman, 1988) y en menor proporción a partir de la dieta. La adición de bicarbonato de sodio así como de otros buffers permitiría prevenir un descenso del pH ruminal asociado a dietas con alta proporción de concentrado (Erdman et al 1982). La teoría convencional indica que el efecto de bicarbonato sódico (BS) depende de su capacidad de controlar las fluctuaciones de pH en el rumen (efecto tampón) (Kohn y Dunlap,

1998). En dietas con baja proporción de forraje y alto contenido de alimentos energéticos, la adición de buffers dietarios resulta una práctica habitual, en especial en vacas lecheras (Hu et al 2005). Russell y Chow (1993) dudan sobre la capacidad *buffer* real a las dosis utilizadas y en el contexto ruminal (ya saturado con CO<sub>2</sub>), y proponen que los efectos observados se deben a que las sales de bicarbonato incrementan la ingestión de agua y la tasa de dilución ruminal. Esto incrementaría el paso de partículas al intestino (mayor *bypass* ruminal), reduciendo la disponibilidad de almidón para su fermentación en el rumen. Block (1994) argumenta que parte del efecto del BS se debe a un cambio en el balance aniónico-catiónico sistémico, alterando la capacidad tamponante del animal.

Algunos trabajos han reportado la eficacia parcial del BS en el control de la acidosis (Erdman, 1988; Staples y Lough, 1989; Hu y Murphy, 2005). Sin embargo, aunque estos efectos son positivos y coherentes, sólo parecen manifestarse en condiciones particulares, como en dietas ricas en ensilado de maíz como fuente principal de forraje, y cuando la proporción de concentrado en la dieta final supera el 50% (Calsamiglia 2012). En estos casos, las recomendaciones sugieren una incorporación de BS del 0,7 al 1,0% de la ración total (en MS; Hu y Murphy, 2005; Sauvant et al., 2006). De acuerdo a la bibliografía, las respuestas a la suplementación con bicarbonato han sido variables en el resultado productivo. En algunos trabajos se observó un incremento en el aumento de peso vivo diario (APV) en dietas con un contenido elevado de concentrado y la adición de BS (Nicholson et al., 1963; Lofgreen, 1976; Brethour et al., 1986; Zinn, 1991; Tripathi et al., 2004). Sin embargo, en otros, la adición de BS no tuvo impacto en parámetros de producción o ruminales en vacas alimentadas con dietas a base de ensilaje (Erdman, 1988; Staples y Lough, 1989; Hu y Murphy, 2005). Los diferentes tipos de respuesta a la adición de BS han sido asociados al tipo de forraje, en especial al contenido de fibra (Hu y Murphy, 2005). Claramente, la respuesta animal varía con el tipo de dieta y nivel de BS. En un nivel elevado de adición, el exceso de BS parece disminuir el desarrollo del animal por afección de

la eficiencia metabólica, induciendo en algunos casos a la alcalosis respiratoria (Tripathi, 2004).

Por último, en cuanto a la influencia del agregado de BS sobre la degradación de la fibra, se han observado incrementos de un 5% aproximadamente (Emmanuel et al., 1970; Mertens y Ely, 1979).

### **1.1.7 Descripción del problema**

Se desconoce si el retardo eventual de la degradación de la fibra es inherente únicamente al contenido de almidón y su consecuente efecto sobre la acidez ruminal, o la naturaleza y composición de la fibra es, al menos en parte, responsable de dicho efecto. Tampoco se conoce la dimensión de la mejora en la utilización de fibras de diferente naturaleza en ese ambiente ruminal en respuesta a la adición de buffers de fermentación como el bicarbonato de sodio. Por otro lado, existe poca información del efecto de la incorporación de bicarbonato a dietas con alta proporción de concentrado acompañado de un forraje de mediana a baja calidad.

El presente trabajo propone contribuir al esclarecimiento de las incógnitas arriba expuestas mediante el estudio de la dinámica de la fermentación ruminal de recursos fibrosos de distinto origen expuestos a ambientes ruminales con presencia de granos almidonosos en distinta proporción en la dieta, y la respuesta a la inclusión de bicarbonato de sodio como buffer.

Una mejor comprensión de las interacciones entre tipo de fibra de uso frecuente en la ganadería argentina y los niveles de almidón de la dieta permitiría una mayor precisión en la formulación de la alimentación y una mejor predicción de la respuesta animal.

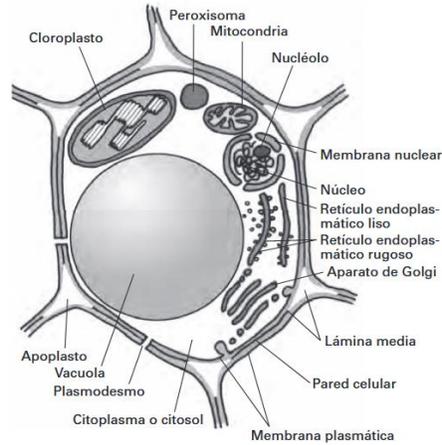


Figura 1.1. Representación esquemática de una célula del parénquima de una planta. (Extraído de Ascon-Bieto y Talon, 2008).

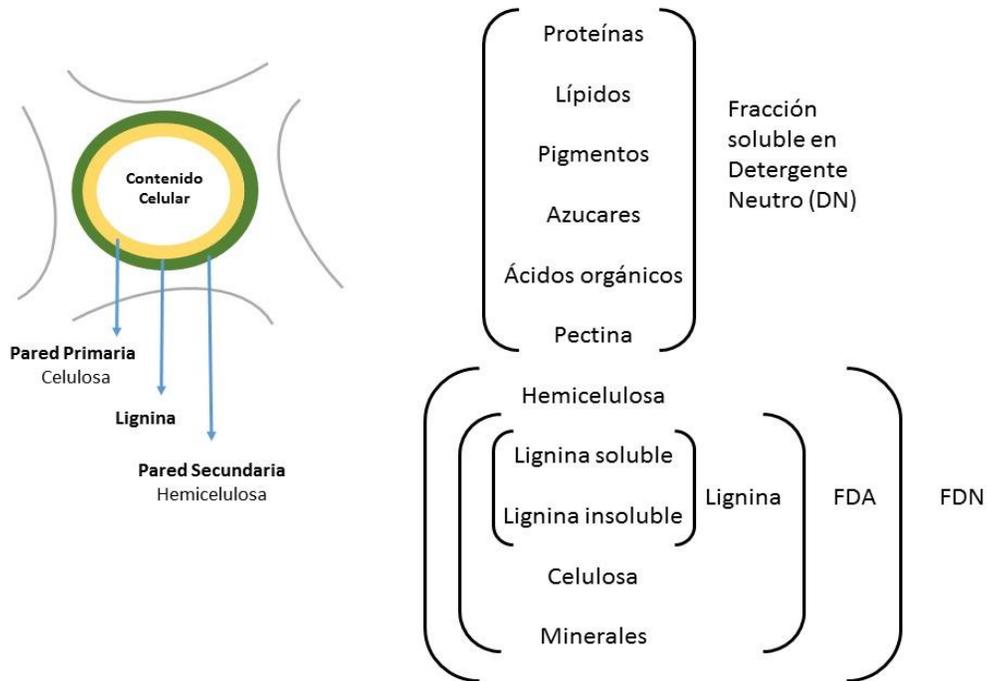


Figura 1.2. Representación esquemática de Método Van Soest.

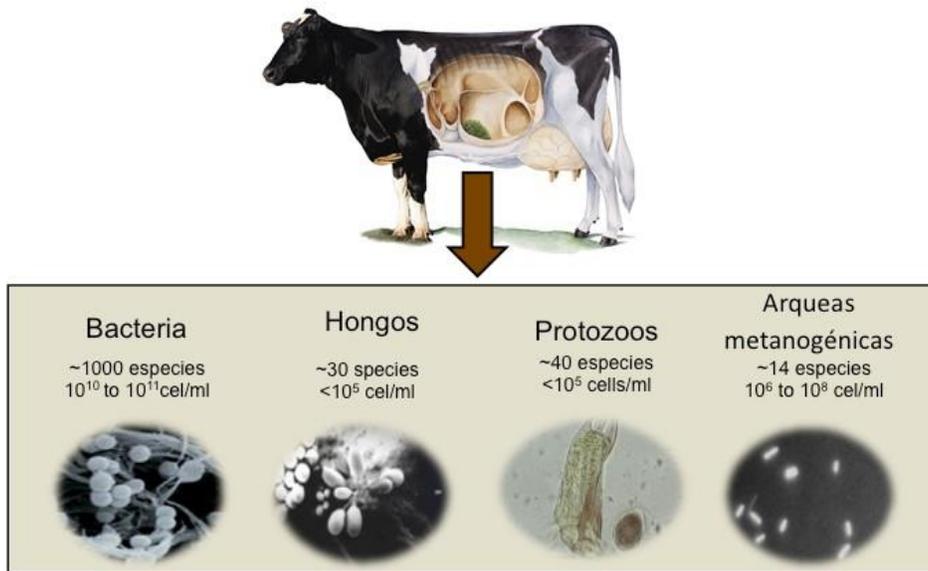


Figura 1.3. Microflora ruminal.

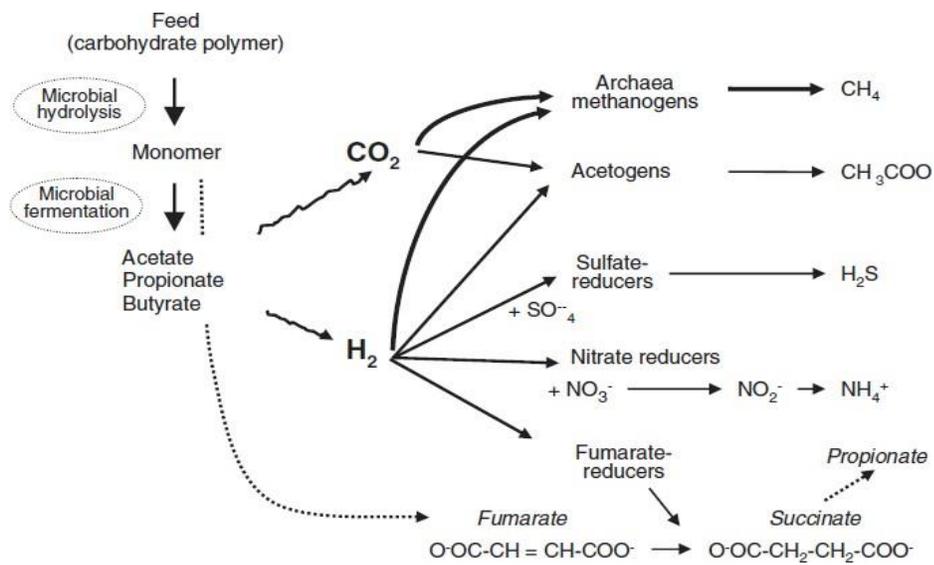


Figura 1.4. Metabolismo Ruminal de Hidratos de Carbonos.

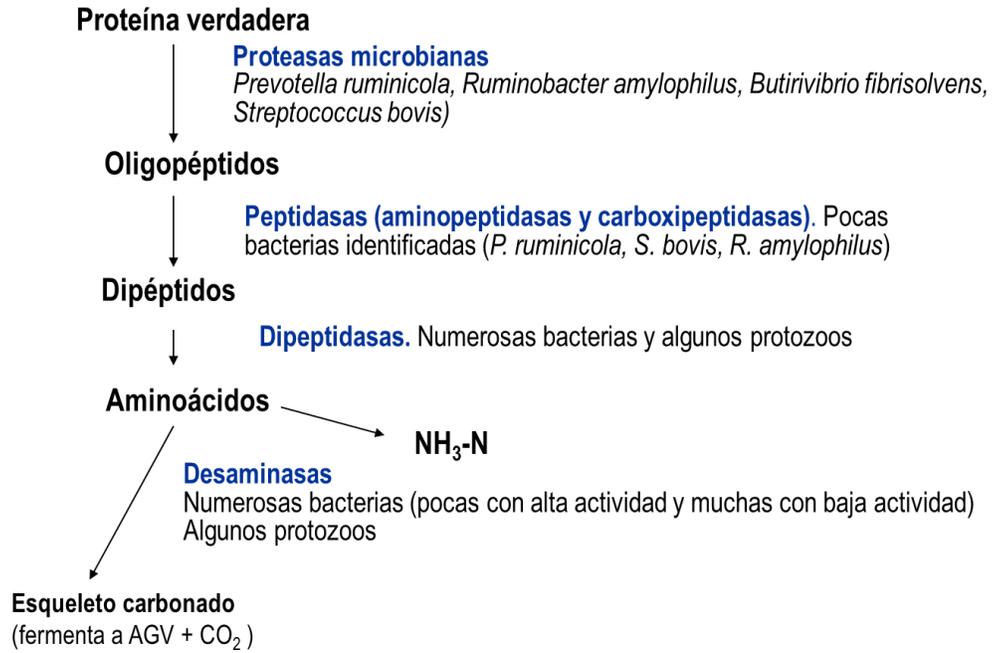


Figura 1.5. Metabolismo ruminal de Proteínas

## **CAPITULO 2: CINÉTICA DE DEGRADABILIDAD RUMINAL DE DISTINTAS FUENTES DE FIBRA EN AMBIENTES RUMINALES CON 0, 30 Y 60% DE GRANO DE MAÍZ ENTERO EN LA DIETA**

---

### **2.1 INTRODUCCION**

La información presentada precedentemente (Capítulo 1) sugiere que la adición de grano de maíz a las dietas provoca modificaciones en el ambiente ruminal, pero estas modificaciones no sólo dependen de la proporción de agregado de maíz en la dieta, sino también de la disponibilidad de este sustrato para la microflora ruminal (Mould et al., 1983). El factor más importante que afecta la disponibilidad del almidón en el grano de maíz es el tipo de endosperma. A medida que aumenta la proporción de endosperma córneo aumenta la dureza o vitrosidad del grano de maíz, la cual es mayor en maíces duros (también conocidos como flint) que en semi-dentados y mayor en éstos que en dentados (Rooney y Pflugfelder, 1986; Montiel y Elizalde, 2004; Ingentron et al., 2013).

La consecuencia de la incorporación de granos a la dieta de rumiantes es la disminución del pH ruminal. Esta disminución genera un retardo en la degradación de la fibra en el rumen (Erfle et al, 1982; Mould y Ørskov, 1983; Mould et al., 1984; Hoover, 1986), hecho que se ha explicado a través del descenso de la población microbiana fibrolítica, ya que estas bacterias pueden sufrir una reducción en su capacidad de adhesión a las partículas del alimento, y/o una disminución de su tasa de replicación (Cheng et al., 1980; Russell y Dombrowski, 1980). Sin embargo, la degradación de la fibra no sólo depende del ambiente ruminal, sino también del tipo de fibra, la rapidez con la que se fermenta y cuánto tiempo es retenida en el rumen. Como se describiera en el Capítulo 1, la fracción fibrosa de los forrajes varía según la especie, estado fenológico de la planta, condiciones ambientales y procesamiento, entre otras causas. No toda la fibra es potencialmente fermentable, por ejemplo la fibra lignificada no está disponible para ser fermentada, independientemente del tiempo que pase en el rumen (Allen, 1996).

La información es menos profusa respecto de los efectos de la composición y origen o fuente de la fibra y la dinámica de la fermentación en dietas con distinto contenido de grano. Burroughs (1949) investigó los efectos del almidón de maíz en combinación con dos materiales fibrosos: marlo de maíz y heno de alfalfa. En el trabajo se observó que con cada incremento de almidón la digestibilidad de la del marlo disminuye, sin embargo, este efecto no fue observado con alfalfa. La interacción entre el nivel de almidón y la fuente de fibra fue explicada en base a la adecuación relativa de nutrientes requeridos por los microorganismos ruminales y la capacidad de los forrajes de suministrarlos. Mould et al. (1983) reportaron resultados similares en el estudio de diferentes forrajes con alto contenido fibroso (henos y pajas) donde la suplementación con cebada provocó una menor degradación del forraje de menor calidad.

En los ensilajes, la fracción vegetativa es un importante componente de la planta, en consecuencia, forma parte de una gran proporción del material a ensilar. La degradabilidad de esta fracción puede estar afectada por la compleja estructura de la pared celular y por el contenido de almidón en la fracción grano del ensilaje. Numerosos trabajos han evaluado la degradabilidad en ensilajes de maíz y sorgo de planta completa (Colombini et al., 2010; Di Marco et al., 2005; Di Marco et al., 2009; Peyrat et al., 2014; Thomas et al., 2013), pero pocos trabajos estudiaron diferencias en la degradabilidad de la fracción vegetativa, evitando el efecto positivo o negativo que podría tener el contenido de grano sobre la degradabilidad de la misma. Para evitar este efecto, Ressa 2007 cortó híbridos de sorgo al comienzo de panojamiento, de manera de obtener un material con la máxima proporción de fracción vegetativa en el ensilado. El problema que presenta el corte temprano del material es, que en este estado fisiológico los fotosintatos almacenados en el tallo comienzan a moverse hacia el grano. De esta manera, la composición química de la fracción vegetativa de estos ensilados difiere de la fracción vegetativa encontrada en los ensilajes que se confeccionan en un estadio fisiológico posterior. Es por esto que para estudiar la degradabilidad de la fracción vegetativa de los diferentes materiales en el presente ensayo, las

plantas se cortaron en el estadio fisiológico óptimo para la producción de ensilaje recomendado para cada especie.

En base a los antecedentes expuestos se formuló la hipótesis de que el grado y tasa de degradación de diferentes fuentes fibrosas provenientes de la fracción vegetativa de ensilajes (desprovistos del contenido de grano) se verán disminuidos por la adición de 60% de grano de maíz a la dieta base. Esta reducción tendrá un mayor impacto en la degradación de la fracción vegetativa de un material con alto contenido de fibras, como el forraje de pasto llorón diferido, en comparación con la fracción vegetativa de los ensilajes de maíz y sorgo. El presente trabajo propone contribuir al estudio de la dinámica de la fermentación ruminal de diferentes materiales fibrosos, expuestos a ambientes ruminales con distinto contenido de almidón, logrados a través del suministro de tres niveles de grano de maíz entero tipo semi-duro en la dieta (bajo: 0%, intermedio: 30% y alto: 60%).

## **2.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.2.1 Sitio experimental**

El estudio se realizó en instalaciones de la Estación Experimental INTA Anguil, ubicada en la Provincia de La Pampa, Argentina (36° 32´ latitud sur y 63° 59´ longitud oeste), en los meses de junio y julio del 2018, cumpliendo con las regulaciones de bienestar animal establecidas por el Comité Nacional de INTA para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAE INTA) Resolución: 533/16.

### **2.2.2 Animales, alimentación y diseño experimental**

Se utilizaron tres vacas Angus de 6 años de edad, de  $563 \pm 60$  kg de peso vivo con fístula ruminal, las cuales se mantuvieron al aire libre en corrales individuales con agua disponible a voluntad.

Se alimentaron una vez al día (a las 8 h) con una dieta totalmente mezclada a base a heno de moha, expeller de soja, y grano de maíz (GM) en función del nivel previsto: 0, 30 o 60% en base seca de la dieta (0GM, 30GM y 60GM, respectivamente). Las dietas fueron iso-proteicas, y el contenido de PB (proteína bruta) se fijó entre 13,2 y 14,5 % (base seca). El tamaño de partícula del heno en la dieta total mezclada fue de 3-5 mm. Las dietas presentaron la composición química detallada en la Tabla 2.1.

El experimento se diseñó como un cuadrado latino (3 X 3) (Sokal y Rohlf, 1995) y los animales se distribuyeron al azar en los siguientes tratamientos T1: 0GM, T2: 30GM y T3: 60GM. El esquema, correspondiente al diseño experimental, dentro del ensayo fue el siguiente:

Períodos	Tratamientos		
	0GM	30GM	60GM
A	Vaca 1	Vaca 2	Vaca 3
B	Vaca 3	Vaca 1	Vaca 2
C	Vaca 2	Vaca 3	Vaca 1

Cada período del diseño cuadrado latino tuvo una duración de 27 días. Los primeros 21 días fueron de adaptación a las dietas. Durante los días 25, 26 y 27 de cada período se realizaron los muestreos para el estudio de degradabilidad ruminal. El último día de cada período se determinó pH y se muestreó licor ruminal para determinar amonio. La vaca a la que se le asignó el mayor porcentaje de maíz (60%) en la dieta, recibió un aumento gradual de la proporción de grano, para reducir el riesgo de trastornos digestivos por el cambio de contenido de almidón en la dieta.

Para evaluar los efectos e interacciones en la degradabilidad ruminal de la materia seca (DgMS) y la degradabilidad ruminal de las fracciones de FDN, DFA y PB, se utilizó un arreglo factorial de 5 X 3 (5 materiales fibrosos X 3 ambientes ruminales). Los materiales fibrosos a evaluar fueron: ensilajes de planta de maíz sin grano (SPM), de sorgo granífero sin grano (SSG), y de sorgo forrajero (SSF). También se evaluó forraje de pasto llorón (PLL) y papel Whatman (CEL) como modelo de degradación de la celulosa pura.

### **2.2.3 Determinación del pH y del nitrógeno amoniacal ruminal**

De cada animal se extrajo licor homogeneizado de las regiones del saco craneal y las partes media ventral y caudal del rumen a la hora 0 (previo al suministro de alimento) y 2, 4, 8, 12 y 24 horas después de ofrecer el alimento. Sobre el licor ruminal filtrado (25 ml de líquido) se determinó el pH inmediatamente. Posteriormente el líquido se acidificó con ácido sulfúrico para determinación de nitrógeno amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) (Broderick & Kang, 1979).

#### **2.2.4 Materiales fibrosos evaluados**

Se incluyó el estudio del material fibroso de tres ensilajes de planta de maíz (SPM), sorgo granífero (SSG), y sorgo forrajero (SSF). También se utilizó heno de Pasto llorón (PLL), como referencia de un forraje de baja calidad y papel de filtro Whatman (CEL), como modelo de la degradación de la celulosa.

Para la confección de los ensilajes se procedió a cortar los híbridos de maíz y sorgo cuando el grano presentaba madurez pastosa (estado 7 en la escala fenológica de Vanderlip y Reeves, 1972), mientras que el sorgo forrajero se cortó según Kent (2019), cuando la planta entera alcanzó un contenido de materia seca entre el 30 y 40 %. El material cortado se separó en fracciones retirando las espigas o panojas según la especie para evitar los efectos interactivos y distorsivos del factor almidón en el tratamiento (Ressia, 2007). La materia seca (MS %) de los materiales a ensilar (desprovistos de grano) fue de 22,7; 29,5 y 29,8 % para el SPM, SSG y SSF, mientras que la MS de la planta entera antes de ensilar fue de: 36,8; 40,1 y 33,8 para SPM, SSG y SSF, respectivamente. Inmediatamente después del retiro de las fracciones antes mencionadas, el material se picó a 2 cm y se procedió al ensilado. Para ello se lo introdujo en baldes de 20 litros y compactó manualmente hasta obtener una densidad de 550 kg/m<sup>3</sup>, incluyendo entre 11 y 12 kg de material verde por cada silo. Luego del llenado del recipiente, cada unidad se selló para lograr la condición de anaerobiosis propia del ensilaje y favorecer la fermentación láctica. Los silos permanecieron cerrados durante 30 días.

Por otro lado, en el mes de abril se cortó y picó material de pasto llorón antes de que entrara en dormancia por efecto de las primeras heladas. El papel de filtro utilizado como modelo de celulosa pura se molió en procesadora para aumentar la disponibilidad del sustrato y que la estructura no representara un impedimento.

### 2.2.5 Análisis químicos de los materiales fibrosos

Cumplido el período de ensilado, para la evaluación de los ensilajes se tomaron cinco muestras al azar de distintos lugares de cada microsilo, descartando las partes superior e inferior. Luego de homogeneizada, cada muestra se secó en estufa con circulación de aire forzado a 60°C, hasta peso constante. Una fracción de cada muestra de ensilaje y pasto llorón se molió a 2 mm con un molino tipo Willey, mientras que el resto se reservó para realizar las mediciones de degradabilidad *in situ*.

En las muestras molidas se realizaron los análisis de materia seca (MS, 4 hs a 105 °C por diferencia de peso entre material original y material seco), fibra en detergente neutro y ácido (FDN y FDA; Van Soest et al., 1991 y Van Soest 1973) y proteína bruta (PB, N Kjeldhal x 6,25, AOAC 1990). La composición química de los ensilajes de planta de maíz (SPM), sorgo granífero (SSG) y sorgo forrajero (SSF) así como la de PLL y CEL se detalla en la Tabla 2.2.

### 2.2.6 Incubación en el rumen

Los recursos fibrosos, previamente secados en estufa, se molieron a través de un molino con criba de 5 mm. Esto se hizo para estandarizar las muestras de silajes de maíz y sorgo, y pasto llorón. Se podrían haber usado en fresco tanto los silajes como pasto llorón, pero hubiera dificultado la logística del ensayo. El papel de filtro (CEL) se molió en procesadora para alcanzar similar tamaño de picado que los forrajes. Se pesaron  $5 \pm 0,05$  g MS de cada material molido en bolsas de dacrón/poliéster para análisis *in situ* (ANKOM Co, Fairport, NY), con dimensiones de 10 x 20 cm y con un tamaño de poro de  $50 \pm 3$   $\mu$ m, de acuerdo a Mehrez y Ørskov (1977).

Se incubaron un total de 1080 bolsas de dacrón resultantes de la combinación de 8 horas de incubación, 5 fuentes de fibra en estudio, en 3 animales por triplicado durante 3 períodos de alimentación, todas por triplicado.

Las bolsas fueron introducidas en el rumen en función de los horarios previstos, y retiradas todas juntas al concluir el ensayo. Para garantizar la permanencia de las bolsitas en la parte ventral del rumen se usó un tapón de goma de 7 cm de diámetro que sostuvo la red que contenía las bolsitas a incubar. Previo a la incubación en el rumen las muestras fueron sumergidas en agua limpia a la misma temperatura del rumen por 30 seg, con el propósito de ser prehidratadas. Si bien se midió la pérdida del material por diferencia de peso a la hora cero, este dato no se descontó en los horarios de incubación posteriores ya que se consideró despreciable y que no afecta las tendencias. Finalizado el ensayo se realizó un lavado de las bolsas ruminales con agua fría y se congelaron a -20°C.

### 2.2.7 Determinaciones

En el residuo de las bolsas se estimó el contenido de materia seca; y luego las muestras fueron molidas a 1 mm para su posterior análisis químico. Además, se analizaron muestras del material antes de ser incubado en las bolsitas. A cada una de ellas se le realizaron determinaciones de Fibra en Detergente Neutro (FDN), Fibra en Detergente Acido (FDA) y Proteína bruta (PB) mediante tecnología NIRS utilizando las calibraciones detalladas en el capítulo 4.

Degradabilidad ruminal de la materia seca (MS), fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA) y proteína bruta (PB).

Los porcentajes de degradación de materia seca (MS) (DgMS), FDN (DFDN), FDA (DFDA) y PB (DPB) en cada tiempo de incubación se calcularon con la siguiente fórmula:

$$\text{Degradabilidad (parámetro), \%} = \frac{\text{Peso inicial} - \text{Peso final}}{\text{Peso inicial}} * 100$$

Peso inicial

### 2.2.8 Análisis estadístico

El diseño experimental del ensayo *in situ* fue un cuadrado latino (3 x 3). Los parámetros evaluados se analizaron como medidas repetidas en el tiempo mediante ANOVA utilizando el procedimiento MIXED de SAS (SAS Institute Inc., 2001) donde la unidad experimental fue el animal. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando  $P \leq 0,05$ ; mientras que cuando  $0,05 \leq P \leq 0,10$  se consideró como tendencia estadística. Las medias se compararon mediante la prueba de Fisher.

Para la evaluación de los parámetros asociados al ambiente ruminal: pH y NH<sub>3</sub> se empleó el siguiente modelo:

$$Y = \mu + T + A + P + \varepsilon_1 + H + H * T + H * A + H * P + \varepsilon_2$$

Dónde:

Y = Variable respuesta

$\mu$  = media general

T = Efecto de la adición de grano de maíz a la dieta (0, 30 y 60% GM)

P = Período

A = Animal (Factor Aleatorio)

H = Horas de incubación

$\varepsilon_1 = A * P * T$

$\varepsilon_2 = Mat * T * P * A$

Las variables: DgMS, DFDN, DFDA y DPB se analizaron de acuerdo al siguiente modelo:

$$Y = \mu + T + P + A + \varepsilon_1 + Mat + Mat * T + Mat * P + Mat * A + \varepsilon_2 + H + H * T + H * P + H * A + H * T * P * A + H * Mat + H * Mat * T + H * Mat * P + H * Mat * A + \varepsilon_3$$

Dónde:

Y = Variable respuesta

$\mu$  = media general

T = Efecto de la adición de grano de maíz a la dieta (0, 30 y 60% GM)

P = Período

A = Animal (Factor Aleatorio)

H = Horas de incubación

Mat = Material

$\epsilon_1 = A * P * T$

$\epsilon_2 = Mat * T * P * A$

$\epsilon_3 = H * Mat * T * P * A$

## 2.3 RESULTADOS Y DISCUSION

### 2.3.1 Parámetros asociados al ambiente ruminal: Evolución del pH y el N-NH<sub>3</sub>

La formulación de la dieta original de los animales del presente estudio, se realizó a partir de heno de moha. Las dietas basadas en heno son más predecibles debido a que presentan menor efecto interactivo con otros componentes de la dieta y proveen mejores condiciones de medición. Se podría haber formulado dietas a base de ensilado para simular mejor las condiciones *in vivo*. Sin embargo, una dieta a base de ensilaje genera un ambiente ruminal que puede afectar la acidez del rumen, donde los ácidos débiles del ensilaje, operarían en la dirección de la regulación del pH (efecto *buffer*). Esto puede perturbar la respuesta al efecto en estudio. Si bien, la estructura de dieta seca podría afectar la población microbiana respecto de la generable en el contexto de ensilajes, esto sucedería hasta cierto punto. No existen reportes claros respecto de diferencias en la composición de población microbiana en dietas basadas en ensilajes contra henos para un mismo nivel de almidón y contenido proteico. Por otro lado, el ensilaje, afecta el consumo ya que aumenta la palatabilidad de la dieta. Por estos efectos las dietas se formularon a base de heno. A continuación se detallan los resultados obtenidos.

El pH de los distintos ambientes ruminales generados sufrió un efecto por la adición de grano de maíz (GM) ( $P < 0,01$ ) a lo largo del tiempo de incubación (Horas) ( $P < 0,01$ ), sin interacción entre GM y Horas ( $P = 0,69$ ) (Tabla 2.3).

En promedio, los valores de pH fueron de 6,70; 6,42 y 6,39 para dietas con 0GM, 30GM y 60GM, respectivamente, en todos los casos cercanos al óptimo para la actividad celulolítica reportado en la literatura ( $6,7 \pm 0,5$  de acuerdo a Van Soest, 1994). Estos valores de pH harían posible la presencia de todos los componentes de la biomasa microbiana, principalmente bacterias celulolíticas, protozoos y hongos (Molina et al., 2002). Sin embargo, estudios previos han

reportado que el aumento de un sustrato fermentable en la dieta (grano) provoca un cambio en la estructura y diversidad de población microbiana ruminal (Fernando et al. 2010). Muchos autores han demostrado que el procesado del grano de maíz, en la dieta, favorece la ruptura de la matriz proteica que contiene los gránulos de almidón, mejorando su digestibilidad en todo el tracto digestivo (Camps y González, 2003; Maresca et al., 2004; Pordomingo, 2013). Esta ruptura de la matriz proteica puede realizarse durante la masticación del grano por parte del animal. En animales jóvenes (de menos de 270 kg de peso vivo), no habría diferencias significativas en cuanto a la eficiencia de utilización del maíz cuando es ofrecido entero o partido (Maresca et al., 2003). En el caso de las vacas fistuladas utilizadas en el presente estudio esto podría haber influido en los resultados subestimando el efecto del agregado de grano de maíz en la dieta.

El pH inicial, antes del suministro del alimento, fue similar en los tres tratamientos ( $P > 0,10$ ). Lo mismo ocurrió a las 2 horas post consumo, mientras que a las 4 horas el pH de la dieta 30GM resultó diferente del de 0GM, observándose valores intermedios para la dieta 60GM. A las 8 horas el pH vuelve a ser similar entre los tratamientos, sin diferencias estadísticas ( $P > 0,10$ ). Estas similitudes y leves fluctuaciones en los valores de pH podrían deberse a que, como se ha reportado (Fernando et al. 2010), cuando los animales cambian de una dieta a base de forraje a una dieta alta en concentrados la diversidad microbiana en términos de especies sigue siendo similar, pero lo que varía es la prevalencia de algunas especies por sobre otras, debido a que la microbiota cambia para adaptarse al nuevo ambiente ruminal. Incluso se ha encontrado un aumento de las poblaciones de *Selenomonas ruminantium* y *Megasphaera elsdenii* durante la adaptación a una dieta alta en concentrados, lo cual se ha asociado a la disminución de las concentraciones de ácido láctico que se generan (Fernando et al. 2010).

Varios reportes mencionan una mayor estabilidad del pH ruminal cuando los animales son alimentados con mayor frecuencia (Nocek y Braund, 1985; Sutton et al., 1986; French y Kennelly, 1990; Yang y Varga, 1989; Soto-Navarro et al., 2000;

Robles et al., 2007). Incluso se ha reportado que en animales alimentados más de una vez al día, los fluidos ruminales muestreados hasta 20 horas después de la alimentación presentan una población microbiana estable (Trujillo et al 2010). El hecho de dar de comer una sola vez al día a los animales del presente ensayo puede haber afectado la estabilidad del pH ruminal y por ende la degradación ruminal de los materiales evaluados. Sin embargo, las dietas que se formularon tenían un alto contenido de fibra, aún las que contenían mayor proporción de grano. La presentación del grano y los otros componentes (que hacían presumir una disponibilidad del almidón en forma progresiva), no necesariamente estuvo correlacionada con el momento de suministro, por lo que no ameritaba el esfuerzo de la alimentación con mayor frecuencia. Ocurre también que en la extrapolación a planteos comerciales donde el ensilaje es base de dietas desdobladas, el suministro del suplemento rico en almidón ocurre una vez al día. Aunque este experimento no fue planteado sobre esas bases, no se consideró como relevante la alimentación repartida en el día. Finalmente, se justificó el escenario de un suministro creando un escenario en el que el efecto, de existir, se magnificara eventualmente. Como se vió, en varias ofertas diarias, el efecto sobre el pH ruminal y la estabilidad de la fermentación sería más probable y entonces menos evidente un efecto sobre la degradabilidad de la fracción fibrosa.

Lechartier y Peyraud (2011) encontraron que la caída de pH se presentaba entre las 3 y 6 horas luego de consumido el alimento cuando las dietas contenían diferentes tipos de carbohidratos rápidamente fermentecibles (almidonosos y no almidonosos). En el presente estudio, hubo una tendencia hacia la disminución del pH en rumen a medida que avanzaban las horas, donde el valor más bajo se midió luego de 12 horas de ofrecido el alimento, observándose diferencias estadísticas entre los tratamientos ( $P < 0,01$ ). En ese horario en particular, el pH resultó mayor para 0GM (pH= 6,76), seguido por 30GM (pH= 6,19) y en último lugar 60GM (pH= 5,93). Este desplazamiento de horario en el descenso de pH podría deberse a la presentación del almidón ofrecido al animal (grano entero) o al tipo de grano. El maíz semi-dentado utilizado en la dieta base de este ensayo presenta una menor

degradabilidad ruminal temprana que los granos tipo dentado utilizados en la bibliografía mencionada (Montiel y Elizalde, 2004; Philippeau et al., 2000).

El tiempo durante el cual el pH permanece debajo del valor crítico es considerado más importante que el valor promedio de pH, ya que la actividad celulolítica disminuye rápidamente cuando el pH cae de 6 a 5,8 (Mould et al., 1984). Lechartier y Peyraud (2011) reportaron que el tiempo en el que el pH permanecía por debajo de 6 fluctuaba entre 1,8 y 5,4 horas dependiendo de la combinación en la formulación de la dieta. En nuestro estudio, el lapso de tiempo durante el cual el pH permaneció debajo de 6 fue de 2 horas para 60GM, lo cual coincide con lo encontrado por Lechartier y Peyraud (2011) para dietas formuladas con 41% de almidón más 23% de carbohidratos fácilmente degradables.

Por último, a las 24 horas no se observaron diferencias entre los valores de pH de 0GM, 30GM y 60GM ( $P > 0,10$ ) y tampoco diferencias entre estos valores de pH y los iniciales (hora 0) ( $P > 0,10$ ).

Se detectó un efecto del agregado de GM a la dieta ( $P < 0,01$ ) a lo largo del tiempo de incubación (H) ( $P < 0,01$ ), sin interacción entre GM y Horas ( $P = 0,62$ ) para N-NH<sub>3</sub> (Tabla 2.3). La concentración media de N-NH<sub>3</sub> observada fue de 10,59; 10,02 y 6,80 mg/dL para las dietas 0GM, 30GM Y 60GM, respectivamente. Si bien la concentración de N-NH<sub>3</sub> en las dietas de estudio se encuentra dentro del rango óptimo para la síntesis de proteína microbiana reportada en la bibliografía (5,6 - 10,0 mg de NH<sub>3</sub>/100 ml de fluido ruminal) (Satter y Slyter, 1974; Van Soest, 1994), se observó que fue mayor para dietas 0GM y 30GM que para la dieta 60GM. Esto se debería a que en 60GM hay un mayor consumo de amoníaco por parte de los microorganismos ruminales, al tener disponibles más carbohidratos no estructurales como el almidón (Garriz y López, 2002). En consecuencia, la síntesis de proteína microbiana se incrementa por la inclusión de moderadas cantidades de carbohidratos fácilmente fermentables en la dieta (Dewhurst et al. 2000). Al igual que el presente estudio, Arelovich et al. (2003) reportaron una disminución de la concentración de N-NH<sub>3</sub> con el suministro de almidón de maíz o avena a bovinos, incluso en cantidades limitadas. Este hecho

fue adjudicado, también, al aumento de la captura de N por los microorganismos ruminales al aumentar la oferta de carbohidratos rápidamente fermentecibles (Bargo et al., 2003, Jones-Endsley et al., 1997; Bargo et al., 2002). Ese efecto se traduciría en una mayor eficiencia de utilización del N dietario (Berzaghi et al., 1996; Carruthers et al., 1997). El consumo temprano de  $\text{NH}_3$  del presente estudio en 60GM podría deberse también, a la energía disponible de la fermentación del grano de maíz del día anterior o a la energía proveniente de la fibra que retardó su digestión entre las 11 y las 13 horas post suministro de alimento, donde el pH ruminal estuvo debajo de 6.

Entre las 0 y 4 horas la respuesta observada en  $\text{NH}_3$  y pH se deben probablemente a la degradación del expeller de soja de la dieta base. El contenido de N- $\text{NH}_3$  en 60GM fue inferior al de 0GM y 30GM en los horarios de muestreo 2 y 4 h. En este horario 0GM y 30GM presentaron el mayor pico de producción de N- $\text{NH}_3$ , con una diferencia de 7 puntos porcentuales respecto de 60GM ( $P < 0,05$ ). Los picos en las concentraciones de N- $\text{NH}_3$  encontrados en 0GM y 30GM coinciden con los reportados por Molina et al. (2002) quienes utilizaron como dieta base heno de pasto bermuda con 85,8% MS; 17,2% PB y 73,9% FDN. En este tipo de dietas se da que hay degradación de la PB de la dieta sin energía disponible, algo muy diferente a lo que ocurre en 60GM.

Para 60GM el N- $\text{NH}_3$  estuvo por debajo del óptimo (5,6  $\text{NH}_3/100$  ml de fluido ruminal) entre las 7 y 19 horas post consumo, mientras que el pH estuvo por debajo de 6,0 entre las 11 y las 13 horas. Esto sugiere que pudo haberse visto afectada la degradación de las bolsas que contenían el material fibroso que entraron a las 12 horas al rumen.

Por otro lado, el descenso del pH en 30GM y 60GM a la hora 12 post suministro coincidió con la mínima concentración de  $\text{NH}_3$  detectada para ese mismo horario de muestreo, indicador de pérdida temporal de la capacidad buffer del ambiente ruminal.

### 2.3.2 Degradabilidad ruminal de las fracciones de MS, FDN, FDA y PB

Hubo una interacción GM x Hora para la degradabilidad ruminal de la celulosa al 98% (CEL, patrón de la degradación de este polisacárido) ( $P = 0,01$ ). En general, CEL describió un patrón típico de degradación ruminal (pH entre 6,8 y 7,5) (Hu et al., 2004, 2005) cuando se incubó en 0GM, mientras que en 30GM y 60GM se vió alterado (Tabla 2.4). Hasta las 24 horas de incubación la degradación ruminal de CEL fue similar en los ambientes ruminales experimentales ( $P > 0,05$ ), con una tendencia ( $0,05 > P > 0,1$ ) a ser un 57% menor en 60GM que en 0GM y 30GM. A las 48 horas, la degradabilidad ruminal de CEL en 30GM fue similar ( $P > 0,10$ ) a la alcanzada en 0GM y éstas mayores en un 139% que 60GM ( $P < 0,01$ ). Al concluir el ensayo, la degradabilidad ruminal de CEL fue igual en los tres ambientes ruminales testeados ( $P > 0,10$ ).

Numerosos trabajos señalan que el pH es el parámetro del ambiente ruminal que más afecta la degradación de la celulosa ya que se produce una perturbación en la microbiota (Mouriño et al., 2001; Hu et al., 2004, 2005). Estudios *in vitro* (Hu et al., 2004; Russell et. al 2009; Russell y Wilson, 2010) han indicado que la digestión de la celulosa puede ser severamente inhibida por modestas desviaciones en el pH ruminal. Hu et al. (2004) reportaron que la hidrólisis de la celulosa cristalina comienza a las 12 horas de incubación a pH constante de 6,8 y que luego de las 72 horas la curva presentaría un *plateau* donde la degradación ya no progresa. Esto es concordante con los resultados del presente estudio a excepción de la tasa con que se produce la degradación ruminal de la celulosa en los tratamientos con inclusión de grano de maíz en la dieta.

Al analizar SSG, SSF, SPM y PLL se detectó una interacción Mat x GM ( $P = 0,048$ ) (Tabla 2.5) para la variable degradabilidad *in situ* de la MS (DgMS). La inclusión de grano de maíz en la dieta provocó una disminución de DgMS. Al evaluar los resultados de DgMS de cada material a través de las diferentes horas de incubación se observa una interacción ( $P < 0,01$ ) (Tabla 2.6). El material SSG

presentó mayor DgMS seguido de SSF, SPM y PLL en todos los horarios. Esta respuesta resultó diferente a la esperada ya que, por las características de los materiales en estudio, SSF presentaría mayor degradación en las primeras horas que SSG y SPM, debido al mayor contenido esperable de carbohidratos rápidamente fermentecibles en la fracción tallo de sorgo forrajeros reportados en la bibliografía (Kaiser et al., 2004, Behling Neto et al., 2017). Por otra parte, en la tabla 2.2 vemos que SSF tiene mayor contenido de FDN y FDA que el SSG y menos que el SPM. La divergencia entre las respuestas observadas y las esperadas entre SSF y SSG pondría en revisión la expectativa de oferta nutritiva de los SSF en la región, posiblemente correlacionada a las condiciones ambientales de producción de esos materiales.

Por otro lado, la inclusión de GM en la dieta, no afectó la DgMS en el rango de las 0 a las 8 horas de incubación (Tabla 2.7). Cabe destacar que existe una alta chance de que la inclusión de bolsas ruminales ocurra en momentos diferentes de pH ruminal, con lo cual se afecte la accesibilidad al material en estudio durante los primeros tiempos de incubación en el rumen. Esto se debe a la metodología empleada para evaluar la degradabilidad ruminal de los distintos materiales. La técnica de incubación *in situ* inversa (MI), consiste en adicionar bolsitas ruminales que contienen el material a evaluar en diferentes horarios, empezando con aquellas que permanecerán más tiempo en el rumen. Luego de concluido el ensayo, se retira la totalidad de las bolsitas ruminales. Esto trae aparejado una disminución en la tasa de degradación del material y un mayor tiempo requerido para el comienzo de la degradación de la celulosa que el método *in situ* directo en donde incubación de las bolsas ruminales coinciden con los tiempos post alimentación y de caracterización del ambiente ruminal (Dong et al., 2017). Es por esto que la respuesta de DgMS en el rango entre las 0 y las 8 horas puede haber sido afectada no solo por las dietas evaluadas sino por el método de incubación *in situ* empleado. En cuanto a la caracterización ruminal, cuando se utiliza MI, debería incluir el muestreo entre las 12 y 24 horas post alimentación, no sólo para tener mejores curvas que describan el comportamiento del pH y N-NH<sub>3</sub> ruminal,

sino para tener una mejor caracterización del ambiente ruminal en las primeras horas de muestreo para la evaluación de degradabilidad *in situ*.

Otro factor que puede haber influido en los resultados observados en los primeros horarios de degradación ruminal es el secado de las muestras a incubar. El proceso de deshidratación por calor, aún a temperaturas moderadas como 60 °C induce a cambios en el forraje, por lo que es de esperarse que provoque cambios en las características de digestión del mismo. Entre estos cambios se pueden mencionar modificaciones en las propiedades de la pared celular, en las barreras protectoras de la planta, en los puntos de ataque utilizados por los microorganismos o en la disponibilidad de los nutrientes (Jaurena et al., 1997; Lowman et al., 1992). El secado a 60 °C, provoca que la colonización por parte de los microorganismos ruminales sea más lenta que si las muestras se encontraran frescas (Calabro et al., 2005). En muestras de ensilajes, se ha encontrado que las fuentes de energía y nitrógeno, como ácido láctico y amoníaco, fueron menores a las concentraciones obtenidas de muestras sin secar. Esto repercute en la disponibilidad de los nutrientes, por lo tanto, el proceso de fermentación de muestras secas alcanza la velocidad máxima en aproximadamente el doble de tiempo que para muestras frescas (Calabro et al., 2005).

Como se detalló en la sección de Materiales y Métodos, se midió la pérdida del material por diferencia de peso a la hora cero. Sin embargo, este dato no se descontó en los horarios de incubación posteriores ya que se consideró despreciable y que no afecta las tendencias. No obstante, resulta importante mencionar que en esta fracción el material se pierde por tamaño y no por haber sido fermentado/degradado, lo cual generaría que la medición sobre la degradabilidad se sobreestime. En nuestra opinión, esto se dá en una proporción muy baja a lo largo de todos los tiempos de incubación. Por lo que no afectaría las diferencias significativas encontradas entre tratamientos.

Previo al suministro del alimento a las vacas, los valores de pH y N-NH<sub>3</sub> fueron de 6,61 y 9 mg/dL, respectivamente. Este ambiente ruminal fue el que recibió a las bolsitas ruminales colocadas en el rumen a la hora 12 de incubación

*in situ* donde comenzaron su degradación con valores de pH y NH<sub>3</sub> óptimos para el desarrollo de las bacterias celulolíticas. Luego, estas mismas bolsitas, tendrían una degradación influenciada por una tendencia hacia la disminución del pH en rumen a medida que avanzan las horas, en las dietas formuladas con agregado de grano de maíz (30GM y 60GM). Es por esto que a las 12 horas de incubación *in situ*, las dietas 30GM y 60GM proporcionan valores de DgMS menores a los que se reportan para la dieta 0GM (Tabla 2.7).

A las 12 horas post consumo del alimento el pH fue de 6,76 para 0GM, de 6,19 para 30GM y de 5,93 para 60GM, mientras que el contenido de N-NH<sub>3</sub> fue óptimo para 0GM y 30GM pero deficiente para 60GM. Si proyectamos estos valores en los horarios de incubación *in situ* podríamos asegurar que los ambientes ruminales descritos afectaron la incubación *in situ* de los materiales en los horarios de las 24, 48 y 72 horas. Esto explica que transcurridas 72 horas de incubación, la DgMS de la 30GM se equipara con la de 0GM con un valor promedio de 67,12 %, superando al valor alcanzado por la dieta 60GM de 61,01%.

Se detectó una triple interacción entre GM, Mat y Hora ( $P = 0,01$ ) (Figura 2.1) para la degradabilidad ruminal de la FDN (DFDN). En términos generales se observó que la DFDN no se vió afectada por la dieta 30GM con respecto a la dieta 0GM, pero el agregado del 60% de GM provocó una disminución en este parámetro. Estos resultados concuerdan con los reportados por Wanapat et al. (2014). En ese trabajo la DFDN no se vio influenciada en dietas cuya relación forraje:concentrado fue de 0,8:0,2 y 0,6:0,4, mientras que cuando la proporción de concentrado en la dieta aumentó de 0,4:0,6 a 0,2:0,8 la DFDN disminuyó linealmente. Li et al. (2013) observaron esta reducción en la DFDN en dietas con elevada proporción de concentrado en comparación con la dieta control, lo cual asociaron a la disminución del pH del ambiente ruminal.

Es sabido que la digestión de la fibra disminuye con el pH ruminal. El valor umbral de pH ampliamente aceptado es de 6,2 (CNCPS, Cornell Net Carbohydrate and Protein System), pero este valor de referencia está relacionado a la

disminución del pH como consecuencia de un consumo elevado de carbohidratos no estructurales. Mould et al., 1983 demostraron que el umbral de pH ruminal en el que se observa la disminución de la degradabilidad de la fibra era menor a 6,0-6,1, dependiendo de la calidad del forraje. En nuestro ensayo si bien los valores promedios de pH reportados fueron de 6,70, 6,42 y 6,30 para 0GM 30GM y 60GM, respectivamente, la disminución de la DFDN se dio por las fluctuaciones de pH en alguno horarios en dietas con mayor contenido de GM y niveles de  $\text{NH}_3$  bajos en concordancia con una fibra de baja calidad en la dieta base.

En la evaluación de los efectos por material y su interacción con GM y Hora (Figura 2.1) se puede observar que en los tiempos de incubación tempranos no hubo diferencias significativas entre los valores de DFDN de los cuatro materiales evaluados en los tres ambientes ruminales propuestos. Los puntos de tiempo de incubación mencionados coinciden con las horas 4, 8 y 10 post alimentación de las vacas, debido a la metodología de degradabilidad *in situ* inversa (MI) empleada. Esto provocó que las bolsas ruminales fueran retiradas del rumen cuando las actividades de las enzimas microbianas no estaban en los niveles máximos esperados para cada ambiente ruminal. Por otro lado, en los primeros tiempos de incubación sucede que la FDN parcialmente digerida podría solubilizarse en detergente neutro (durante el proceso de análisis de laboratorio) sin haber sido realmente fermentada y en consecuencia se podría haber registrado como degradada. En lo que respecta a este estudio, se encontró que el MI afectó la degradabilidad de la fracción de FDN a lo largo de todas las horas de incubación, sobreestimando la fracción indegradable de los materiales, razón por la cual no podemos ver la meseta a las 72 horas.

A las 24 horas SPM fue el único material que presentó valores de DFDN diferentes entre 0GM y los tratamientos 30GM y 60GM. No se reportó un efecto del agregado de grano de maíz en el resto de los materiales en este horario ( $P > 0,10$ ).

Una forma de evaluar la calidad de un forraje es por su digestibilidad potencial a las 48 horas (Oba y Allen 2005). Esto es porque 48 horas es el tiempo

de incubación más cercano al tiempo de retención de la digesta en el rumen de vaquillonas o vacas secas. Es por ello que los valores de DFDN en este horario revisten gran importancia. A las 48 horas los ensilajes tuvieron mayor DFDN que PLL ( $P < 0,05$ ). A su vez, SSG y PLL no presentaron diferencias en DFDN por el agregado de grano de maíz, mientras que SPM y SSF tuvieron una disminución de la DFDN con adición de grano de maíz. Para SPM la DFDN en 30GM y 60GM fue menor que la que se encontró para 0GM ( $P < 0,05$ ), mientras que para SSF la DFDN en 60GM fue menor que la que se encontró para 30GM y 0GM ( $P < 0,05$ ).

La fibra en su totalidad deja el rumen por digestión o por pasaje, mientras que la fibra indigestible abandona el rumen solo por pasaje. Entonces el tiempo de retención de la fibra indigestible refleja el tiempo máximo que la fibra permanece en el rumen. En nuestro ensayo este tiempo fue simulado y de 72 horas de duración. Este tiempo podría haber sido insuficiente ya que Dhanoa et al. (1988) establecieron que cuando se trata de alimentos de baja degradabilidad se debe tomar muestras en períodos más largos de tiempo de incubación, incluso hasta las 96 h. Esto es para asegurar que la curva de degradación del material alcance una asíntota, de manera razonablemente definida, donde muestre que la degradación del material ya no progresa. Incluso en trabajos más recientes de evaluación *in situ* de forrajes de calidad similar al PLL los tiempos se extienden hasta las 120 horas de incubación (Ribero et al., 2011; Muniz et al., 2008). Transcurridas 72 horas de incubación, las dietas 0GM y 30GM alcanzaron valores similares en DFDN ( $P > 0,05$ ) y estos valores fueron mayores que los reportados para 60GM ( $P < 0,05$ ) en cada uno de los materiales estudiados. La DFDN de los materiales provenientes de los ensilajes de maíz y sorgo fue mayor que la de PLL en 0GM y 30GM, con un promedio de 67% para ensilajes y de 45% para PLL. En dietas 60GM la DFDN fue menor que en 0GM y 30GM ( $P > 0,05$ ). Esta diferencia fue de 12,5% para el promedio de los ensilajes y de 22% para PLL.

Por otro lado, se detectó una interacción entre GM, Mat y Hora ( $P < 0,01$ ) para el parámetro degradabilidad ruminal de la FDA (DFDA) (Figura 2.2). Consecuentemente, se procedió a evaluar los efectos GM y Hora por material,

encontrándose el mismo patrón que para DFDA con la inclusión de distintos niveles de GM. Estos resultados coinciden con los publicados por Wanapat et al. (2014) quienes reportaron una disminución en DFDA a medida que la relación de forraje: concentrado de las dietas fue disminuyendo (0,8:0,2; 0,6:0,4; 0,4:0,6 y 0,2:0,8, con valores de pH de 6,4; 6,3; 6,2 y 5,9, respectivamente). Esos autores describieron una disminución lineal de la concentración de bacterias celulíticas (células/mL) en función del pH. La coincidencia entre los patrones de degradación de FDN y FDA se explicaría por el hecho de que las bacterias celulíticas predominantes reportadas por Wanapat et al. (2014), *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* y *Ruminococcus flavefaciens* poseen actividad tanto hemicelulolítica como celulolítica. El aumento en la proporción de concentrado en la dieta provoca a una disminución del pH con la consecuente reducción en el recuento de bacterias celulíticas, resultante en una menor degradación de los polisacáridos hemicelulosa y celulosa. Consecuentemente, ese efecto se traduciría en menor degradabilidad ruminal de las fracciones de FDN y FDA.

En el análisis por material se detectó que para los ensilajes, transcurridas 72 horas de incubación, las dietas 0GM y 30GM alcanzaron valores similares en DFDA ( $P > 0,05$ ) y estos valores fueron mayores que los encontrados para 60GM ( $P < 0,05$ ) en cada uno de los materiales estudiados. La DFDA de los materiales provenientes de los ensilajes de maíz y sorgo fue mayor que la de PLL en 0GM y 30GM, con un promedio de 65% para ensilajes y de 44% para PLL. En dietas 60GM la DFDA fue menor que en 0GM y 30GM ( $P > 0,05$ ). Esta diferencia fue de un 24% para PLL y de 13% para el promedio de los ensilajes

Al contrastar estos resultados con la degradabilidad ruminal del patrón celulosa (CEL), podemos ver que en los materiales de estudio existen limitaciones impuestas por la composición química de cada material. Estudios previos indican que los forrajes de alta calidad se ven menos afectados por la disminución del pH que los de baja calidad. Palladino et al. (2010) atribuyen este hecho a que el grado lignificación de la pared celular y la resistencia a la hidrólisis microbiana podrían estar involucrados en el mecanismo que conduce al mencionado efecto.

La celulosa totalmente disponible para su degradación (CEL) no se vió afectada por inclusiones del 30% de GM a la dieta, mientras que el agregado del 60% de GM afectó la degradación del polisacárido, en especial en el horario de las 48 horas de incubación. La restauración de los valores de degradabilidad de CEL a las 72 horas indica que la microflora ruminal fue capaz de compensar las fluctuaciones en su ambiente de manera de degradar todo el material disponible. En el caso de los materiales fibrosos evaluados la estructura de la pared celular afecta el comportamiento de la degradación de la celulosa en las matrices complejas. Un mayor contenido de celulosa lignificada de difícil degradación se podría presentar en PLL, comparada con la celulosa que podría encontrarse en SPM, SSG y SSF o totalmente disponible en CEL. También es posible que el ambiente del rumen que limita la degradabilidad de la fibra no sea el mismo para cada tipo de forraje. Es decir que la microflora podría adaptarse a las condiciones que impone la dieta y modificar así los límites de pH que provocan efectos negativos. Palladino et al (2010) encontró que la desaparición in vitro de FDN a las 48 h disminuyó por debajo del pH 6,1, llegando a una disminución de un 62% a pH 5,5 con respecto a los resultados a pH 6,4 y 6,1, donde se observaron los mayores DgMS y DFDN. Asimismo, de Veth y Kolver (2001) encontraron que la digestión de *Lolium perenne* L. no se vió afectada por encima de pH 5,8.

Se detectó una interacción entre los factores Mat y Hora ( $P < 0,01$ ) para el caso de la degradabilidad ruminal de la PB (DPB) (Tabla 2.7). No se detectó ningún otro tipo de interacción ni efecto por agregado de GM a la dieta ( $P = 0,59$ ). Calsamiglia et al. (2002) reportaron que la DPB se redujo cuando el pH se mantuvo constante en un nivel próximo a 5,7. En el presente estudio los valores de pH no bajaron de 6,39 por lo que no se habría generado este efecto como producto de la adición de GM a la dieta.

Las concentraciones iniciales de PB de los ensilajes del presente estudio fueron inferiores a las reportadas en bibliografía para ensilajes de planta entera de la región (5-8 % PB) (Kent, 2019; Juan et al., 2016). Esto se explicaría por la falta del aporte de proteína por parte de la fracción grano al confeccionar ensilajes sólo con tallos y hojas. No existen registros del contenido de PB en ensilajes de fracción vegetativa fibrosa de sorgo granífero o planta de maíz. En cuanto al SSF, el material para su confección fue cortado, con 34 a 36 % MS, en un estado fenológico reportado por Kent (2019) como adecuado para la especie a ensilar. El bajo contenido en PB en sorgos forrajeros se explica por la ausencia de fertilización y limitada fertilidad edáfica, comunes en la región semiárida.

Se observó que SPM presentó una mayor DPB que los otros materiales ( $P < 0,05$ ), seguido por SSG, PLL Y SSF. El efecto del ensilado para la conservación húmeda del forraje produciría proteólisis de la PB, incrementándose el contenido de nitrógeno no proteico (Van Soest, 1994), de manera que los microorganismos ruminales poseen una fuente de N capaz de ser degradada con mayor rapidez. En el presente ensayo se esperaba que SPM, SSG Y SSF generaran curvas de degradación de PB superiores a las de PLL. En SSF este efecto no fue menor al esperado, posiblemente atribuible a la baja concentración de PB del material original (3 %).

## 2.4 CONCLUSIONES

La adición de GM a la dieta provocaría la disminución de los parámetros que caracterizan el ambiente ruminal, pH y N-NH<sub>3</sub>, observándose un mayor efecto cuando aumenta la proporción de GM, aunque no se alcanzaron niveles perjudiciales para la actividad microbiana involucrada en la degradación de la pared celular, excepto a las 12 horas de incubación de la dieta 60GM.

Dietas 0GM favorecen un ambiente ruminal capaz de aprovechar la degradación de carbohidratos estructurales, lo cual se traduciría en una mayor DFDN y DFDA, en contraste con lo que sucedería con dietas 60GM. En dietas 30GM, la utilización de los carbohidratos estructurales no se vería afectada, obteniéndose los mismos resultados que en dietas 0GM. Por lo tanto, se concluye que los ambientes ruminales generados con las dietas propuestas modificaron la degradación de la fibra.

El aprovechamiento de carbohidratos estructurales de las fracciones fibrosas provenientes de ensilajes de maíz y sorgo (sin grano) sería siempre mayor que en aquellas provenientes de pasto llorón. Entre las especies evaluadas, el pasto llorón sería el material que muestra la mayor caída en DFDN y DFDA comparado con los ensilajes de sorgo y maíz. La degradabilidad de las fracciones de FDN y FDA se vería afectada negativamente con la adición de GM

La celulosa totalmente disponible para su degradación (CEL) no se vió afectada por inclusiones del 30% de GM a la dieta, mientras que el agregado del 60% de GM sí afectó la degradación del polisacárido, en especial en el horario de las 48 horas de incubación. La restauración de los valores de degradabilidad de CEL a las 72 horas indica que la microflora ruminal fue capaz de compensar las fluctuaciones en su ambiente de manera de degradar todo el material disponible. En el caso de los materiales fibrosos evaluados la estructura de la pared celular afecta el comportamiento de la degradación de la celulosa en las matrices complejas. Un mayor contenido de celulosa lignificada de difícil degradación se podría presentar en PLL, comparada con la celulosa que podría encontrarse en

SPM, SSG y SSF o totalmente disponible en CEL. También es posible que el ambiente de rumen que limita la degradabilidad de la fibra no sea el mismo para cada tipo de forraje, es decir que la microflora podría adaptarse a las condiciones que impone la dieta y modificar así los límites de pH que provocan efectos negativos.

En cuanto a la fracción proteica, la adición de maíz no afectó su degradación ruminal (DPB) en ninguno de los materiales estudiados.

Tabla 2.1. Composición química de las dietas utilizadas en el ensayo de degradabilidad *in situ*.

	0GM	30GM	60GM
FDN	60,02	45,72	31,81
FDA	45,19	31,48	18,21
DMS	53,70	64,38	74,71
EM	1,94	2,32	2,69
PB	14,45	13,46	13,18

0GM: 0% de grano de maíz en la dieta; 30GM: 30% de grano de maíz en la dieta; 60GM: 60% de grano de maíz en la dieta.

FDN: fibra detergente neutro (%); FDA: fibra detergente ácido (%); DMS: digestibilidad de la materia seca (%); EM: energía metabolizable (Mcal/kgMS) y PB: proteína bruta (%). Los resultados son expresados en base seca.

Tabla 2.2. Composición química de los materiales fibrosos evaluados en el ensayo de degradabilidad *in situ*.

	FDN	FDA	PB	C	MS*	pH
SPM	69,75	43,26	5,28	10,22	25,3	3,70
SSG	63,57	36,75	3,61	9,42	32,7	4,14
SSF	66,10	40,94	3,00	9,23	31,7	4,12
CEL	101,28	93,18	0,00	-	-	-
PLL	81,97	48,28	4,12	4,08	-	-

SPM: ensilaje de planta de maíz (sin grano); SSG: ensilaje de sorgo granífero (sin grano); SSF: ensilaje de sorgo forrajero (sin grano); CEL: celulosa; PLL: forraje de pasto llorón. FDN: fibra detergente neutro (%); FDA: fibra detergente ácido (%); PB: proteína bruta (%); C: ceniza (%); MS\*: materia seca a 60°C 72 hs (%) y pH. Los resultados son expresados en base seca.

Tabla 2.3. Parámetros asociados al ambiente ruminal: pH y N-NH<sub>3</sub>.

H (h)	GM (%)	pH	NH <sub>3</sub> (mg/dL)
0	0	6,87 a	11,54 a
	30	6,45 a	9,22 a
	60	6,61 a	8,40 a
2	0	6,76 a	16,09 a
	30	6,46 a	16,05 a
	60	6,64 a	9,30 b
4	0	6,71 a	12,26 a
	30	6,27 b	12,68 a
	60	6,41 ab	8,99 b
8	0	6,41 a	8,65 a
	30	6,36 a	7,39 a
	60	6,23 a	3,86 b
12	0	6,52 a	6,83 a
	30	6,19 b	5,79 a
	60	5,93 c	3,11 a
24	0	6,95 a	8,19 a
	30	6,60 a	8,99 a
	60	6,74 a	7,13 a
EEM		0,161	13,974
<i>p-valor</i>	GM	< 0,01	< 0,01
	H	< 0,01	< 0,01
	GM*Hora	0,70	0,62

GM: grano de maíz en la dieta; H: horas de incubación; EEM: Error estándar de la media. Letras diferentes en la misma columna difieren estadísticamente ( $p < 0,05$ ), la comparación se realiza dentro de cada uno de los horarios.

Tabla 2.4. Interacción Mat x GM para Degradabilidad ruminal de la celulosa

H (h)	GM (%)	Degradabilidad
0	0	6,48 a
	30	7,25 a
	60	6,29 a
2	0	7,41 a
	30	7,58 a
	60	6,97 a
4	0	9,06 a
	30	7,88 a
	60	7,66 a
8	0	12,54 a
	30	11,94 a
	60	9,69 a
12	0	25,57 a
	30	26,58 a
	60	15,58 a
24	0	58,49 a
	30	56,77 a
	60	32,80 b
48	0	94,16 a
	30	88,22 a
	60	65,64 b
72	0	98,20 a
	30	99,10 a
	60	98,19 a
EEM		5,932
p-valor	GM	0,44
	Hora	< 0,01
	GM*H	0,01

GM: grano de maíz; H: horas de incubación; EEM: Error estándar de la media. Letras diferentes en la misma columna difieren estadísticamente ( $p < 0,05$ ), la comparación se realiza dentro de cada uno de los horarios.

Tabla 2.5 Interacción Mat x GM para Degradabilidad de la materia seca (DgMS)

Material	GM (%)	DgMS (%)
PLL	0	25,25 a
	30	24,16 a
	60	22,73 b*
SPM	0	43,03 a
	30	40,10 b*
	60	39,24 b
SSF	0	45,65 a
	30	43,41 ab
	60	41,98 b
SSG	0	50,75 a
	30	48,13 b*
	60	47,60 b
EEM		1,522
p-valor		
	GM	0,22
	Mat	< 0,01
	Hora	< 0,01
	GM*Mat	0,048
	GM*H	< 0,01
	Mat*H	< 0,01
	GM*Mat*H	0,06

GM: grano de maíz; Mat: material; H: horas de incubación; PLL: forraje de pasto llorón; SPM: ensilaje de planta de maíz (sin grano); SSG: ensilaje de sorgo granífero (sin grano); SSF: ensilaje de sorgo forrajero (sin grano). EEM: Error estándar de la media. Letras diferentes en la misma columna difieren estadísticamente ( $p < 0,05$ ), la comparación se realiza dentro de cada material.

Tabla 2.6. Interacción H x Mat para Degradabilidad de la materia seca (DgMS) y degradabilidad de la proteína bruta (DPB).

H (h)	Material	DgMS (%)	DPB (%)
0	PLL	14,42 a	25,27 a
	SPM	26,64 b	60,08 b
	SSF	29,49 c	40,37 c
	SSG	33,78 d	50,79 d
2	PLL	15,90 a	30,12 a
	SPM	27,82 b	58,30 b
	SSF	30,73 c	32,99 c
	SSG	36,13 d	46,47 d
4	PLL	16,37 a	34,32 a
	SPM	28,62 b	56,11 b
	SSF	32,48 c	34,11 a
	SSG	38,08 d	44,50 c
8	PLL	17,48 a	34,78 a
	SPM	30,38 b	57,20 b
	SSF	35,21 c	29,10 c
	SSG	41,95 d	44,05 d
12	PLL	20,06 a	35,21 a
	SPM	36,79 b	58,98 b
	SSF	40,72 c	30,84 c
	SSG	47,66 d	45,14 d
24	PLL	25,80 a	39,09 a
	SPM	46,41 b	64,75 b
	SSF	48,97 c	36,02 c
	SSG	54,61 d	48,83 d
48	PLL	36,61 a	42,54 a
	SPM	59,61 b	70,63 b
	SSF	60,58 b	36,65 c
	SSG	65,12 c	53,46 d
72	PLL	45,72 a	46,54 a
	SPM	70,06 b	75,94 b
	SSF	71,27 c	41,69 c
	SSG	73,28 d	57,04 d
EEM		1,79	1,12
P - valor	GM	0,21	0,60
	Mat	< 0,01	< 0,01
	H	< 0,01	< 0,01
	GM*Mat	0,048	0,18
	GM*H	0,02	0,89
	Mat*H	< 0,01	< 0,01
	GM*Mat*H	0,06	0,86

GM: grano de maíz; Mat: material; H: horas de incubación; PLL: forraje de pasto llorón; SPM: ensilaje de planta de maíz (sin grano); SSG: ensilaje de sorgo granífero (sin grano); SSF: ensilaje de sorgo forrajero (sin grano). EEM: Error estándar de la media. Letras diferentes en la misma columna difieren estadísticamente ( $p < 0,05$ ), la comparación se realiza dentro de cada uno de los horarios.

Tabla 2.7. Interacción GM x H para Degradabilidad de la materia seca (DgMS)

H (h)	GM (%)	DgMS (%)
0	0	26,04 a
	30	25,99 a
	60	26,23 a
2	0	27,93 a
	30	27,49 a
	60	27,52 a
4	0	29,47 a
	30	28,65 a
	60	28,55 a
8	0	32,57 a
	30	30,44 a
	60	30,76 a
12	0	39,20 a
	30	34,91 b
	60	34,82 b
24	0	47,23 a
	30	42,16 b
	60	42,44 b
48	0	59,06 a
	30	55,59 b
	60	51,78 c
72	0	67,88 a
	30	66,36 a
	60	61,01 b
EEM		1,983
p-valor		
	GM	0,21
	Mat	< 0,01
	Hora	< 0,01
	GM*Mat	0,048
	GM*H	< 0,01
	Mat*H	< 0,01
	GM*Mat*H	0,06

GM: grano de maíz; Mat: material; H: horas de incubación; PLL: forraje de pasto llorón; SPM: ensilaje de planta de maíz (sin grano); SSG: ensilaje de sorgo granífero (sin grano); SSF: ensilaje de sorgo forrajero (sin grano). EEM: Error estándar de la media. Letras diferentes en la misma columna difieren estadísticamente ( $p < 0,05$ ), la comparación se realiza dentro de cada uno de los horarios.

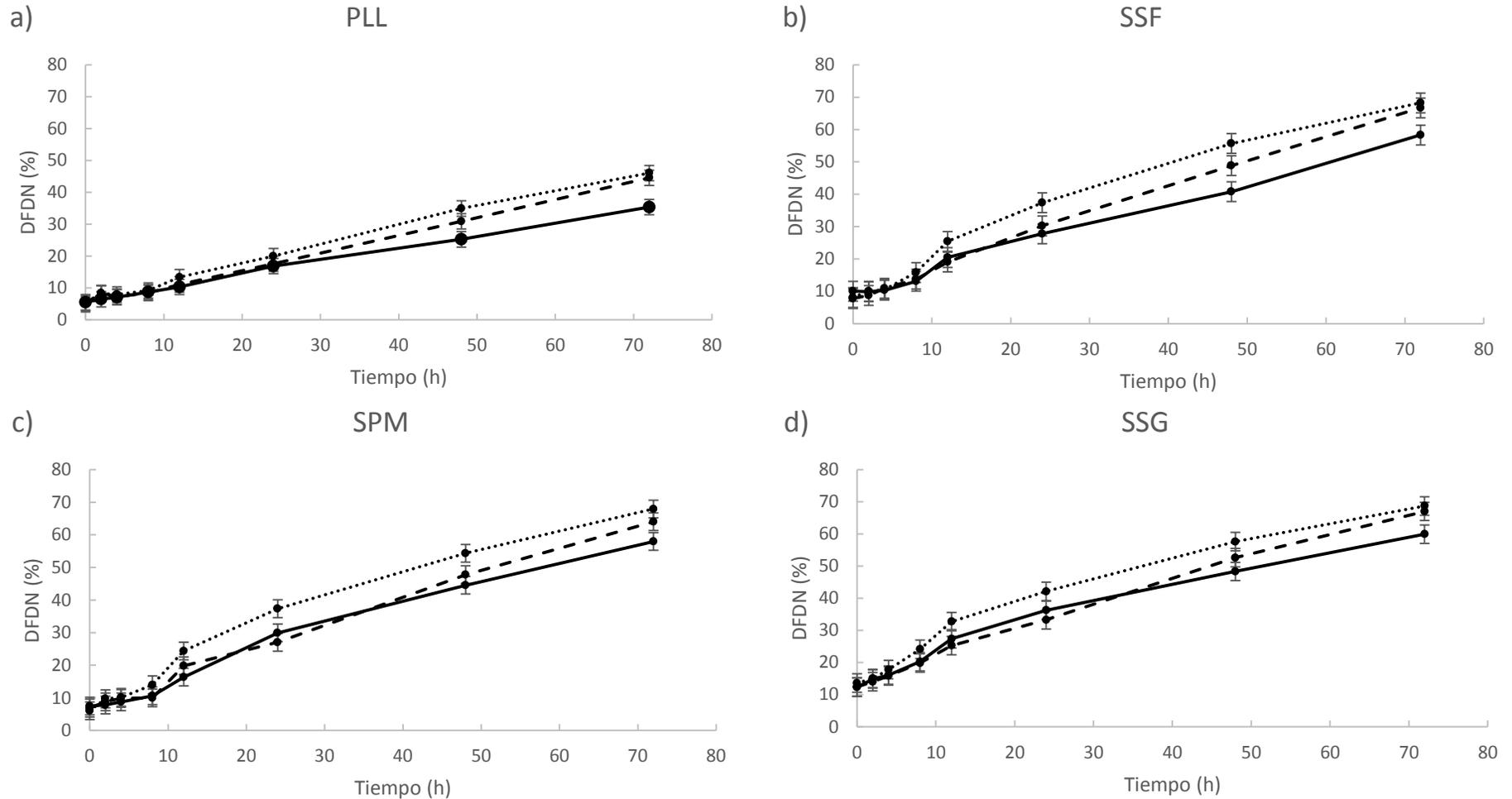


Figura 2.1. Degradabilidad ruminal de la fracción de FDN (DFDN) de los materiales (Mat) a) PLL: forraje de pasto llorón, b) SSF: ensilaje de sorgo forrajero, c) SPM: ensilaje de planta de maíz sin grano y d) SSG: ensilaje de sorgo granífero sin grano en dietas con 0% (...), 30% (- -) y 60% (\_\_\_) de grano de maíz (GM). GM  $P = 0,4794$ ; Mat  $P < 0,0001$ ; Hora  $P < 0,0001$ ; GM x Mat  $P = 0,1070$ ; GM x Hora  $P = 0,4469$ ; Mat x Hora  $P < 0,0001$ ; GM x Mat x Hora  $P = 0,0158$ .

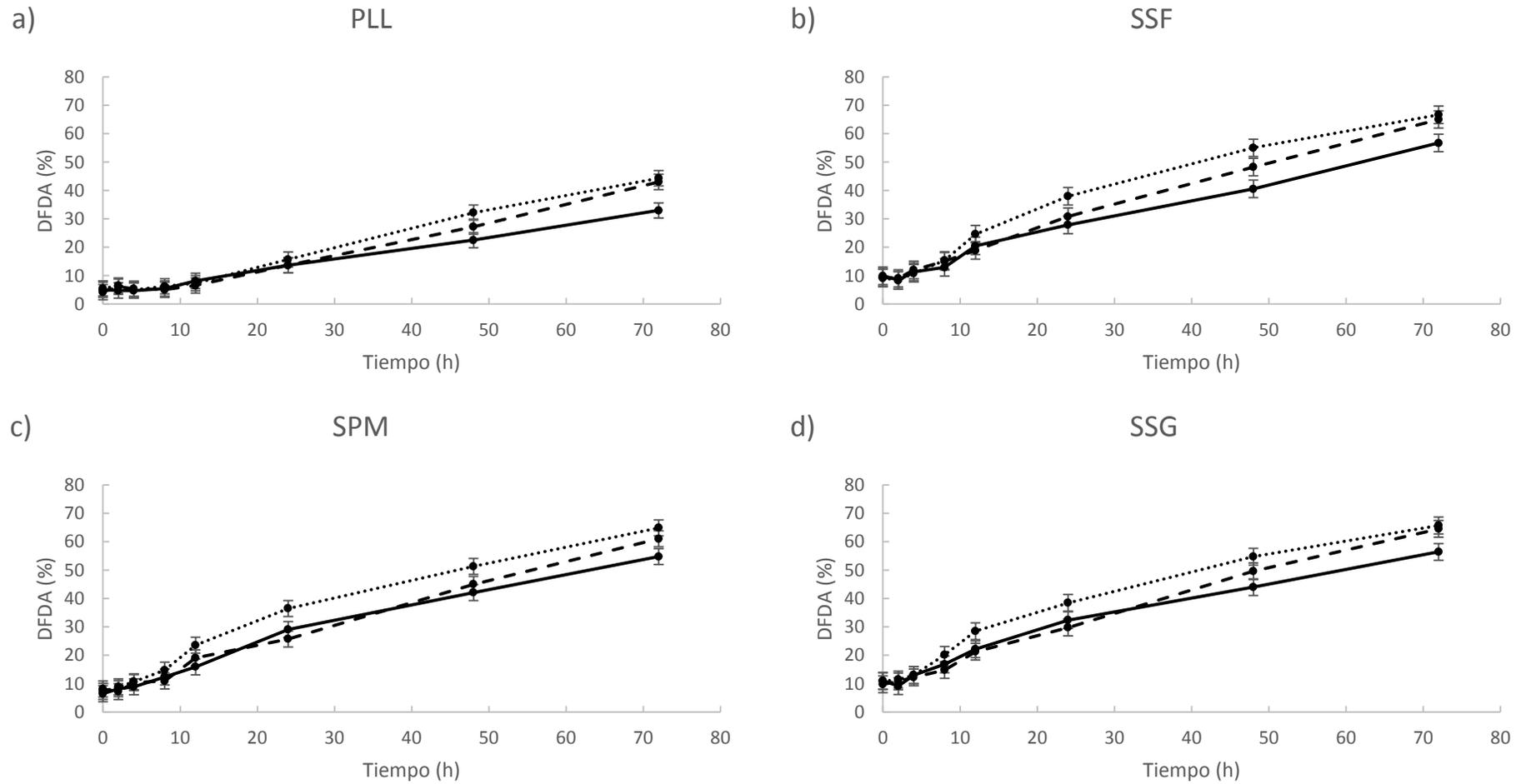


Figura 2.2. Degradabilidad ruminal de la fracción FDA de los materiales (Mat) a) PLL: forraje de pasto llorón, b) SSF: ensilaje de sorgo forrajero, c) SPM: ensilaje planta de maíz sin grano y d) SSG: ensilaje de sorgo granífero sin grano en dietas con 0% (...), 30% (- - -) y 60% (\_\_\_) de grano de maíz (GM). GM  $P = 0,5186$ ; Mat  $P < 0,0001$ ; Hora  $P < 0,0001$ ; GM x Mat  $P = 0,0963$ ; GM x Hora  $P = 0,4893$ ; Mat x Hora  $P < 0,0001$ ; GM x Mat x Hora  $P = 0,0028$

## CAPITULO 3: CINÉTICA DE DEGRADABILIDAD RUMINAL DE DISTINTAS FUENTES DE FIBRA CON GRANO DE MAÍZ Y BICARBONATO DE SODIO EN LA DIETA

---

### 3.1 INTRODUCCIÓN

Altos niveles de carbohidratos rápidamente fermentables en las dietas provocan una mayor producción de AGVs, los cuales son absorbidos por el rumen, pero la acidez ruminal condiciona la tasa con la cual se absorben (Krehbiel et al., 1995, Owens et al., 1998). El incremento de la acidez ruminal promueve la disociación del ácido y retarda la absorción, proceso que deprime más aún el pH ruminal. En dietas ricas en carbohidratos, el compromiso entre producción y absorción de ácidos grasos es mayor que en dietas de alto contenido de fibra y mayor capacidad *buffer*. Adicionalmente, por una producción menor de saliva por limitada oferta de fibra efectiva, se genera un escenario de retardo de la digestión de la fibra, que conduce a la acidosis ruminal subaguda y otras alteraciones metabólicas relacionadas (Garrett et al., 1999).

Los *buffers* dietarios surgen como una alternativa para contrarrestar la depresión del pH ruminal, siendo el bicarbonato de sodio (BS) uno de los más recomendados (Erdman, 1988). Este aditivo químico se caracteriza por una constante de disociación ácida ( $pK_a = 6,25$ ), que es cercana al pH normal del rumen. Existen diferentes teorías que explican el mecanismo de acción del BS a nivel ruminal. Algunos investigadores (Russell y Chow, 1993) han argumentado que la adición de BS tiene sólo un pequeño impacto directo en el pH del líquido ruminal debido a que el rumen está saturado en  $CO_2$ . Otros, en cambio, (Hussain y Miller, 1999, Owens et al., 1998, Mandebvu y Galbraith, 1999, Kohn y Dunlap, 1998) han argumentado que la adición de BS neutraliza directamente la acidez del fluido ruminal, incluso bajo condiciones de elevada concentración de  $CO_2$  (ver capítulo 1). Existe concordancia en que la adición de este *buffer* a la dieta resultaría beneficioso debido a su alta capacidad de neutralizar iones hidrógeno ( $H^+$ ) (Erdman, 1988; Russell y Chow, 1993), en dietas que superan el 75% de concentrado almidonoso.

La inclusión de BS debería elevar el pH ruminal (Hussain y Miller, 1999) e incrementar la salivación en rumiantes (Kohn y Dunlap, 1998). También se espera incremente la digestibilidad y la tasa de pasaje y provoque cambios en las proporciones de los AGVs (Hart y Doyle, 1985; James y Wohlt, 1985). El *buffer* BS también ha demostrado incrementar el número total de bacterias, tanto celulolíticas como aminolíticas. Se ha sugerido que mejora la cantidad y eficiencia de la síntesis de proteína microbiana, la cual ocurre independientemente de los cambios de las tasas de dilución del fluido ruminal (Mees et al., 1985), y también que mejora la captura de amonio por parte de las bacterias (Newbold et al., 1988). Estos efectos han sido asociados a un mayor consumo de alimento y una mejora en la ganancia de peso diario (Tripathi et al., 2004). La respuesta animal a la suplementación con *buffers* dietarios ha sido variable, hecho atribuido a los regímenes de alimentación y al tipo y niveles de adición de *buffers* minerales (Santra et al., 2003).

Existe coincidencia en que la inclusión de BS previene el descenso de pH aliviando el efecto depresor en la celulolisis y mejora la degradación de la fibra hasta en un 5% en algunos casos (Mould et al., 1983; Emmanuel et al., 1970 y Mertens y Ely, 1979). Por otro lado el efecto de la adición de BS sobre la digestibilidad de la MS y la digestibilidad de la FDN ha sido variable. Hadjipanayiotou (1982) reportó incrementos en ambos parámetros debido a la adición de BS en cabras alimentadas con heno de cebada como forraje base, lo cual también fue reportado Stroud et al., 1985 usando como forraje base heno de alfalfa. Sin embargo otros autores como Bodas et al. (2009) y Cooper et al. (1996) no observaron diferencias en la digestibilidad de la MS ni de FDN aún cuando incorporaron hasta 4% del buffer BS.

Poco se sabe de las interacciones entre los forrajes base en dietas con o sin agregado de maíz (GM) y BS. Tampoco se conoce la dimensión de la mejora en la utilización de fibras de diferente naturaleza en ese ambiente ruminal en respuesta a la adición de buffers de fermentación como el BS. Debido a lo expuesto es que se hipotetizó para el presente trabajo que la incorporación de un buffer a la dieta que limite la reducción del pH ruminal generará un ambiente de mayor capacidad de degradación de la fibra, en particular para las fibras de menor calidad. Esto es porque en este tipo de

fibras la disponibilidad de nutrientes es menor a la de una fibra de mejor calidad, por lo que cualquier mejora que favorezca la proliferación de bacterias fibrolíticas a nivel ruminal traería aparejado un aumento en la degradabilidad de la fibra.

## **3.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.2.1 Sitio experimental**

El estudio se realizó en instalaciones de la Estación Experimental INTA EEA Anguil, ubicadas en la Provincia de La Pampa (36° 32´ latitud sur y 63° 59´ longitud oeste), Argentina, desde mayo hasta principios de agosto de 2017. Los animales fueron manejados según el protocolo aprobado por INTA para el cuidado y uso experimental de animales (CICUAE, INTA, 2017).

### **3.2.2 Animales, alimentación y diseño experimental**

Se utilizaron cuatro vacas Angus de 599,2 ± 103,2 kg de peso vivo con fístula ruminal y de 5 años de edad, las cuales se mantuvieron al aire libre en corrales individuales con agua disponible a voluntad.

Las vacas se alimentaron una vez al día (8 h) con una dieta a base de heno de moha, grano de soja, grano de maíz entero (GM) y bicarbonato de sodio (BS) en función de los niveles previstos. Los ambientes fueron definidos según un arreglo factorial 2 x 2, con dos niveles de grano de maíz entero (GM) en la dieta (0 y 60%) y dos niveles de bicarbonato de sodio (BS) (0 y 0,75%) según dosis recomendada por Hu y Murphy (2005), definiendo 4 tratamientos: 0GM, 0GM +BS, 60GM y 60GM+BS. Las dietas fueron iso-proteicas. El contenido de PB (proteína bruta) se fijó entre 9,7 y 10,8 % (Tabla 3.1). El tamaño de partícula del heno en la dieta total mezclada fue de 3-5 mm. Las dietas presentaron la composición química detallada en la Tabla 2.1.

El experimento fue diseñado como un cuadrado latino (4 X 4) (Sokal y Rohlf, 1995) y se distribuyeron los animales al azar en los tratamientos propuestos. El esquema, correspondiente al diseño experimental, dentro del ensayo fue el siguiente:

Período	Tratamientos			
	0GM	0GM+BS	60GM	60GM+BS
A	Vaca 1	Vaca 2	Vaca 3	Vaca 4
B	Vaca 4	Vaca 1	Vaca 2	Vaca 3
C	Vaca 3	Vaca 4	Vaca 1	Vaca 2
D	Vaca 2	Vaca 3	Vaca 4	Vaca 1

Cada período del cuadrado latino tuvo una duración de 21 días. Los primeros 16 días fueron de adaptación. En los días 17, 18, 19 y 20 de cada período se realizaron los muestreos para el estudio de degradabilidad ruminal. El análisis de pH y amonio se realizó sobre las muestras tomadas el último día de cada período.

Para evaluar los efectos e interacciones en la degradabilidad ruminal de la materia seca (DgMS), los parámetros de cinética de degradación de la MS, y la degradabilidad ruminal de la FDN, DFA y PB, se utilizó un arreglo factorial de 5 X 4 (5 materiales fibrosos X 4 ambientes ruminales). Los materiales fibrosos fueron: fracción fibrosa de planta de maíz sin el grano (PM), de sorgo granífero sin el grano (PSG) y de sorgo forrajero (PSF), pasto llorón (PLL) y papel Whatman (CEL). Este último fue el material de referencia de la degradación de la celulosa.

### 3.2.3 Determinación del pH y del nitrógeno amoniacal ruminal

Con el objetivo de caracterizar el ambiente ruminal de cada animal se extrajo licor de las secciones: saco craneal, parte media ventral y caudal del rumen a la hora 0 (previo al suministro de alimento) y a las 2, 4, 8, 12 y 24 horas después de ofrecer el alimento. Sobre el licor ruminal filtrado (25 ml de líquido) se determinó el pH inmediatamente. El líquido se acidificó con ácido sulfúrico para determinación de nitrógeno amoniacal (Broderick y Kang, 1979).

### 3.2.4 Materiales fibrosos evaluados

Las muestras de planta de maíz (PM), sorgo granífero (PSG) y sorgo forrajero (PSF) fueron cortadas manualmente cuando alcanzaron un contenido de materia seca (MS) de 30-45%. El forraje de pasto llorón (PLL) se cortó en el mes abril antes de que entrara en dormición por efecto de las primeras heladas.

Las fracciones espiga (en PM) y panoja (en PSG y PSF) fueron removidas para evaluar solamente la fracción fibrosa de estos materiales.

### 3.2.5 Análisis químicos de los materiales fibrosos

Los recursos fibrosos (PSG, PSF, PM, PLL) se secaron en estufa a 60 °C por 72 h. Una fracción de cada muestra se molió a 1 mm con un molino tipo Willey y el resto se reservó para realizar las mediciones de degradabilidad *in situ*. En las muestras molidas se realizaron los análisis de materia seca (MS, 72hs a 60 °C por diferencia de peso entre material original y material seco), fibra en detergente neutro y ácido (FDN y FDA; Van Soest et al., 1991) y proteína bruta (PB, por determinación de N Kjeldhal (\* 6,25) AOAC, 1990). La composición química de las de planta de maíz (PM), sorgo granífero (PSG) y sorgo forrajero (PSF) así como la de PLL y CEL se detalla en la Tabla 3.2.

### 3.2.6 Incubación en rumen

Los recursos fibrosos, previamente secados en estufa, se molieron a través de un molino con criba de 5 mm. El papel de filtro (CEL) se molió en procesadora para aumentar la disponibilidad del material y que la estructura no representara un impedimento a la fermentación. Se pesaron  $5 \pm 0,05$  g MS de cada material en bolsas de dacrón/poliéster para análisis *in situ* (ANKOM Co, Fairport, NY). Las bolsas eran de 10 x 20 cm y con un tamaño de poro de  $50 \pm 3$   $\mu$ m. Se siguió la técnica de Mehrez y Ørskov (1977).

Se incubaron un total de 1920 bolsas de dacrón resultantes de la combinación de 8 tiempos de incubación, 5 fuentes de fibra en estudio, en 4

animales por triplicado durante 4 períodos de alimentación, todas por triplicado. Las bolsas fueron introducidas en función de los horarios previstos (0, 2, 4, 8, 12, 24, 48 y 72 horas), y retiradas todas juntas al concluir el ensayo. Para garantizar la permanencia de las bolsitas en la parte ventral del rumen se usó un tapón de goma de 7 cm de diámetro que sostuvo la red que contenía las bolsitas a incubar. Previo a la incubación en la parte ventral del rumen las muestras fueron sumergidas en agua limpia a la misma temperatura del rumen por 30 seg, con el propósito de ser prehidratadas. Finalizado el ensayo se realizó un lavado de las bolsas ruminales con agua fría y se congelaron a -20°C.

### **3.2.7 Determinaciones**

Sobre el residuo de las bolsas se estimó el contenido de MS. Las muestras fueron molidas a 1 mm para su posterior análisis químico. Además, se analizaron muestras del material original, antes de ser incubado en las bolsitas. A cada una de ellas se le realizó determinaciones de fibra en detergente neutro (FDN), fibra en detergente ácido (FDA) y proteína bruta (PB) mediante tecnología NIRS con las calibraciones detalladas en el capítulo 4.

### **3.2.8 Degradabilidad ruminal de la materia seca (MS), fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA) y proteína bruta (PB).**

Los porcentajes de degradación de materia seca (MS) (DgMS), FDN (DFDN), FDA (DFDA) y PB (DPB) en cada tiempo de incubación se calcularon con la siguiente fórmula:

$$\text{Degradabilidad (parámetro), \%} = \frac{(\text{Peso inicial} - \text{Peso final}) * 100}{\text{Peso inicial}}$$

Peso inicial

### 3.2.9 Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental del ensayo *in situ* fue un cuadrado latino (4 x 4). Los parámetros evaluados se analizaron como medidas repetidas en el tiempo mediante ANOVA utilizando el procedimiento MIXED de SAS (SAS Institute Inc., 2001) donde la unidad experimental fue el animal. Las medias se compararon mediante la prueba de Fisher. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando  $P \leq 0,05$ , mientras que cuando P resultó mayor que 0,05 pero inferior a 0,10 se consideró que existió una tendencia estadística.

Para la evaluación de los parámetros asociados al ambiente ruminal: pH y NH<sub>3</sub> se empleó el siguiente modelo:

$$Y = \mu + T + A + P + \varepsilon_1 + H + H * T + H * A + H * P + \varepsilon_2$$

Dónde:

Y = Variable respuesta

$\mu$  = media general

T = Tratamientos: 0GM, 0GM+BS, 60GM, 60GM+BS

P = Período

A = Animal (Factor Aleatorio)

H = Hora

$\varepsilon_1 = A * P * T$

$\varepsilon_2 = Mat * T * P * A$

Las variables: DgMS, DFDN, DFDA y DPB se analizaron de acuerdo al siguiente modelo:

$$Y = \mu + T + P + A + \varepsilon_1 + Mat + Mat * T + Mat * P + Mat * A + \varepsilon_2 + H + H * T + H * P + H * A + H * T * P * A + H * Mat + H * Mat * T + H * Mat * P + H * Mat * A + \varepsilon_3$$

Dónde:

Y = Variable respuesta

$\mu$  = media general

T = Efecto de la adición de grano de maíz a la dieta (0, 30 y 60% GM)

P = Período

A = Animal (Factor Aleatorio)

H = Hora

Mat = Material

$\varepsilon_1 = A * P * T$

$\varepsilon_2 = Mat * T * P * A$

$\varepsilon_3 = H * Mat * T * P * A$

### 3.3 RESULTADOS Y DISCUSION

#### 3.3.1 Parámetros asociados al ambiente ruminal: Evolución del pH y el N-NH<sub>3</sub>

Para pH ruminal No se detectaron interacciones ( $P = 0,33$ ) entre los factores estudiados. Se encontró un efecto para GM y un efecto debido al tiempo de incubación ( $P < 0,05$ ) (Tabla 3.3). El valor promedio de pH para 0GM fue de 6,77, mientras que para 60GM fue de 6,45. El pH ruminal nunca estuvo por debajo de 6,15 generando un ambiente propicio para la actividad celulolítica según lo reportado en la literatura ( $6,7 \pm 0,5$  de acuerdo con Van Soest, 1994). Como se detalló en el Capítulo 2, estos valores de pH harían posible la presencia de todos los componentes de la biomasa microbiana, principalmente bacterias celulolíticas, protozoos y hongos (Molina et al., 2002). Si bien la adición de GM provocó un descenso en pH, los valores mínimos que se reportaron no fueron inferiores a 6,0 y por tanto estuvieron lejos del valor límite inferior 5,0 que, según trabajos previos permitiría la proliferación excesiva de bacterias productoras de lactato (Owens et al., 1998; Stone, 2004).

La evolución del pH a lo largo de las horas de incubación fue diferente para dietas 0GM comparadas con dietas 60GM. En la dieta control (0GM), transcurridas 4 horas luego de suministrado el alimento, el pH comenzó a disminuir hasta la hora 8 alcanzando un mínimo de 6,63. A las 24 horas el pH se restauró igualando los valores de la hora 0. Cuando la proporción de GM en la dieta fue del 60%, los valores de pH obtenidos describieron el mismo perfil que la dieta control, pero en un rango diferente, presentando un mínimo de 6,21 a las 12 horas post alimentación, con un nivel basal entre 6,5 y 6,7. Estas similitudes y leves fluctuaciones en los valores de pH fueron similares a las reportadas en el primer ensayo de la presente tesis (Capítulo 2).

La incorporación de BS no afectó el promedio del pH ruminal ( $P = 0,79$ ) ni los patrones diurnos (Tabla 3.3). Luego de suministrado el alimento el pH ruminal disminuyó, pero se mantuvo dentro del rango fisiológico normal ( $> 6,2$ ).

Estos resultados concuerdan con Kawas et al., (2007) quienes reportaron que la adición de BS a una dieta compuesta de grano de sorgo molido al 50% no mostró efecto sobre el pH. Sin embargo, Tripathi et al. (2004) reportaron que la adición de BS logró evitar una disminución excesiva del pH, cuando grano de cebada representaba el 47% de una dieta formulada con 75:25 (concentrado: forraje). Este efecto podría deberse a que la cebada tendría almidón de mayor tasa de degradabilidad, en comparación con grano de maíz y grano de sorgo. Esta información, junto a la encontrada en el presente estudio, podría indicar que la inclusión de BS cobra importancia en dietas altamente energéticas y que presentan una mayor tasa de degradación de almidón.

Recientes estudios han comparado el efecto de la adición de BS a dietas energéticas en comparación con otros *buffers* alternativos (Neville et al, 2019, Bach et al, 2017 y Cruywagen et al, 2014). También se ha estudiado el aporte de BS en diferentes concentraciones en vacas lactantes en la región (Correa et al., 2014). Ninguno de los trabajos consultados describe la forma en que se administra el BS, solo se indica que la adición del *buffer* se realiza en dietas TMR en una proporción de 8,0 g/kg MS dietaria, tal como se realizó en el presente estudio (7,5 g/kg MS dietaria). Los autores mencionados reportaron la efectividad del uso de BS en dietas energéticas, solo o combinado con otros *buffers* alternativos. Las diferencias quizá se deban a que las condiciones en dichos ensayos estuvieron más controladas que las que se propusieron en el presente trabajo, en el cual las precipitaciones ocurridas, en forma de llovizna, podrían haber producido una dilución parcial del BS en los comederos.

En lo referente a N-NH<sub>3</sub>, la inclusión de GM y BS en la ración no modificó sus concentraciones en el rumen ( $P = 0,14$  y  $P = 0,80$ ) (Tabla 3.3). Estos resultados concuerdan con los de Kennelly et al. (1999) y Doepel y Hayirli (2011), trabajos en los que la adición de buffer no elevó las concentraciones de amonio ruminal en dietas con 50% de concentrado. En cambio, cuando la proporción de concentrado en la dieta alcanzaba un 75%, Doepel y Hayirli (2011) reportaron un aumento en el contenido de N-NH<sub>3</sub>. Los autores indicaron que la respuesta del amoníaco ruminal a los buffers puede depender de la composición de la dieta y el nivel de fibra y carbohidratos no estructurales, aunque no parece haber un efecto constante del BS sobre las

concentraciones de amoníaco en el rumen. Kilmer et al. (1981) informaron que la suplementación con BS resultó en un aumento del N-NH<sub>3</sub>, mientras que Mees et al. (1985) reportaron que el N-NH<sub>3</sub> disminuyó, debido a que aumentó el flujo de N bacteriano y la eficiencia de la síntesis de proteínas bacterianas al deprimir la degradabilidad del almidón y la tasa de dilución de partículas ruminales.

El efecto del tiempo de incubación (H) sobre el contenido de N-NH<sub>3</sub> resultó significativo ( $P < 0,01$ ) sin interacción entre hora y los tratamientos, resultantes de las combinaciones de adición de GM y BS ( $P = 0,84$ ). Entre las 0 y 4 horas la respuesta observada en NH<sub>3</sub> se debe probablemente a la degradación del expeller de soja de la dieta base. La concentración más alta de N-NH<sub>3</sub> se observó a la hora 2 de incubación (promedio de 13,26 mg/dL de fluido ruminal). A la hora 8, los valores de N-NH<sub>3</sub> de dietas con 60% de GM reportaron valores por debajo del óptimo (5,6 - 10,0 mg/dL de fluido ruminal) (Satter y Slyter, 1974; Van Soest, 1994). El mínimo de concentración de N-NH<sub>3</sub> ocurrió en la hora 12, cuando 0GM, 60GM y 60GM+BS mostraron valores debajo del óptimo y se diferenciaron de 0GM+BS ( $P < 0,05$ ). A las 24 horas de incubación, los valores de N-NH<sub>3</sub> permanecieron bajos en las cuatro dietas evaluadas.

Podría concluirse que la inclusión de BS en la dieta base de forraje de mediana calidad junto con la degradación del expeller de soja, provocaron una estabilidad en las fluctuaciones de N-NH<sub>3</sub> en los primeros horarios de muestreo. Esto se traduciría en un incremento en la eficiencia ruminal para la captura de N microbiano (Tripathi et al., 2004) en horarios tempranos.

### **3.3.2 Degradabilidad ruminal de las fracciones de MS, FDN, FDA y PB**

El material utilizado como patrón de celulosa pura al 98% (CEL) mostró una evolución típica de degradabilidad de la MS (DgMS) cuando se incubó en 0GM, mientras que en 60GM se vió afectado, en forma coincidente con los resultados del experimento descritos en el Capítulo 2. Hubo una interacción entre GM y H para la degradabilidad ruminal de CEL ( $P < 0,01$ ). Hasta las 12

horas de incubación la degradación ruminal de CEL fue similar en los ambientes ruminales experimentales ( $P < 0,05$ ). A las 12 horas de incubación la degradabilidad ruminal de CEL fue mayor en dietas con 0GM que la encontrada en dietas con 60GM ( $P < 0,05$ ). En este horario, se reportaron valores de pH de 6,88 para dietas con 0GM y de 6,55 para dietas con 60GM. Zhang et al. (2017) encontraron que a pH 6,5 la hidrólisis de la celulosa es la óptima, con una eficiencia de producción del 81%, en cultivos ruminales enriquecidos. Si bien los ambientes ruminales generados por las dietas 0GM y 60GM reportan valores de pH óptimos para la degradación de CEL, en la dieta 0GM hubo alrededor de un 57% más de degradación del polisacárido, que en la dieta 60GM.

Las bacterias fibrolíticas ruminales son generalmente sensibles a valores de pH bajos y por debajo de pH 6,1, el crecimiento de las principales bacterias celulolíticas, como *Ruminococcus* y *Fibrobacter*, se ve comprometido. Como se puede observar en el presente estudio, no hace falta alcanzar valores críticos de pH para que haya una disminución en la efectividad de la microflora ruminal, lo cual se ve reflejado en la disminución de la degradación de CEL.

Transcurridas 24 horas de incubación la degradabilidad de la celulosa fue diferente en los 4 ambientes ruminales testeados. El mayor porcentaje de degradación de este polisacárido se dió en 0GM+BS, seguido de 0GM, 60GM+BS y 60GM. A las 48 horas de incubación la dieta 0GM+BS proporcionó el ambiente ruminal que generó la mayor degradación de CEL. La dieta 60GM+BS alcanzó valores de degradación ruminal de CEL similares a los de 0GM y estos valores fueron mayores a los que se encontraron en la dieta 60GM. Esto resultó sumamente llamativo, ya que en el resto de los horarios no se reportó influencia estadística por adición de BS. Sin embargo, como puede observarse en este horario (48 h), la adición de BS en dietas con 60%GM favorece la degradación de CEL con valores similares a los que se encuentran en dietas con 0%GM. Al concluir el ensayo, la degradabilidad ruminal de CEL fue igual en los cuatro ambientes ruminales testeados ( $P > 0,10$ ). Lo que sucedería es que la cooperación de la microflora se incrementa hasta las 48 horas y luego se ralentiza, según los estudios de Zhang et al. (2017).

El análisis estadístico detectó una triple interacción entre los factores GM, MAT y HORA ( $P < 0,01$ ) para DgMS de los materiales PLL, PSF, PSG y PM. En la Figura 3.1 se muestran los patrones de DgMS de cada material en los ambientes ruminales 0GM y 60GM a medida que transcurren el tiempo de incubación. Durante las primeras horas de incubación se observaron diferencias en la DgMS de los distintos materiales siendo mayor para PSF, seguido de PSG, PM y PLL ( $P < 0,01$ ), sin presentar diferencias entre las dietas 0GM y 60GM ( $P > 0,05$ ) hasta las 4 horas de incubación. A las 8 horas PM y PSG comenzaron a presentar un 6,7% más de DgMS en 0GM que en 60GM ( $P < 0,02$ ), mientras que para PLL esto ocurrió a las 12 horas ( $P < 0,01$ ), con una diferencia del 10,9 % entre las dietas. En PSF se reveló similar comportamiento a partir de las 24 horas de incubación ( $P < 0,01$ ), con una diferencia del 9,8% entre 0GM y 60GM. Transcurridas 72 horas de incubación PM, PSG y PSF con la dieta 0GM se diferenciaron de los mismos materiales con la dieta 60GM en un 10,9 %, y los tres se diferenciaron de PLL ( $P < 0,01$ ). PLL resultó ser el material que alcanzó menor degradación ruminal y el que se vio más afectado por adición de GM a la dieta con un 19,1% de disminución de la DgMS entre 0GM y 60GM.

El agregado de BS en la dieta no afectó ( $P = 0,33$ ) la DgMS de los materiales evaluados, en oposición a lo reportado por Mould y Ørskov (1983) donde la adición continua de BS mejoró la DgMS y la degradabilidad de los nutrientes. Estos autores concluyeron que esta práctica hace que el pH se mantenga por encima de un nivel crítico. La falta de diferencias en DgMS debidas a la adición de BS, encontradas en el presente trabajo, no es sorprendente teniendo en cuenta que el pH del rumen se encontró en todo momento dentro de los valores que favorecen el crecimiento microbiano.

No se detectaron efectos debido a la adición de BS sobre la degradabilidad ruminal de la fracción FDN (DFDN) ( $P = 0,95$ ) (Tabla 3.5 y Tabla 3.6). Esto se debería a que si bien la depresión del pH a 6,0 podría haber resultado en una leve disminución en la digestión de la fibra, el número de organismos fibrolíticos no se vería afectado significativamente en estas condiciones. Estos resultados concuerdan con los de Mees et al. (1985), quienes no detectaron cambios en la DFDN en respuesta a la suplementación

con BS. De manera similar, otros estudios tampoco han detectado efectos del BS sobre la DFDN, tanto cuando están acompañados por una alteración en el patrón de AGVs ruminales (Rogers et al., 1985; Kennelly et al., 1999; Marden et al., 2008) como en ausencia de estas alteraciones (Kalscheur et al., 1997).

Por el contrario, en el trabajo de Tripathi et al., (2004) el uso de BS (7,5 g/Kg MS de alimento diario ofrecido) suministrado por 13 semanas a corderos alimentados con altas proporciones de concentrados (Relación Fibra: Concentrado de 25:75) provocó aumentos en la DFDN del orden de 12% y se observó que el pH ruminal aumentó de 6,0 a 6,18. Sin embargo, Kawas et al., (2007) reportaron una reducción de DFDN de aproximadamente 11,6%. Los autores explican que esto puede estar relacionado con un efecto de dilución de BS, el cual puede haber aumentado la velocidad de paso de partículas de fibra por el rumen.

Para DFDN se detectaron interacciones entre GM x Hora y MAT x Hora ( $P < 0,01$ ) (Tabla 3.5 y 3.6). Como se mencionó en el Capítulo 2, los tiempos de incubación tempranos no reportaron diferencias significativas entre los valores de DFDN de los materiales evaluados en los ambientes ruminales propuestos. Esto fue explicado por la metodología de degradabilidad *in situ* inversa (MI) empleada y por la solubilización de la FDN parcialmente digerida en detergente neutro durante el proceso de análisis de laboratorio.

Sin embargo las dietas 0GM mostraron mayor DFDN que las dietas 60GM a partir de las 12 horas de incubación y al cabo de 72 horas se acentuó el efecto negativo de GM en la dieta. Estas diferencias podrían deberse a que dietas con una proporción de concentrado elevada tendrían asociados procesos de rumia y salivación reducidos (Emery y Brown, 1961; Balch, 1971) y una disminución de la capacidad de *buffer* del rumen, factores que con la rápida degradación microbiana de los carbohidratos solubles podría resultar en una disminución del pH ruminal. En estas condiciones se puede producir también una mayor competencia por los nutrientes esenciales (El-Shazly et al., 1961) y por lo tanto el número de microorganismos celulolíticos se vería reducido, con una consecuente reducción de la celulólisis.

En cuanto a los MAT evaluados se puede ver que transcurridas 8 horas de incubación el PLL fue el que menor DFDN presentó respecto del resto

(Tabla 3.6). Luego, a las 12 horas, todos los materiales se diferenciaron ( $P < 0,01$ ), siendo PM el de mayor DFDN, seguido de PSG, PSF y PLL en último lugar. Finalizado el experimento los materiales alcanzaron una DFDN de 58,9; 54,6; 48,4 y 43,8 % para PM, PSG, PSF y PLL, respectivamente.

No se detectaron efectos debido a la adición de BS sobre la degradabilidad de la fracción FDA (DFDA) ( $P = 0,94$ ). Los resultados coinciden con los reportados por Bougouin et al. (2017), con suplementación del 1% de BS tanto en dietas fibrosas como en dietas ricas en almidón. Por el contrario, como se mencionó para DFDN, el uso de BS (7,5 g/Kg de MS de alimento diario ofrecido) en el trabajo de Tripathi et al., (2004) provocó un aumento de la digestibilidad no solo de la FDN sino también de la FDA, aunque en este último caso en menor medida (en el orden del 4,8%).

Para DFDA hubo interacciones entre GM x H (Tabla 3.5), MAT x Hora (Tabla 3.6) y GM x MAT (Tabla 3.7) ( $P < 0,01$ ). Con respecto a la primera interacción (GM x H) para DFDA, al igual que para DFDN, las dietas 0GM mostraron mayor DFDA que las dietas 60GM a lo largo del período de muestreo. Estas diferencias comenzaron a ser visibles a las 12 horas de incubación y al cabo de 72 horas se acentuó el efecto de GM en la dieta.

En la interacción MAT x Hora, hasta las 12 horas de incubación PSG presentó mayor DFDA seguido de PM y PSF, donde PLL fue el material que menor DFDA tuvo. Entre las 12 y las 48 horas los materiales tuvieron diferencias significativas en los valores de DFDA ( $P < 0,01$ ) (PSG>PM>PSF>PLL). Por último a las 72 horas PSG y PM fueron los materiales que presentaron mayor DFDN, seguidos de PSF y PLL. PLL se diferenció ( $P < 0,05$ ) del resto de los materiales a lo largo del ensayo siendo el material que menos DFDA presentó en los diferentes horarios, alcanzando solo un 25 % de DFDA al concluir el ensayo.

Con respecto a la interacción GM x MAT se pudo observar (Tabla 3.7) que DFDA fue mayor para PM y PSG en dietas 0GM que en dietas 60GM, mientras que la adición de GM no afectó ( $P < 0,05$ ) la DFDA en PLL y PSF. Esto podría deberse al mayor grado de lignificación que poseen el PLL y PSF, lo que afecta principalmente la degradación de la celulosa, en contraposición a la mayor disponibilidad de nutrientes de las plantas de sorgo granífero y maíz.

Es decir que la adición de GM a la dieta afecta en mayor proporción a materiales fibrosos con mayor disponibilidad de nutrientes que a materiales con menor disponibilidad (altamente lignificados), ya que en estos casos la composición química es la que proporciona el mayor efecto.

Al igual que en el capítulo 2, si se contrastan los resultados de los materiales fibrosos estudiados con la degradabilidad ruminal del patrón celulosa (CEL), se puede observar que en los materiales de estudio existen limitaciones impuestas por la composición química de cada material. A su vez puede observarse que si bien en este segundo estudio las condiciones de los ambientes ruminales de las dietas 0GM y 60GM fueron levemente diferentes de las reportadas en el primer estudio, los resultados obtenidos por el aporte de GM a la dieta proporcionan las mismas conclusiones en cuanto a degradabilidad de la fibra.

Como se mencionara en el capítulo anterior, estudios previos indican que los forrajes de alta calidad se ven menos afectados por la disminución del pH que los de baja calidad. Si bien el pH en este estudio no surtió el efecto esperado, se observa el mismo patrón de respuesta. Podría concluirse que variaciones leves en las condiciones de los ambientes ruminales afectan la degradabilidad de la fibra y que en este ensayo en particular, el grado de lignificación de la pared celular y la resistencia a la hidrólisis microbiana que presenta cada material habrían sido los condicionantes de mayor importancia a la hora del estudio de la degradabilidad de las fibras.

Una forma de evaluar la calidad de un forraje es por su digestibilidad potencial a las 48 horas (Oba y Allen 2005). En este horario, CEL se vio afectada por inclusiones del 60% de GM a la dieta, mientras que el agregado del BS provocó que la degradabilidad del polisacárido presentara valores similares a los encontrados en dietas 0GM y 0GM+BS. En el caso de los materiales fibrosos evaluados, no se observó un efecto del agregado de BS a la dieta, en el horario en cuestión. Esto se debería a que la estructura de la pared celular afecta el comportamiento de la degradación de la celulosa debido a la complejidad de la matriz donde se encuentra. Se refuerza la idea de que, en las condiciones de este ensayo, los esfuerzos para aumentar la degradabilidad de la fracción fibrosa de las dietas deben estar dirigidos al

aumento de la disponibilidad de la fracción de carbohidratos potencialmente digestibles, como la celulosa.

No se detectó ( $P = 0,49$ ) un efecto significativo debido a la adición de BS sobre la degradabilidad de la fracción de la proteína bruta (DPB). Estos resultados que concuerdan con los obtenidos por Zinn et al. (1993) en dietas energéticas de terminación suplementadas con 0,75% de BS para novillos de carne.

La adición de GM reveló interacciones con Hora ( $P < 0,01$ ) (Tabla 3.5) y MAT ( $P = 0,02$ ) (Tabla 3.6). Dietas 0GM reportaron mayor DPB a partir de las 24 horas de incubación que dietas 60GM (Tabla 3.5). Al culminar el ensayo las dietas 0GM mostraron un valor de DPB de 6,8 puntos porcentuales más altos que las dietas 60GM. En cuanto a los materiales estudiados tanto PM como PSG y PSF tuvieron una merma en la DPB con el agregado de maíz, mientras que PLL no se vio afectado (Tabla 3.6).

Hubo interacción MAT x Hora ( $P < 0,01$ ) debido a la naturaleza de los materiales fibrosos estudiados (Tabla 3.7). Tanto PLL como PSG y PSF describieron patrones de DPB constantes a lo largo de las horas de muestreo, en cambio PM mostró un punto de inflexión entre las 8 y las 12 horas de incubación alcanzando un valor máximo de 64% a las 48 horas, el cual se mantuvo constante hasta finalizar el ensayo.

### 3.4 CONCLUSIONES

La adición de BS no afectó el pH ruminal ni la concentración de N-NH<sub>3</sub>, aunque la inclusión de BS en la dieta base de forraje de mediana calidad junto con la degradación del expeller de soja, podrían lograr una estabilidad en las fluctuaciones de N-NH<sub>3</sub> en los horarios post alimentación.

El agregado de BS en la dieta no afectó la degradabilidad *in situ* de la MS de los materiales estudiados. Tampoco se detectaron efectos debido a la adición de BS sobre la DFDN ni la DFDA de PLL, PSG, PSF y PM. Sin embargo en el horario de las 48 horas de incubación el agregado del BS provocó que la degradabilidad de la celulosa totalmente disponible para su degradación (CEL) en la dieta 60GM+BS, presentara valores similares a los encontrados en dietas 0GM y 0GM+BS. Esto se debe a que en los materiales testeados, la estructura de la pared celular afecta el comportamiento de la degradación de la celulosa debido a la complejidad de las matrices donde se encuentra. Esto refuerza la idea de que para aumentar la degradabilidad de la fracción fibrosa de las dietas, los estudios deben estar orientados a encontrar la forma de aumentar de la disponibilidad de la fracción de carbohidratos potencialmente digestibles, como la celulosa.

Por lo observado en este experimento podría hipotetizarse que la adición de BS podría ser más efectiva cuando la proporción de concentrado fuera mayor a la utilizada en el presente estudio, o también cuando el concentrado de la dieta fuera un almidón más rápidamente fermentecible, o fuera suministrado por períodos de tiempo más largos. También se observa que la adición de BS sería más efectiva cuanto más disponible se encuentren los carbohidratos estructurales en las matrices fibrosas.

Tabla 3.1. Composición química de las dietas utilizadas en el ensayo de degradabilidad *in situ*.

	0GM	60GM	0GM + BS	60GM + BS
FDN	70,77	34,23	70,77	34,23
FDA	50,53	21,23	50,53	21,23
DMS	49,54	72,36	49,54	72,36
EM	1,79	2,61	1,79	2,61
PB	9,73	10,82	9,73	10,82
BS	0	0	0,75	0,75

GM: grano de maíz; BS: Bicarbonato de sodio. 0GM: 0% grano de maíz en la dieta; 60GM: 60% grano de maíz en la dieta; 0GM + BS: 0% grano de maíz más 0,75% de bicarbonato de sodio; 60GM + BS: 60% de grano de maíz más 0,75 % de bicarbonato de sodio en la dieta.

FDN: fibra detergente neutro (%); FDA: fibra detergente ácido (%); DMS: digestibilidad de la materia seca (%); EM: energía metabolizable (Mcal/kgMS) y PB: proteína bruta (%). Los resultados son expresados en % base seca.

Tabla 3.2. Composición química de los materiales fibrosos incubados en rumen.

Parámetros	PSF	PSG	PM	PLL
PB	2,68	1,78	7,14	4,12
FDN	64,79	67,35	69,59	81,97
FDA	40,14	44,77	41,98	48,28
Hemicelulosa	24,65	22,58	27,61	33,69
DMS	57,63	54,02	56,20	51,29

PSF: planta de sorgo forrajero; PSG: planta de sorgo granífero sin grano; PM: planta de maíz sin grano; PLL: forraje de pasto llorón.

PB: proteína bruta (%); FDN: fibra detergente neutro (%); FDA: fibra detergente ácido (%); DMS: digestibilidad de la materia seca (%). Los resultados son expresados en % base seca.

Tabla 3.3. Parámetros asociados al ambiente ruminal: pH y N-NH<sub>3</sub>.

H (h)	Tratamiento	pH	N-NH <sub>3</sub>
0	0GM	6,82 a	7,16 a
	0GM+BS	6,95 a	5,98 a
	60GM	6,59 b	6,46 a
	60GM+BS	6,52 b	4,50 a
2	0GM	6,72 a	14,38 a
	0GM+BS	6,82 a	14,92 a
	60GM	6,51 b	13,07 a
	60GM+BS	6,52 b	10,68 b
4	0GM	6,68 a	13,09 a
	0GM+BS	6,74 a	14,14 a
	60GM	6,37 b	10,77 b
	60GM+BS	6,30 b	8,09 b
8	0GM	6,64 a	6,66 a
	0GM+BS	6,63 a	6,88 ab
	60GM	6,31 b	3,98 b
	60GM+BS	6,40 b	2,33 c
12	0GM	6,58 a	2,52 a
	0GM+BS	6,75 a	7,25 b
	60GM	6,25 b	2,49 a
	60GM+BS	6,18 b	1,67 a
24	0GM	6,93 a	5,27 a
	0GM+BS	6,98 a	5,09 a
	60GM	6,81 ab	4,06 a
	60GM+BS	6,69 b	3,47 a
EEM		0,100	1,500
<i>p-valor</i>	GM	<0,01	0,14
	BS	0,79	0,80
	H	<0,01	<0,01
	GM*BS	0,48	0,45
	GM*H	0,07	0,69
	BS*H	0,87	0,66
	GM*BS*H	0,34	0,84

GM: grano de maíz en la dieta; BS: bicarbonato de sodio en la dieta; H: horas de incubación; EEM: Error estándar de la media. Letras diferentes en la misma columna difieren estadísticamente ( $p < 0,05$ ), la comparación se realiza dentro de cada uno de los horarios.

Tabla 3.4. Interacción Tratamiento x GM para Degradabilidad ruminal de celulosa.

H (h)	Tratamiento	Degradabilidad	H (h)	Tratamiento	Degradabilidad
0	0GM	21,31 a	12	0GM	34,91 a
	60GM	21,89 a		60GM	30,08 a
	0GM+BS	21,19 a		0GM+BS	35,16 a
	60GM+BS	21,68 a		60GM+BS	30,40 a
2	0GM	23,84 a	24	0GM	46,23 a
	60GM	23,43 a		60GM	38,71 b
	0GM+BS	23,74 a		0GM+BS	48,40 a
	60GM+BS	23,78 a		60GM+BS	37,33 b
4	0GM	24,81 a	48	0GM	62,29 a
	60GM	24,20 a		60GM	53,66 b
	0GM+BS	24,76 a		0GM+BS	64,67 a
	60GM+BS	24,28 a		60GM+BS	57,71 a
8	0GM	28,22 a	72	0GM	69,17 a
	60GM	26,42 a		60GM	63,42 a
	0GM+BS	27,81 a		0GM+BS	69,89 a
	60GM+BS	26,42 a		60GM+BS	64,14 a
EEM					2,933
p-valor					
Tratamiento					0,01
Hora					<0,01
Tratamiento*H					0,94

GM: grano de maíz; BS: Bicarbonato de sodio; H: horas de incubación; EEM: Error estándar de la media. Letras diferentes en la misma columna difieren estadísticamente ( $p < 0,05$ ), la comparación se realiza dentro de cada uno de los horarios.

Tabla 3.5. Interacción GM x H para DFDN, DFDA y DPB.

H (h)	GM (%)	DFDN (%)	DFDA (%)	DPB (%)
0	0	12,45 a	10,38 a	40,45 a
	60	13,62 a	11,34 a	40,43 a
2	0	14,87 a	12,38 a	42,81 a
	60	15,75 a	13,26 a	41,84 a
4	0	16,35 a	13,64 a	41,87 a
	60	15,58 a	13,02 a	41,01 a
8	0	19,65 a	16,28 a	42,79 a
	60	18,34 b*	14,99 b*	40,24 b*
12	0	25,71 a	21,67 a	44,94 a
	60	22,16 b	18,36 b	42,45 a
24	0	35,69 a	31,30 a	49,55 a
	60	27,84 b	23,30 b	43,91 b
48	0	48,10 a	44,31 a	53,92 a
	60	39,40 b	35,00 b	48,11 b
72	0	55,63 a	52,67 a	57,42 a
	60	47,86 b	43,81 b	50,58 b
EEM		1,972	1,856	1,128
p-valor				
	GM	0,15	0,10	< 0,01
	BS	0,95	0,94	0,49
	Mat	< 0,01	< 0,01	< 0,01
	Hora	< 0,01	< 0,01	< 0,01
	GM*BS	0,76	0,48	0,64
	GM*Mat	0,10	0,02	0,02
	BS*Mat	0,65	0,25	0,23
	GM*H	< 0,01	< 0,01	< 0,01
	BS*H	0,35	0,34	0,38
	Mat*H	< 0,01	< 0,01	< 0,01
	GM*Mat*H	0,49	0,37	0,38
	BS*Mat*H	0,31	0,45	0,64
	GM*BS*Mat*H	0,66	0,70	0,19

DFDN: degradabilidad de la FDN; DFDA: degradabilidad de la FDA; DPB: degradabilidad de la PB; GM: grano de maíz; Mat: material; H: horas de incubación; PLL: forraje de pasto llorón; SPM: ensilaje de planta de maíz (sin grano); SSG: ensilaje de sorgo granífero (sin grano); SSF: ensilaje de sorgo forrajero (sin grano). EEM: Error estándar de la media. Letras diferentes en la misma columna difieren estadísticamente  $p < 0,05$ .

Tabla 3.6. Interacción MAT x H para DFDN, DFDA y DPB.

H (h)	Material	DFDN (%)	DFDA (%)	DPB (%)
0	PLL	14,28 a*	9,51 a	36,96 a
	PM	13,38 b	9,76 b	38,45 a
	PSF	12,34 b	10,58 b	52,10 b
	PSG	12,14 b	13,58 c	34,26 c
2	PLL	13,74 a	9,53 a	40,75 a
	PM	16,04 a	12,20 b	41,58 a
	PSF	16,28 b	13,51 c	51,84 b
	PSG	15,19 a	16,02 d	35,14 c
4	PLL	14,32 a	10,73 a	43,13 a
	PM	17,03 b	13,01 b	40,10 b
	PSF	16,58 b	13,12 b	50,09 c
	PSG	15,94 b	16,46 c	32,45 d
8	PLL	15,69 a	10,82 a	44,29 a
	PM	20,75 b	16,01 b	41,16 b
	PSF	19,63 b	15,75 b	49,76 c
	PSG	19,91 b	19,97 c	30,84 d
12	PLL	18,05 a	12,86 a	45,43 a
	PM	28,00 b	22,61 b	45,42 a
	PSF	24,02 c	19,35 c	51,18 b
	PSG	25,69 d	25,26 d	32,75 c
24	PLL	23,92 a	18,40 a	47,94 a
	PM	38,47 b	31,97 b	53,26 b
	PSF	30,78 c	25,86 c	51,39 c
	PSG	33,89 d	32,98 b	34,33 d
48	PLL	32,18 a	27,71 a	49,58 a
	PM	52,43 b	45,89 b	64,22 b
	PSF	42,15 c	37,59 c	54,04 c
	PSG	48,25 d	47,43 d	36,21 d
72	PLL	40,93 a	37,52 a	52,69 a
	PM	60,34 b	54,46 b	67,56 b
	PSF	49,87 c	45,76 c	55,31 a
	PSG	55,84 d	55,22 b	40,43 c
EEM		1,577	1,495	1,188
<i>p-valor</i>				
	GM	0,15	0,10	< 0,01
	BS	0,95	0,94	0,49
	MAT	< 0,01	< 0,01	< 0,01
	H	< 0,01	< 0,01	< 0,01
	GM*BS	0,76	0,48	0,64
	GM*Mat	0,10	0,02	0,015
	BS*Mat	0,65	0,25	0,23
	GM*H	< 0,01	< 0,01	< 0,01
	BS*H	0,345	0,34	0,38
	Mat*H	< 0,01	< 0,01	< 0,01
	GM*Mat*H	0,49	0,37	0,38
	BS*Mat*H	0,31	0,45	0,64
	GM*BS*Mat*H	0,66	0,70	0,19

DFDN: degradabilidad de la FDN; DFDA: degradabilidad de la FDA; DPB: degradabilidad de la PB; GM: grano de maíz; Mat: material; H: horas de incubación; PLL: forraje de pasto llorón; SPM: ensilaje de planta de maíz (sin grano); SSG: ensilaje de sorgo granífero (sin grano); SSF: ensilaje de sorgo forrajero (sin grano). EEM: Error estándar de la media. Letras diferentes en la misma columna difieren estadísticamente  $p < 0,05$ .

Tabla 3.7. Interacción Mat x GM para DFDN, DFDA y DPB.

Material	GM (%)	DFDN (%)	DFDA (%)	DPB (%)
PLL	0	23,04a	18,47a	45,48
	60	20,24a	15,80a	44,71
PM	0	32,85a	28,01a	51,03
	60	28,76b	23,46b	46,90
PSF	0	28,06a	24,47a	53,80
	60	24,85a	20,91a	50,13
PSG	0	30,27a	30,36a	36,56
	60	26,44b	26,37b	32,54
EEM		1,847	1,810	
p-valor				
	GM	0,15	0,10	< 0,01
	BS	0,95	0,94	0,49
	Mat	< 0,01	< 0,01	< 0,01
	Hora	< 0,01	< 0,01	< 0,01
	GM*BS	0,76	0,48	0,64
	GM*Mat	0,10	0,02	0,02
	BS*Mat	0,65	0,25	0,23
	GM*H	< 0,01	< 0,01	< 0,01
	BS*H	0,35	0,34	0,38
	Mat*H	< 0,01	< 0,01	< 0,01
	GM*Mat*H	0,49	0,37	0,38
	BS*Mat*H	0,31	0,45	0,64
	GM*BS*Mat*H	0,66	0,70	0,19

DFDN: degradabilidad de la FDN; DFDA: degradabilidad de la FDA; DPB: degradabilidad de la PB; GM: grano de maíz; Mat: material; H: horas de incubación; PLL: forraje de pasto llorón; SPM: ensilaje de planta de maíz (sin grano); SSG: ensilaje de sorgo granífero (sin grano); SSF: ensilaje de sorgo forrajero (sin grano). EEM: Error estándar de la media. Letras diferentes en la misma columna difieren estadísticamente  $p < 0,05$ .

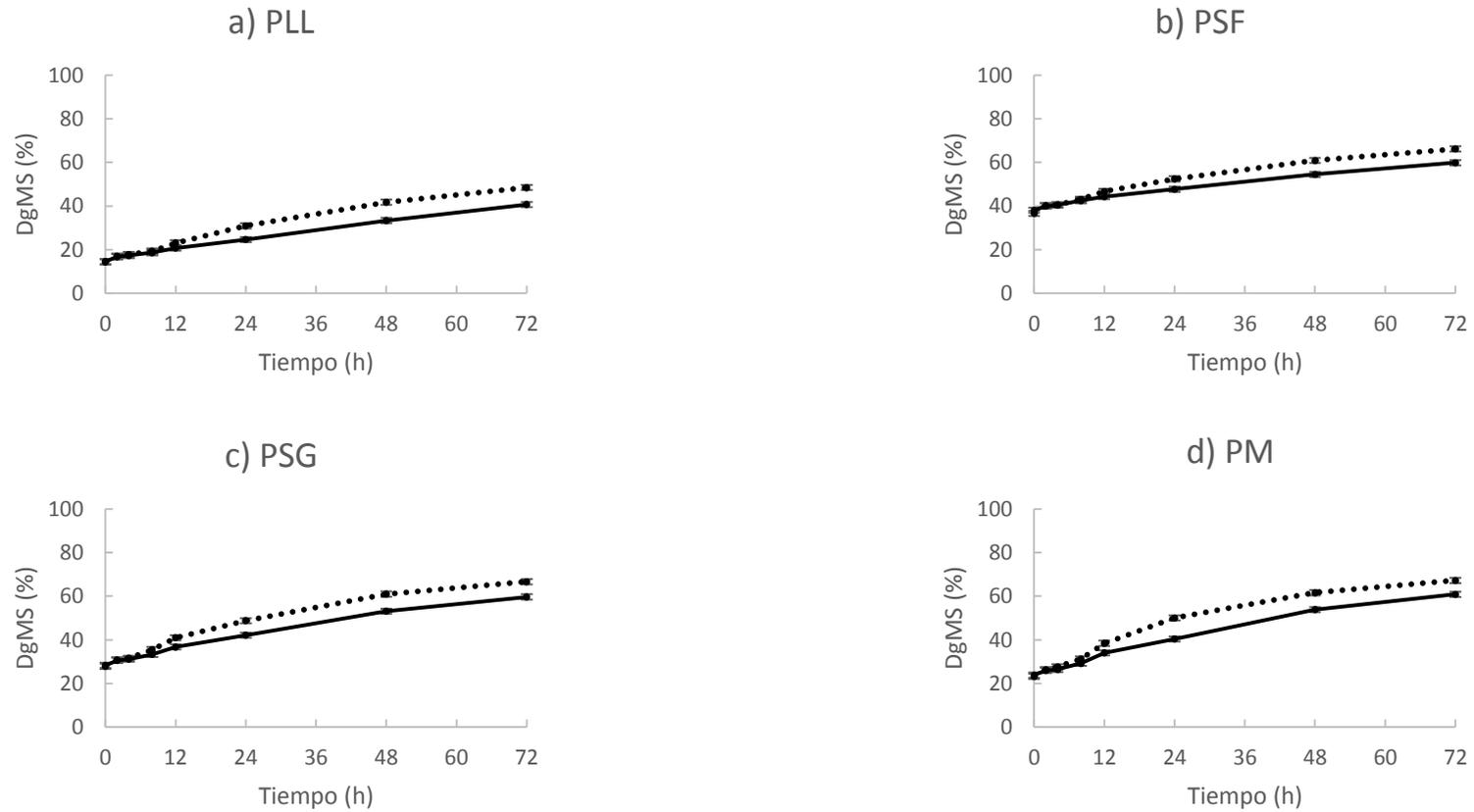


Figura 3.1. Patrón de degradabilidad in situ de la MS (DgMS) de los materiales (Mat) a) forraje de pasto llorón (PLL), b) planta de sorgo forrajero (PSF), c) planta de sorgo granífero sin grano (PSG), d) planta de maíz sin grano (PM) y e) celulosa (CEL) en dietas con 0% (...) y 60% (\_\_\_) de grano de maíz. GM = grano de maíz, BS= bicarbonato de sodio, H: horas de incubación. GM  $P < 0,0001$ ; BS  $P = 0,3278$ ; H  $P < 0,0001$ ; Mat  $P < 0,0001$ ; GM x Mat  $P = 0,0008$ ; GM x Hora  $P < 0,0001$ ; Mat x H  $P = 0,0001$ ; GM x Mat x H  $P = 0,0016$ .

## **CAPITULO 4: DESARROLLO DE CALIBRACIONES NIRS PARA LA PREDICCIÓN DE LOS PARÁMETROS FDN, FDA Y PB EN RESIDUOS FIBROSOS DE MATERIAL DEGRADADO *IN SITU*.**

---

### **4.1 INTRODUCCION**

La espectroscopía de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS por sus siglas en inglés) es una tecnología de análisis establecida en el mundo como una técnica, no destructiva, rápida, de bajo costo operativo y amigable con el medio ambiente. Es utilizada en la determinación de atributos cualitativos y cuantitativos en una gran variedad de sectores productivos, ya que por sus características resulta una alternativa a los análisis tradicionales de laboratorio, especialmente para el control de calidad de alimentos. Sin embargo, siempre es necesario el uso de técnicas de referencia (química húmeda) para el desarrollo y mantenimiento de los modelos predictivos NIRS, también denominados ecuaciones de calibración NIRS (Deaville, E.R. and Flinn, P.C. editado por Givens, 2000; Osborne, 2000).

#### **4.1.1 Métodos de referencia**

El análisis de laboratorio del tipo de materiales del presente trabajo tradicionalmente se hace por el método proximal. En él se determina el % de MS por secado, el % de Proteína Bruta (PB) determinado por el método de Kjeldahl, y el % de Fibras a través de digestión consecutiva en álcalis y ácidos (método Van Soest).

Van Soest ha publicado varios trabajos (1967, 1991, 1993 y 1994) donde explica el procedimiento de análisis de fibra mediante el método de detergentes como una herramienta de clasificación de las fracciones del forraje. Este método tradicional es la metodología de referencia para la cuantificación de fibras de interés nutricional en alimentación animal, pero es de alto costo operativo e implica el uso de reactivos contaminantes, es por esto que siempre se buscan metodologías alternativas que lo puedan reemplazar o complementar.

Otros métodos que otorgan resultados más precisos pero de alto coste, también, son la cromatografía líquida de alta presión (HPLC, por su sigla en inglés) y la espectroscopía de resonancia magnética nuclear del carbono 13 ( $^{13}\text{C-NMR}$ ). Estos han sido utilizados para caracterizar compuestos más específicos que componen la fibra como hemicelulosa, lignina, y el complejo lignina-carbohidrato.

Diversas y modernas técnicas instrumentales analíticas basadas en las propiedades de las muestras han sido desarrolladas en respuesta a la necesidad de una alternativa a los métodos tradicionales. El método NIRS ha sido uno de los más exitosos ya que cumple los requisitos para un buen método analítico (Osborne, 2000), a la vez que resulta de muy bajo costo operativo.

#### **4.1.2 Bases de la Espectroscopía en Infrarrojo Cercano (NIRS)**

La radiación en el infrarrojo cercano (NIR) va desde los 700 a los 2500 nm (Figura 4.1) dentro del espectro electromagnético, y tiene la capacidad de penetrar en una muestra sólida de forma significativa adquiriendo información relevante de la misma. Esta radiación no es lo suficientemente energética como para provocar transiciones electrónicas como ocurre en el UV-Visible o los rayos X, por lo que las bandas que aparecen en la zona NIR se deben principalmente a cambios en los estados vibracionales de la molécula debidos a la interacción entre la radiación NIR y los enlaces orgánicos (por ejemplo -CH, -OH y -NH). Estos patrones de vibraciones pueden ser de estiramiento (stretching) simétrico o asimétrico, y de flexión (bending) del tipo balanceo en el plano, tijereteo en el plano, aleteo fuera del plano y torsión fuera del plano (Shenk et al., 2001) (Figura 4.1). Por tanto, la absorción en el NIR se debe a los armónicos y bandas de combinación de las vibraciones fundamentales de las moléculas. Una molécula absorbe esta radiación cuando experimenta un cambio neto en el momento dipolar como consecuencia de su movimiento de vibración o rotación. Las bandas más frecuentes en NIR son aquellas que contienen átomos con diferencias en peso molecular importantes. En la Figura

4.2 se puede observar la asignación de bandas a los distintos grupos orgánicos reportados.

El espectro NIR representa gráficamente los valores de absorbancia obtenidos a diferentes longitudes de onda dependiendo de la concentración de componentes químicos o de características físicas de la muestra analizada. La complejidad de los espectros NIR se debe a la existencia de bandas de combinación y sobretonos para una misma molécula, provocando la superposición de las mismas y generándose bandas anchas, solapadas y de baja intensidad. Para poder extraer información a partir de los espectros NIR es necesario resolver el solapamiento de bandas de absorción mediante el uso de la quimiometría.

#### **4.1.3 La quimiometría aplicada a la tecnología NIRS**

En un determinado rango de longitud de onda en NIR, un pico es la sumatoria de la absorción de energía de distintas especies químicas. Por ejemplo en la Figura 4.3 puede observarse la superposición de bandas correspondientes a diferentes componentes de una muestra de suero en la determinación de glucosa en sangre. Es por ello que para extraer la información espectral se recurre a la aplicación de algoritmos matemáticos.

La quimiometría es el conjunto de métodos estadísticos cuya finalidad es analizar simultáneamente conjuntos de datos multivariantes donde hay disponibles varias variables medidas para cada muestra estudiada. Para ello emplea una serie de métodos en la resolución de las problemáticas más comunes del análisis mediante tecnología NIR (Roggo et al., 2007), los cuales son:

- Filtrado de señales o pretratamientos matemáticos: permite mejorar la calidad de la señal instrumental, eliminando o reduciendo el ruido electrónico (información no relevante).
- Métodos de reconocimiento de pautas o clasificación: permiten establecer relaciones entre muestras para agruparlas según la similitud de sus espectros o crear agrupaciones de muestras capaces de clasificar nuevas

muestras como pertenecientes a un grupo determinado de una forma objetiva. En estos métodos se basa el análisis cualitativo NIRS.

- Métodos de calibración multivariado o regresión: métodos muy diversos y utilizados en la actualidad para relacionar la señal analítica (información espectral) con la propiedad a determinar, base del análisis cuantitativo NIRS.

#### **4.1.4 El proceso de modelado**

La exactitud (coincidencia de los datos predichos por NIRS con los datos de laboratorio de referencia) y precisión (reproducibilidad de resultados) de una calibración depende principalmente de tres factores:

- La elección del conjunto de calibración
- la calidad de los datos de referencia y obtención de la señal analítica
- el tratamiento matemático de los datos espectrales en el proceso de calibración.

#### **4.1.5 Elección del conjunto de calibración**

El conjunto de calibración tiene que estar formado por un número limitado de muestras que represente las posibles fuentes de variación que se encontrarán en las muestras desconocidas. En una calibración multivariada las muestras deben incorporar la mayor variabilidad posible, y ser representativas de todo el intervalo del parámetro a determinar. De esta manera quedará cubierto el rango de concentraciones que puedan afectar al cálculo de interpolación, evitando extrapolar por fuera de los límites de los datos de calibración.

#### **4.1.6 Calidad de los datos de referencia y obtención de la señal analítica**

Los valores de los parámetros a determinar se deben obtener mediante el uso de un método de referencia. Es fundamental que éstos proporcionen

valores precisos y exactos de las concentraciones o propiedades de la muestra, ya que de ello dependerá la exactitud del modelo multivariado que se obtenga (Maspocho et al., 2012). Normalmente se requiere el uso de muestras replicadas (Olivieri, 2015).

En la obtención de la señal analítica se debe procurar que pase el menor tiempo posible entre la lectura y el análisis de laboratorio, ya que pueden suceder variaciones en la muestra. Las muestras sólidas que van a ser utilizadas en equipos de reflectancia deben ser previamente secas y molidas, a excepción del caso especial de granos o pellets que pueden analizarse enteros. De esta manera, se controlan factores que puedan afectar los resultados. Los principales factores de la muestra que afectan los espectros medidos en el equipo NIRS son: humedad, tamaño de la partícula y temperatura. En el caso de la humedad, los enlaces de hidrógeno y oxígeno del agua absorben fuertemente la radiación del infrarrojo (Christensen, L.K., 2004). En cuanto al tamaño de la partícula este debe ser homogéneo, de lo contrario absorberá mayor radiación, en la medida que la partícula sea de mayor tamaño. Para controlar este factor se usan molinos calibrados con cribas para 1 mm, ya que la pulverización también genera variación (Givens et al., 1997). La temperatura provoca generalmente un aumento en la señal. También debe adoptarse una metodología consistente de homogenización y presentación de la muestra, carga y descarga, limpieza entre muestras y es conveniente analizar muestras replicadas.

#### **4.1.7 Calibración: el cálculo del modelo**

El espectro NIR no sólo depende de la composición química de la muestras, sino también de algunas propiedades físicas como el tamaño, forma, distribución, y compactación de las partículas. Por este motivo es que se necesitan una serie de tratamientos matemáticos, previos al desarrollo del modelo, para reducir el ruido y hallar la relación más simple entre la señal analítica y la propiedad o constituyente a calibrar.

Un modelo de calibración se traduce como una función matemática con dos variables: la dependiente (Y) y la independiente (X). Su forma básica se presenta como sigue:

$$Y = f(X) = Xb$$

Cuando uno o más espectros de las muestras se organiza en forma de una matriz  $X_{ij}$ , correspondiente a valor de la absorbancia  $[\log(1/R)]$  de la muestra "i" en alguna longitud de onda "j" (en nm), el dato espectral X se expresa:

$$X = [X_{11} \ X_{12} \ X_{13} \ \dots \ X_{1j}]$$

Ello desemboca en un análisis de regresión, donde para una calibración simple la ecuación sería (siendo  $\beta$  el vector de regresión y  $\tau$  el error del modelo):

$$y = X\beta + \tau$$

Mientras que para una calibración multivariada sería:

$$y = \tau + X_1 \beta_1 + X_2 \beta_2 + \dots + X_n \beta_n \quad n: \# \text{ variables independientes}$$

#### **4.1.8 Análisis exploratorio de datos espectrales en el proceso de calibración**

El método más empleado para un análisis exploratorio de datos espectrales es el Análisis de Componentes Principales (PCA por sus siglas en inglés) (Martens, 2001). El PCA es un algoritmo que permite simplificar la matriz de datos y agilizar cálculos complejos, como por ejemplo medidas de distancias espectrales, que resultan útiles para la detección de muestras anómalas (*outliers*). La detección de *outliers* es un punto crítico en el desarrollo de modelos NIRS de calibración, ya que pueden influir en la capacidad predictiva del modelo. El software WINISI (Infrasoft International, Port Matilda, PA, EEUU) se basa en la realización de un PCA, seguido del cálculo de distancias entre los espectros (la más usada es la distancia de Mahalanobis), permitiendo estudiar la estructura y variabilidad espectral de la población de

muestras y detectar muestras anómalas. En la figura 4.4 se puede observar un gráfico 3D a modo de ejemplo de una población general con un *outlier* espectral marcado en fucsia.

#### 4.1.9 Pre-tratamientos espectrales

Una vez almacenados los espectros, el próximo paso debe ser la elección del método de tratamiento matemático de los datos. Los más utilizados para muestras de forraje son el logaritmo de la reflectancia recíproca [ $\log (1/R)$ ] y las derivadas de primer y segundo grado.

Los pretratamientos espectrales tienen como objetivo minimizar contribuciones espectrales no deseadas, simplificando los modelos y por ende, acrecentar la señal del analito de interés. No todos los pretratamientos consiguen estos objetivos simultáneamente, por lo que la selección del más apropiado es puramente experimental. Los pretratamientos espectrales más utilizados son:

Promedio de Espectros: El ruido es considerado una variación instrumental aleatoria, por lo que promediando varias señales analíticas de la misma muestra, el ruido disminuye y se mejora la relación señal/ruido.

Suavizado Espectral: Los métodos de suavizado son utilizados para reducir matemáticamente el ruido aleatorio o incrementar la relación señal/ruido (Beebe et al., 1998). Estos métodos utilizan una ventana de puntos para determinar un valor central, desplazando la ventana a lo largo de todo el espectro. Los métodos más utilizados son el de Savitzky-Golay (Savitzky y Golay, 1964) y el de la Transformada de Fourier (Horlick, 1972).

Derivadas: Es uno de los pretratamientos más utilizados en espectroscopía NIR por su capacidad de resolver el solapamiento de bandas y los desplazamientos de línea base. La primera derivada elimina los desplazamientos de la línea base constantes, mientras que la segunda derivada elimina los desplazamientos que varían linealmente con la longitud de onda. Las derivadas por el método de Savitzky-Golay incorporan un suavizado, por lo que el tamaño de ventana es un parámetro crítico. La notación de estas

transformaciones se indica con cuatro dígitos que detallan: el orden de la derivada, la brecha sobre la cual se calcula la derivada (gap), la cantidad de datos que se promedian o primer suavizado y el segundo suavizado (Naes et al., 2002). Por ejemplo en 1,4,4,1 el primer dígito indica que se trata de la primer derivada, sobre cuatro puntos del espectro con un suavizado cada cuatro puntos y sin un segundo suavizado.

Un aspecto que influye de manera importante en la baja selectividad de la información espectral NIR es la dispersión de la radiación incidente, también denominada efecto de dispersión (Burns y Ciurczak, 1992; Osborne, 1993; Bertrand y Dufour, 2000). Este hecho es debido a fenómenos físicos, como la textura, el tamaño y la geometría de las partículas que conforman la muestra (Iwamoto, 1991; Shenk et al., 1992), que afectan el índice de refracción del material que interacciona con la radiación, lo que provoca numerosas variaciones no deseadas en los datos espectrales NIR (Barnes et al., 1989; Dhanoa et al., 1994; Fernández y Garrido, 1999; Naes et al., 2002). Para separar la información existente en el espectro NIR debido a estas variaciones de origen físico de aquellas que aporten información meramente química, se han desarrollado numerosos métodos quimiométricos, a los cuales se les suele agrupar bajo el nombre de tratamientos de corrección de dispersión (Bertrand, 1993; Bertrand y Dufour, 2000). Algunos de estos tratamientos son: SNV o (standard normal variate), MSC (multiplicative scatter correction) y DT (detrending).

El SNV se utiliza principalmente para corregir variaciones de la línea base producida por la dispersión (Barnes et al., 1989), por lo que puede ser útil para sólidos o muestras líquidas con turbidez. Con este pretratamiento se centra cada espectro, restando el valor medio de la absorbancia del espectro a los valores de absorbancia de cada longitud de onda, dividido todo ello por la desviación estándar.

El MSC se utiliza para compensar efectos multiplicativos o aditivos debidos a la dispersión. Este tratamiento corrige los desplazamientos entre muestras aplicando a los espectros originales los parámetros de la recta, obtenida por mínimos cuadrados, representando los valores de absorbancia de

un intervalo de longitudes de onda en el que no absorba el analito frente a los valores de absorbancia de un espectro de referencia.

El DT es un tratamiento para quitar los efectos de desplazamientos en la línea de base, así como la pendiente o curvatura de los espectros, comúnmente causados por la dispersión. Normalmente se aplica conjuntamente a otros tratamientos (por lo general el SNV).

#### **4.1.10 Regresión lineal**

Una vez llevados a cabo los pasos anteriores, se puede proceder a la calibración como tal por métodos cuantitativos, especialmente mediante diferentes métodos de regresión lineal. Los métodos de regresión lineal más utilizados son Regresión Lineal Múltiple (MLR), Regresión por Componentes Principales (PCR), Mínimos Cuadrados Parciales (PLS), y Mínimos Cuadrados Parciales Modificados (MPLS). Los dos últimos métodos son los más usados para el análisis de productos agroalimentarios (Roggo et al., 2007).

El método PLS tiene como objetivo establecer un vínculo lineal entre dos matrices, la de los datos espectrales ( $X$ ) y la de los valores de referencia ( $Y$ ), a través del cálculo con algoritmos de mínimos cuadrados (Osborne, 2000; Roggo et al., 2007). Dicho de otro modo, el algoritmo PLS lleva a cabo una regresión multivariante en la que se reducen los datos espectrales a una serie de variables fundamentales que no sólo resumen la mayor parte de la información espectral, sino que también son las que mayor correlación alcanzan con los valores de referencia. Por otra parte, en la regresión MPLS los residuos obtenidos después del cálculo de cada término de regresión son estandarizados (dividiendo por la desviación típica antes de calcular el siguiente término de regresión). Se postula que es más estable que el PLS, aunque no es la mejor técnica para calibrar en todas las situaciones (Shenk et al., 2001).

#### **4.1.11 Validación del modelo**

Se pueden utilizar dos métodos de validación: interna y externa. Una validación interna supone una validación cruzada, donde se utiliza el mismo grupo de muestras que se ha usado para el desarrollo de la calibración. Se divide el conjunto de calibración en, por ejemplo, cuatro partes iguales, y se predice una cuarta parte de las muestras con las calibraciones desarrolladas a partir de las tres cuartas partes restantes, y este procedimiento se repite hasta que se incluyen todas las muestras. Otro método de validación es la externa, la cual se lleva a cabo sobre un conjunto de muestras distintas del grupo de muestras que originó la calibración.

#### **4.1.12 Tecnología NIRS para análisis de Fibras y PB**

Existen numerosos trabajos que muestran el desarrollo de calibraciones para los parámetros FDN y FDA, tanto en planta entera de sorgo como en planta entera de maíz y en sus respectivos ensilados (Corson, D. C. et al., 1999; Park H.S. et al., 2016; Reeves et al., 1989). No obstante, en residuos de digestión provenientes de estudios de degradabilidad *in situ* de estos materiales el desarrollo de calibraciones para FDN y FDA es escasa.

Es destacable también que los trabajos donde se ha evaluado la degradabilidad *in situ* de estas fracciones (FDN y FDA) se han llevado a cabo en ambientes ruminales de animales alimentados con forrajes voluminosos únicamente. La novedad del presente estudio fue el agregado de grano a la dieta base de forraje voluminoso para cuantificar el efecto sobre la degradación de la fibra, lo cual es de esperar origine rangos espectrales distintos a los obtenidos con forrajes voluminosos únicamente.

En el caso de desarrollo de calibraciones para PB en residuos de digestión se han reportados resultados satisfactorios, aunque este parámetro ha sido menos estudiado en comparación con las fibras.

## 4.2 MATERIALES Y METODOS

### 4.2.1 Muestras

El experimento de degradabilidad *in situ* (CAPITULO 3) generó 512 muestras de residuos correspondientes a planta de sorgo granífero (PSG), planta de sorgo forrajero (PSF), planta de maíz (PM) y pasto llorón (PLL), mientras que del ensayo (CAPITULO 2) se obtuvieron 288 residuos provenientes de la degradación de ensilaje de planta de maíz (SPM), ensilaje de planta de sorgo granífero (SSG), ensilaje de planta de sorgo forrajero (SSF) y pasto llorón (PLL). La variabilidad de las muestras para una calibración exitosa se debe a la composición química de los residuos en estudio, al provenir de 2 ensayos *in situ* con diseño cuadrado latino utilizando 5 animales (3 en el primer ensayo y 4 en el segundo, donde 2 de ellos participaron de ambos) alimentados con 5 dietas diferentes. Además, la degradabilidad de cualquier constituyente de un forraje no sólo depende del material en sí, sino también de la interacción con el resto de la dieta y de factores dependientes del animal (Andrés et al., 2005).

Tanto las muestras de planta de maíz y sorgo como las de ensilajes fueron desprovistas del contenido de grano previo a su incubación *in situ*. Todas las muestras fueron molidas a 1 mm en molino ciclónico (Cyclotec, Foss Analytical) para obtener homogeneidad en las posteriores lecturas NIRS.

### 4.2.2 Tecnología NIRS

El espectro de absorción de energía infrarroja cercana (NIRS) de cada muestra fue tomado por duplicado en un equipo NIRSystem 6500 (Foss Analytical) utilizando una cubeta portamuestra rectangular de 27 cm<sup>2</sup>, mediante el sistema de reflectancia en el rango de 400-2500 nm, con mediciones cada 2 nm. Esto implica que al rango de infrarrojo cercano (700-2500 nm) se le sumó también el registro en el rango de luz visible (400-700 nm). Los espectros

fueron grabados en modo de absorbancia como  $[\log (1/R)]$ , siendo R la reflectancia.

Sobre la base de los espectros de las 800 muestras provenientes de los ensayos de degradación ruminal de los Capítulos 2 y 3 se seleccionaron muestras para integrar los conjuntos de calibración. Se establecieron 3 grupos debido a que en la bibliografía consultada se lograron mejores resultados agrupando los materiales a la hora de evaluar calidad de fibra (Corson et al., 1999; Foskolos et al., 2015). Un grupo estuvo compuesto por material degradado en rumen de pasto llorón (PLL). Un segundo grupo compuesto por material degradado en rumen de planta de sorgo y maíz sin grano (PSYM) y un tercer grupo compuesto por material degradado en rumen de ensilajes de sorgo y maíz sin grano (SSYM).

Las muestras elegidas fueron analizadas por técnicas convencionales en el laboratorio determinándose FDN y FDA por método Van Soest (Van Soest et al.; 1991; Van Soest, P. J. 1973) (con un equipo analizador de fibra Ankom® 220), porcentaje de humedad por secado en estufa a 105 °C por 4 h y diferencias de peso, y contenido de PB por método Kjeldhal (PB, N Kjeldhal x 6,25, AOAC 1990) (equipo Kjeltex 200, FOSS). La conformación de los conjuntos de calibración de cada parámetro se detalla en la tabla 4.1.

Se utilizó el software WinISI III para los análisis de los espectros y el desarrollo de los modelos quimiométricos. Para reducir efectos del tamaño de partícula, la compactación de la muestra, el camino óptico, y la multicolinealidad predominante en el espectro  $\log 1/R$  (Barnes et al., 1989), se aplicaron los pretratamientos SVN+D y MSC. Para detectar y corregir las secciones de los espectros que poseían mayor ruido instrumental, los espectros fueron sometidos a diferentes tratamientos matemáticos de derivadas y suavizado: 1,4,4,1; 2,4,4,1; 3,4,4,1 1,10,10,1 y 3,10,10,1 (Foskolos et al., 2015).

Para el desarrollo de las calibraciones se aplicó la técnica de regresión por mínimos cuadrados parciales modificada (MPLS). Se combinó con el método de validación cruzada, con cuatro grupos de validación y un máximo de

2 etapas de eliminación de outliers. Las muestras que presentaron residuales altos ( $t > 2.5$ ) fueron omitidas.

La calibración más adecuada para cada parámetro fue elegida buscando el mínimo error estándar de calibración (SEC) y error estándar de validación cruzada (SECV). También se procuró un valor cercano a 1,0 en los coeficientes de determinación de la calibración ( $R^2$ ) y la validación cruzada ( $R^2_{cv}$ ). Para evaluar la robustez de las predicciones se utilizó el estadístico RPD (por sus siglas en inglés, Relative Prediction Deviation). El RPD es la relación entre la desviación estándar (SD) del conjunto de calibración y el SECV, considerando un RPD  $> 2,5$  como aceptable (Hsu et al., 1998). También se buscó que la relación del error de predicción con el rango (Range to Error Ratio, RER), definido como la relación entre el rango (máximo – mínimo) de los valores de referencia del conjunto de calibración y el SECV, fuera mayor a 10.

Con las calibraciones obtenidas se predijeron los parámetros FDN, FDA y PB en el total de las muestras de residuos de ambos ensayos de degradabilidad *in situ* de los capítulos 2 y 3 de la presente tesis.

### **4.3 RESULTADOS Y DISCUSION**

La hipótesis del presente estudio asume que la tecnología NIRS puede ser utilizada para la predicción de la composición de residuos de distintos materiales forrajeros fibrosos luego de su fermentación ruminal *in situ*. Una condición para lograr esto es disponer de un conjunto adecuado de muestras para calibración y validación de las ecuaciones desarrolladas (Keim et al., 2016).

La bibliografía sugiere el uso de las herramientas quimiométricas más adecuadas para generar el modelo de predicción para cada parámetro, en lugar de usar la misma metodología para todos los parámetros estudiados. También demuestra que el agrupamiento de muestras espectralmente afines, mejora la precisión y confiabilidad los modelos predictivos (Corson, D. C., 1999; Foskolos et al., 2015). Por ejemplo, en Foskolos et al. (2015) evaluaron un conjunto de 809 muestras empleadas comunmente para la formulación de raciones en alimentación animal, por lo que procedieron a agrupar las muestras en dos grupos: forrajeros y no forrajeros. Esto mejoró notablemente los modelos de predicción en comparación a los modelos resultantes de la inclusión de todos los materiales juntos en el conjunto de calibración. En este trabajo se agruparon las muestras según afinidad espectral y rango de FDN (Fibra detergente neutro) en 3 grandes grupos de estudio: PLL (residuos de pasto llorón y panicum), SMYS (residuos de ensilajes de maíz y sorgo, sin grano) y PSYM (residuos de plantas de maíz y sorgo, sin grano).

#### **4.3.1 Espectros**

Los espectros de los grupos PLL, SMYS y PSYM, con sus respectivos promedios se reportan en las figuras: 4.5, 4.6 y 4.7 respectivamente, en el rango de 400 a 2498 nm como Log (1/R). Se observan las bandas de absorción debidas a los sobretonos y bandas de combinación de los enlaces moleculares de tipo: O-H, C-N, C-H, N-H, etc. presentes en las muestras. En la región visible (VIS, 400 a 700 nm) se visualiza la existencia de dos picos, los cuales

se corresponden a las longitudes de onda 434 nm (color azul) y 670 nm (color rojo).

A lo largo de la región NIR se observan diferentes longitudes de onda asociadas a entidades químicas relacionadas a las fracciones de planta. Las regiones documentadas de mayor importancia se resumen en la tabla 4.2. Según Keim et al. (2016) en el rango de 1420 a 1520 nm la absorción está asociada a celulosa, PB y agua. En el presente estudio se encontró además un pico más agudo entre los 1900-1980 nm producto de la absorción del agua, aunque de menor magnitud que al reportado por Keim et al. (2016) debido a que nuestras muestras fueron previamente secadas en estufa. Esto refuerza la idea de la gran influencia de la presencia de agua en las muestras sobre la absorción NIR, y que su reducción mejora la detección de picos correspondientes a otros componentes. Entre los 2050 y 2150 nm aparece una banda ancha y de menor magnitud, con absorciones debidas a proteínas y celulosa (reportada entre 2050–2080 nm). Hacia el extremo superior de la región NIR se encontró nuevamente la aparición de absorciones por parte de celulosa (2480 nm) y PB (2466 nm).

Para el componente PB, aunque se han usado los espectros completos para desarrollar calibraciones en vez de usar segmentos espectrales, las longitudes de onda de mayor importancia predictiva estuvieron localizadas en 1500-1530 nm (primer sobretono), 2050-2060 nm, 1168-1180 nm, 1916 nm y 2300 nm (segundo sobretono), y otros grupos N-H a diferentes longitudes de onda (Workman y Weyer, 2012).

La mayoría de las longitudes de onda asociadas a la estimación de FDN y FDA se encontraron en las mismas regiones indicadas para los contenidos de PB, probablemente porque existe una correlación negativa entre carbohidratos estructurales y PB (Andrés et al., 2005). Wilman et al. (2000) documentaron que la estimación de FDN se encontraba asociada a las longitudes de onda 1680, 1856, 1922 y 2214 nm.

### 4.3.2 Calibración y matrices de validación

La Tabla 4.3 presenta la descripción estadística de los conjuntos de calibración, incluyendo valores promedio, mínimos, máximos, desviación estándar, y el total de muestras utilizadas en las calibraciones elegidas como las más satisfactorias para la predicción de los diferentes parámetros estudiados. Los valores de FDN variaron entre 73,6 y 91,6 % para PLL, 53,0 y 90,5 % para SSYM, y 74,4 y 90,2 % para PSYM. Por otra parte, para FDA los valores oscilaron entre 47,9 y 64,6 % para PLL, 40,7 y 62,5 % para SSYM y 50,2 y 62,6 % para PSYM. El contenido de PB osciló entre 2,8 y 4,9, 2,2 y 6,9, y 1,8 y 6,1 para PLL, SSYM y PSYM, respectivamente.

Los datos en la tabla 4.3 muestran que en general no existen grandes diferencias en los rangos de cada parámetro entre los grupos de calibración en estudio. Estos presentan medias similares y con un rango de variabilidad semejante, excepto para los parámetros FDN y PB de SSYM, lo cual puede atribuirse a que este es un material de mejor calidad que PLL y PSYM. En base a estas similitudes en los valores promedio y sus desvíos se probó generar calibraciones con los tres tipos de materiales juntos, lo cual arrojó resultados poco satisfactorios (no mostrados), y es por ello que se aplicaron las sugerencias de los trabajos publicados de trabajar los residuos por grupos. Los resultados obtenidos para cada grupo de muestras se presentan a continuación.

### 4.3.3 Residuo de Pasto Ilorón degradado *in situ*

#### 4.3.3.1 Análisis exploratorio de datos

La Figura 4.8 muestra la distribución de los datos espectrales del conjunto de calibración para los parámetros FDN y FDA a través de los componentes principales 2, 3 y 4 (+). Estos componentes principales son los que describen la mayor variabilidad de los datos, por lo que la distribución del conjunto de calibración en los ejes indica que es capaz de describir todas estas variaciones, con altas probabilidades de generar una calibración satisfactoria.

Al incluir la información de muestras pertenecientes a los residuos de PLL 2017 y 2018 (□), se observa una integración a la distribución del conjunto de calibración, lo que avala una buena selección de muestras que integran este conjunto.

En el caso del parámetro PB se encontró la misma distribución del conjunto de calibración (+) y las muestras predichas (□) (Figura 4.11) en las componentes principales 1, 2 y 3.

En ambos análisis gráficos no se detectaron *outliers* espectrales.

#### **4.3.3.2 Calibración**

Los resultados de las calibraciones desarrolladas y sus estadísticos para los parámetros estudiados son presentados en la Tabla 4.4.

La estimación de concentración de FDN y FDA más precisa fue obtenida al aplicar los pretratamientos matemáticos 1,4,4,1 y SVN+D, obteniéndose valores de  $R^2_{cv}$  de 0,91 y 0,76, y RPD de 3,27 y 2,61 para FDN y FDA, respectivamente. Estas calibraciones a su vez presentan el menor número de términos posibles en la ecuación y un RER > 10, por lo que se las considera altamente satisfactorias.

La Figura 4.9 muestra la relación entre los datos de FDN por laboratorio y la predicción por NIRS para el conjunto de calibración de residuo de forraje de pasto llorón (PLL). Se observa que los valores se encuentran bien distribuidos, y cercanos a la línea de igual respuesta  $X=Y$ . En el caso de FDA (Figura 4.10) la distribución de muestras se centró en la primera mitad del rango, y no fue tan homogénea en las cercanías de la línea de tendencia, lo que quedó reflejado en un  $R^2$  entre el método de referencia y NIRS de 0,76, menor al alcanzado por FDN (0,91).

En el trabajo de Rabotnikof et al. (1995) para un conjunto de especies estivales de La Pampa encontraron un  $R^2_{cv} = 0,55$  para FDN utilizando un  $n = 26$ , con una media de 78,8% en un rango de 12 puntos. Los autores sugirieron que el valor bajo del  $R^2_{cv}$  se debió al rango acotado del conjunto de calibración, y que las calibraciones se realizaron para las especies en conjunto. En el

presente estudio se encontraron valores FDN más satisfactorios para residuos de dos especies, con un promedio de 86% y un rango similar (16 puntos), con un  $R^2_{cv}$  de 0,91 y un SECV de 1,16. Sin embargo, Sanderson et al. (1999) utilizó una calibración obtenida a partir de un conjunto de calibración constituido por 8 especies estivales y reportó  $R^2_{cv}$  de 0,96 y 0,90 para FDN y FDA, respectivamente. Esto pudo haberse debido a que las muestras elegidas en dicho estudio presentaban una mayor variabilidad espectral y, por lo tanto, el conjunto de variables contribuyeron a dar una mayor robustez a los resultados de predicción encontrados. De todas maneras, esto no puede ser confirmado debido a que el trabajo no reporta los valores de SD que permitan calcular el RPD.

Para PB la ecuación con mejor predicción se obtuvo al aplicar los tratamientos 1,4,4,1 y SVN+D sobre los espectros. Con un RPD de 3,71; un  $R^2_{cv}$  de 0,93 y una RER de 18,81, resultó la calibración más adecuada. La Figura 4.12 muestra la estrecha relación entre los valores de referencia de PB y los predichos por NIRS. La cantidad de muestras incluidas en el conjunto de calibración fue suficiente para la variable en estudio. Los valores de  $R^2_{cv}$  de la calibración obtenida se encontraron en el rango de los reportados en la literatura (0,90, con  $n=49$ , Rabotnikof, 1995; y 0,96, con  $n=94$ , Sanderson, 1999).

En términos generales se encontró mejor precisión predictiva para PB que para los parámetros de fibra FDN y FDA. Una probable explicación a esto es que la proteína es un compuesto químico más definido que FDN y FDA. En estos últimos encontramos la combinación de diferentes entidades químicas, lo cual puede hacer variar las absorciones de energía NIR, alterando las relaciones entre el método de referencia y los datos espectrales obtenidos (Shenk et al., 2001). Sin embargo la precisión predictiva para FDN lograda en el presente estudio fue igual o incluso mejor a la reportada en la bibliografía. El mayor problema se presentó en la calibración obtenida para FDA.

#### **4.3.4 Ensilajes de Maíz y Sorgos**

##### **4.3.4.1 Análisis exploratorio de datos**

La Figura 4.11 muestra la distribución de los datos espectrales del conjunto de calibración a través de los componentes principales 2, 3 y 4 (+). Al incluir la información de muestras a predecir (□) se observa una integración a la distribución descrita por el grupo de calibración, con algunas zonas donde se la incorporación datos de referencia hubiese robustecido la calibración.

En el caso del parámetro PB se encontraron los mismos resultados entre el conjunto de calibración y las muestras predichas (Figura 4.14), pero con los componentes principales 1, 2 y 3.

##### **4.3.4.2 Calibración**

Los ensilajes presentaron un patrón de degradación ruminal levemente diferente a los forrajes en pie, es por ello que se desarrollaron calibraciones por separado para ensilajes y para plantas de maíz y sorgo. En Foskolos et al. (2015) se procedió a la inclusión de ensilajes en calibraciones de degradabilidad de forrajes en pie para aumentar el rango del conjunto de calibración. Sin embargo, debido a la diferencia espectral y por ende química entre la población de ensilajes y la de plantas del presente estudio, se procedió a trabajar las poblaciones por separado.

Los resultados de las calibraciones generadas para los parámetros FDN, FDA y PB son presentados en la Tabla 4.5. Complementario a esto en las Figuras 4.12, 4.13 y 4.15 podemos ver el ajuste lineal entre los datos predichos por NIR y los valores del método de referencia de FDN, FDA y PB, respectivamente.

Se han reportado diversas calibraciones para la determinación de FDN y FDA en ensilajes de planta entera de maíz (tanto en muestras secas como húmedas) y en ensilajes de planta entera de sorgo, por separado, con resultados satisfactorios. (Corson et al., 1999; Park et al., 2016; Reeves et al., 1989). La variabilidad en cada calibración se debe al material ensilado está vinculado al tipo de planta, híbrido, fermentación (completa o incompleta) y

proporción de grano. En el presente trabajo las muestras a predecir fueron residuos de ensilajes incubados *in situ*, por lo que la variabilidad del conjunto de calibración fue proporcionada por tres tipos de ensilajes (SPM, SSF y SSG, sin grano) y tres ambientes ruminales (0GM, 30GM y 60GM). Además se incorporaron 44 muestras de ensilajes de sorgo degradados en rumen proveniente de ensayos anteriores (Tabla 4.1).

La bibliografía sugiere que para materiales fibrosos la aplicación de la segunda derivada proporciona los mejores resultados. Por ejemplo, en el trabajo de Park et al. (2016) se obtuvieron  $R^2_{cv}$  de 0,86 y 0,83 para FDN y FDA, respectivamente, con la aplicación del tratamiento 2,16,16,1. Sin embargo, en el presente trabajo el contenido de FDN pudo ser predicho con una alta precisión aplicando SNV+D y primera derivada (1,4,4,1) como tratamiento del espectro (SECV = 1,31;  $R^2_{cv}$  = 0,98; RPD = 6,59), mientras que para FDA la aplicación de SNV+D y 2,4,4,1 (segunda derivada) sí proporcionó el modelo de calibración más satisfactorio (SECV = 1,14;  $R^2_{cv}$  = 0,89; RPD = 2,99).

En general las calibraciones mejoran con la incorporación de un mayor número de muestras al grupo de calibración, pero en el estudio presente la concentración de PB se logró predecir con precisión utilizando un número limitado de muestras ( $n = 68$ ). Esto se debería a que la determinación de PB por el método de referencia está más automatizada, lo cual disminuye el error del operario brindando resultados más precisos. El modelo resultante de la aplicación de las transformaciones espectrales SVN+D y 1,4,4,1 arrojó valores de SECV = 0,19;  $R^2_{cv}$  = 0,96; RPD = 5,14, logrando mejores resultados que los obtenidos por Park et al. (2016) aplicando las mismas transformaciones en un conjunto de calibración de  $n = 402$  de ensilajes de maíz (SECV = 0,51;  $R^2_{cv}$  = 0,77; RPD = 2,70).

#### **4.3.5 Planta de Maíz y Sorgo**

##### **4.3.5.1 Análisis exploratorio de datos**

La Figura 4.16 muestra la distribución de los datos espectrales del conjunto de calibración a través de los componentes principales 3, 4 y 5 (+). Al

incluir la información de muestras a predecir ( $\square$ ) se observa una integración a la distribución descrita por el conjunto de calibración, lo que avala la adecuada selección de muestras realizada para formar el conjunto de calibración.

En el caso del parámetro PB se encontraron los mismos resultados entre conjunto de calibración y las muestras predichas (Figura 4.19), pero con los componentes principales 2, 3 y 4.

#### **4.3.5.2 Calibración**

La Tabla 4.6 presenta los estadísticos de la calibración y validación cruzada de FDN, FDA y PB en residuos de incubados *in situ* de PSYM. En este grupo se agregaron al set de calibración 20 muestras correspondientes a plantas (no residuos de digestión) de sorgo y maíz de baja calidad para aumentar el rango, que simulaban la hora cero de ensayos de degradabilidad *in situ* en el parámetro FDN. Para el resto de los parámetros estudiados esta estrategia no fue necesaria, pudiendo lograr calibraciones satisfactorias con el número de muestras iniciales.

La transformación del espectro que proporcionó el mejor modelo predictivo para FDN en PSYM fue 1,10,10,1 y MSC, a diferencia de las calibraciones de FDN para PLL y SSYM donde la aplicación de SVN+D había proporcionado las calibraciones más satisfactorias. La Figura 4.13 muestra la relación obtenida entre los datos de laboratorio del conjunto de calibración y los predichos por NIRS con la ecuación elegida. Con un RPD de 2,77, un SECV de 1,52 y un  $R^2_{cv}$  de 0,87 este modelo resultó más satisfactorio que el encontrado por Fassio et al. (2014) para FDN en muestras de rastrojo de maíz aplicando 2, 10,10,1, y el desarrollado por Fekadu et al. (2010) en rastrojo de maíz y rastrojo de sorgo utilizando 1,5,5,1 y SVN+DT. Fassio et al. (2014) reportaron para FDN un  $R^2_{cv}$  de 0,92, y valores de RPD y SECV de 2,1 y 5,84, resultando una calibración poco precisa. Los autores atribuyen este hecho a la gran variabilidad en los resultados de referencia, a las características de las muestras, y a un número bajo de muestras (n= 64). A todo esto, se podría adicionar la falta de exploración de diferentes herramientas de pre-procesamiento de señales espectrales. Por otro lado, en el trabajo de Fekadu

et al. (2010) se reportaron valores altos de SECV para FDN (2,53 y 3,25, con  $n= 72$  y  $n= 118$ , para rastrojo de maíz y sorgo, respectivamente) en comparación a los obtenidos en el estudio presente (1,52 y 0,83).

Basado en Williams et al. (2000), quienes proponen un valor mínimo de RPD de 3 para muestras de cereales, Fassio et al. (2014) descartaron la calibración de FDA para análisis de rutina por NIRS aún cuando en su desarrollo mostró valores de RPD = 2,5, un SECV de 1,65 y un  $R^2_{cv}$  de 0,85 en muestras de rastrojo de maíz. En el trabajo presente se demostró y adoptó como aceptable un RPD > 2,5, principalmente en cuantificación de fibras debido a la complejidad del constituyente (Hsu et al., 1998). Igualmente los resultados obtenidos para la calibración de FDA en PMYS resultaron mejores que los descartados por Fassio et al. (2014) y Fekadu et al. (2010) ( $R^2_{cv}$  de 0,43 y 0,44; SECV de 2,38 y 2,68, para rastrojo de maíz y sorgo, respectivamente). En este estudio, las calibraciones elegidas resultaron de la aplicación de 1,4,4,1 y SVN+D, proporcionando un RPD = 4,13, un SECV= 0.83, y un  $R^2_{cv} = 0,94$  para FDN y FDA, respectivamente (Tabla 4.6 y Figuras 4.17 y 4.18).

En el caso de PB la aplicación de 1,4,4,1 y MSC proporcionó el modelo predictivo que mejores estadísticos reportó (RPD= 7,20, y RER = 30.49), lo cual se visualiza en la Figura 4.20.

Si bien en el trabajo de Fekadu et al. (2010) el análisis de PB se realizó por el mismo método de referencia (Kjeldahl) que en el estudio presente, los SECV oscilaron entre 0,46 y 0,96 para rastrojos de maíz y sorgo, respectivamente, valores mucho más elevados que el encontrado para residuos de planta de maíz y sorgo en el trabajo presente (SECV= 0,14). A su vez, los valores reportados por dichos autores de  $R^2_{cv}$  de 0,41 y 0,49 para los rastrojos, también fueron bajos en comparación los obtenidos en el estudio presente ( $R^2_{cv} = 0,98$ ).

#### **4.4 CONCLUSIONES**

Los estadísticos (RPD, SEC, SECV,  $R^2$ ,  $R^2_{cv}$  y RER) obtenidos para las ecuaciones de calibración desarrolladas en el presente estudio mostraron el potencial de la tecnología NIRS para la predicción de la composición química de residuos de PLL, SSYM y PSYM degradados a nivel ruminal, puntualmente para los parámetros FDN, FDA y PB.

Las calibraciones desarrolladas para PB fueron suficientemente robustas y podrían ser empleadas en análisis rutinario. Por otro lado, para FDN y FDA la inclusión de un mayor número de muestras con variabilidad espectral en los conjuntos de calibración, con posterior validación, podría mejorar los modelos y proporcionar un método de rutina de laboratorio.

Tabla 4.1. Conformación de los distintos conjuntos de calibración de los grupos de estudio.

	PLL	SSYM	PSYM
FDN y FDA	44 muestras de residuos in situ de panicum (2016) mas 44 muestras de residuos de PLL (2017 y 2018)	44 muestras se residuos de ensilajes de sorgo (2016) mas 58 muestras de residuos de ensilajes de sorgo y maíz sin grano(2018)	20 muestras de planta de sorgo y maíz de baja calidad más 90 muestras de residuos de planta de sorgo y maíz sin grano (2017)
PB	71 muestras de residuo de PLL	71 muestras de residuos de ensilajes de maíz y sorgo sin grano	72 muestras de residuos de planta de maíz y sorgo sin grano

FDN: fibra detergente neutro (%); FDA: fibra detergente ácido (%) y PB: proteína bruta (%).

PLL: forraje de pasto llorón; SSYM: ensilaje de sorgo y maíz (sin grano); PSYM: planta de sorgo y maíz (sin grano).

Tabla 4.2. Asignación de bandas en la región NIR para productos agrarios (Williams, 2001)

	Proteína	Celulosa (desecada)	Almidón	Almidón (desecado)	Grasa	Agua		
Longitud de onda (nm)	1692	1364	1432	1432	1724	1410		
	1734	1428 mf	1928c	2282	1762	1460		
	1930	2054 h	2094	2322	2306	1906		
	1978	2076	2282	2446	2346			
	2054	2104	2318					
	2172	2270						
	2274	2332 mf						
	2466	2480 mf						
M	908b	758b	914b	610b	1360	758b	1896	718b
	1018b	982b	986	754b	1700	928	1932	758
	1186	1216	1200	914b	2044	1042b	2008	964b
	1428	1488	1584	980b	2094	1162	2120	
	1498	1588	1700	1204	2478	1390	2270	
	2202 h	1702	1780			1410	2384	
	2308	1828	2370					
	2346	1918c	2474					

F: fuerte; M: mediano; h: hombro; mf: muy fuerte; b: Estas bandas son tercetos y cuartos sobretonos y son absorbente relativamente fuertes; c: probablemente agua.

Tabla 4.3. Descripción estadística de los conjuntos de calibración finales.

	Calibraciones	N	Parámetro	Mín	Máx	Media	SD
PLL	panpll1.eqa	83	FDN	75,6	91,63	86	3,81
	panpll1.eqa	86	FDA	47,9	64,59	54,1	2,98
	pllball.eqa	67	PB	2,8	4,87	3,4	0,42
SSYM	ssym4.eqa	97	FDN	53	90,46	80,8	8,82
	ssym4a.eqa	98	FDA	40,7	62,50	53,0	3,57
	ssym8a.eqa	68	PB	2,2	6,89	3,6	1,00
PSYM	pmys1h.eqa	101	FDN	74,4	90,15	83,9	4,20
	pmys1.eqa	86	FDA	50,2	62,62	56,1	3,43
	pmyspbe.eqa	68	PB	1,8	6,05	3,6	1,01

PLL: forraje de pasto llorón; SSYM: ensilaje de maíz y sorgo (sin grano); PSYM: planta de sorgo y maíz (sin grano).

FDN: fibra detergente neutro (%); FDA: fibra detergente Acido (%) y PB: proteína bruta (%).

N: número de muestras que integran el conjunto de calibración; SD: desvío estándar.

Tabla 4.4. Estadísticas de predicción y tratamientos matemáticos utilizados en las ecuaciones desarrolladas para forraje de pasto llorón (PLL).

ID	Pre tratamiento espectral		N° térn	Parámetro	SEC	R <sup>2</sup>	SECV	R <sup>2</sup> <sub>cv</sub>	RPD	Rango	RER
<b>1</b>	<b>1.4.4.1</b>	<b>SVN + D</b>	<b>5</b>	<b>FDN</b>	<b>1,04</b>	<b>0,93</b>	<b>1,16</b>	<b>0,91</b>	<b>3,27</b>	<b>16,00</b>	<b>13,76</b>
2	2.4.4.1	SVN + D	5	FDN	0,99	0,93	1,28	0,88	2,94	16,00	12,46
3	3.4.4.1	SVN + D	5	FDN	0,87	0,95	1,34	0,87	2,83	16,00	11,98
4	1.10.10.1	SVN + D	5	FDN	1,08	0,92	1,29	0,88	2,96	16,00	12,42
5	3.10.10.1	SVN + D	6	FDN	1,01	0,93	1,30	0,88	2,90	18,74	14,37
6	1.4.4.1	MSC	5	FDN	1,02	0,93	1,24	0,90	3,05	16,00	12,87
7	2.4.4.1	MSC	5	FDN	0,97	0,93	1,29	0,88	2,94	16,00	12,40
8	3.4.4.1	MSC	5	FDN	0,85	0,95	1,27	0,89	2,93	16,00	12,58
9	1.10.10.1	MSC	6	FDN	1,01	0,93	1,28	0,90	2,97	16,00	12,48
10	3.10.10.1	MSC		FDN	1,11	0,91	1,34	0,87	2,82	16,00	11,98
<b>11</b>	<b>1.4.4.1</b>	<b>SVN + D</b>	<b>8</b>	<b>FDA</b>	<b>1,14</b>	<b>0,85</b>	<b>1,48</b>	<b>0,76</b>	<b>2,61</b>	<b>16,72</b>	<b>11,30</b>
12	2.4.4.1	SVN + D	6	FDA	1,11	0,86	1,49	0,75	2,68	16,72	11,25
13	3.4.4.1	SVN + D	4	FDA	1,09	0,82	1,44	0,73	2,33	12,42	8,65
14	1.10.10.1	SVN + D	7	FDA	1,24	0,80	1,54	0,69	2,24	13,55	8,78
15	3.10.10.1	SVN + D	8	FDA	1,00	0,88	1,42	0,78	2,94	16,72	11,78
16	1.4.4.1	MSC		FDA	1,09	0,86	1,43	0,76	2,63	16,40	11,49
17	2.4.4.1	MSC	6	FDA	1,03	0,86	1,45	0,73	2,70	13,55	9,37
18	3.4.4.1	MSC	6	FDA	0,87	0,90	1,38	0,75	3,18	16,40	11,87
19	1.10.10.1	MSC	8	FDA	1,21	0,84	1,57	0,73	2,49	16,72	10,68
20	3.10.10.1	MSC	8	FDA	1,00	0,88	1,41	0,78	2,94	16,72	11,87
<b>21</b>	<b>1.4.4.1</b>	<b>SVN + D</b>	<b>7</b>	<b>PB</b>	<b>0,09</b>	<b>0,96</b>	<b>0,11</b>	<b>0,93</b>	<b>3,71</b>	<b>2,11</b>	<b>18,81</b>
22	2.4.4.1	SVN + D	6	PB	0,07	0,97	0,12	0,91	3,42	2,11	17,14
23	3.4.4.1	SVN + D	5	PB	0,08	0,96	0,16	0,86	2,68	2,11	13,47
24	1.10.10.1	SVN + D	8	PB	0,10	0,95	0,12	0,92	3,63	2,11	18,33
25	3.10.10.1	SVN + D	6	PB	0,09	0,96	0,12	0,92	3,51	2,11	17,63
26	1.4.4.1	MSC	7	PB	0,10	0,95	0,13	0,91	3,36	2,11	16,79
27	2.4.4.1	MSC	6	PB	0,07	0,97	0,12	0,91	3,42	2,11	17,18
28	3.4.4.1	MSC	5	PB	0,08	0,96	0,16	0,86	2,68	2,11	13,48
29	1.10.10.1	MSC	7	PB	0,11	0,94	0,13	0,91	3,28	2,11	16,41
30	3.10.10.1	MSC	6	PB	0,09	0,96	0,12	0,92	3,52	2,11	17,67

SVN+D: variable normal estándar más ajuste de línea base (standard normal variate + detrending); MSC: corrección del efecto multiplicativo de dispersión (multiplicative scatter correction); ID: identificación de la ecuación de calibración; FDN: fibra detergente neutro (%); FDA: fibra detergente ácido (%) y PB: proteína bruta (%); SEC: error estándar de calibración ; R<sup>2</sup>: coeficiente de determinación de la calibración; SECV: error estándar de validación cruzada; R<sup>2</sup><sub>cv</sub>: coeficiente de determinación de la validación cruzada; RPD: desviación de predicción relativa (relative prediction deviation) (SD/SECV); RER ó FM: relación del error de predicción con el rango (range to error ratio).

Tabla 4.5. Estadísticas de predicción y tratamientos matemáticos las ecuaciones desarrolladas para ensilaje de sorgo y maíz (sin grano) (SSYM).

ID	Pre tratamiento espectral		N° térn	Parámetro	SEC	R <sup>2</sup>	SECV	R <sup>2</sup> <sub>cv</sub>	RPD	Rango	RER
<b>1</b>	<b>1.4.4.1</b>	<b>SVN + D</b>	<b>8</b>	<b>FDN</b>	<b>1,10</b>	<b>0,98</b>	<b>1,31</b>	<b>0,98</b>	<b>6,59</b>	<b>37,56</b>	<b>28,58</b>
2	2.4.4.1	SVN + D	8	FDN	0,89	0,99	1,31	0,98	6,56	37,56	28,74
3	3.4.4.1	SVN + D	6	FDN	1,15	0,98	1,75	0,95	4,70	37,56	21,42
4	1.10.10.1	SVN + D	8	FDN	1,14	0,98	1,36	0,98	6,37	37,56	27,63
5	3.10.10.1	SVN + D	7	FDN	1,16	0,98	1,53	0,97	5,75	37,56	24,51
6	1.4.4.1	MSC	9	FDN	1,04	0,99	1,30	0,98	6,64	37,56	28,81
7	2.4.4.1	MSC	9	FDN	0,76	0,99	1,41	0,97	6,20	37,56	26,62
8	3.4.4.1	MSC	6	FDN	1,08	0,98	1,66	0,96	4,99	37,56	22,57
9	1.10.10.1	MSC	9	FDN	1,07	0,98	1,28	0,98	6,77	37,56	29,42
10	3.10.10.1	MSC	7	FDN	1,16	0,98	1,53	0,97	5,75	37,56	24,48
<b>11</b>	<b>1.4.4.1</b>	<b>SVN + D</b>	<b>8</b>	<b>FDA</b>	<b>1,00</b>	<b>0,92</b>	<b>1,22</b>	<b>0,88</b>	<b>2,84</b>	<b>21,80</b>	<b>17,93</b>
12	2.4.4.1	SVN + D	5	FDA	0,93	0,93	1,14	0,89	2,99	18,72	16,42
13	3.4.4.1	SVN + D	5	FDA	0,89	0,92	1,19	0,85	2,58	15,32	12,86
14	1.10.10.1	SVN + D	9	FDA	0,90	0,94	1,19	0,89	2,98	21,80	18,30
15	3.10.10.1	SVN + D	5	FDA	0,98	0,91	1,25	0,87	2,65	18,72	14,95
16	1.4.4.1	MSC	8	FDA	0,94	0,93	1,17	0,89	3,03	21,80	18,70
17	2.4.4.1	MSC	9	FDA	0,52	0,97	0,97	0,91	3,19	18,72	19,39
18	3.4.4.1	MSC	5	FDA	0,87	0,92	1,30	0,85	2,33	18,72	14,38
19	1.10.10.1	MSC	9	FDA	0,95	0,93	1,14	0,90	3,14	21,80	19,18
20	3.10.10.1	MSC	5	FDA	0,98	0,91	1,25	0,87	2,65	18,72	14,95
<b>21</b>	<b>1.4.4.1</b>	<b>SVN + D</b>	<b>6</b>	<b>PB</b>	<b>0,16</b>	<b>0,98</b>	<b>0,20</b>	<b>0,96</b>	<b>4,89</b>	<b>4,70</b>	<b>23,02</b>
22	2.4.4.1	SVN + D	6	PB	0,14	0,98	0,21	0,96	4,80	4,70	22,55
23	3.4.4.1	SVN + D	5	PB	0,15	0,98	0,27	0,93	3,74	4,70	17,56
24	1.10.10.1	SVN + D	7	PB	0,15	0,98	0,19	0,96	5,14	4,70	24,20
25	3.10.10.1	SVN + D	5	PB	0,15	0,98	0,21	0,96	4,86	4,70	22,87
26	1.4.4.1	MSC	7	PB	0,14	0,98	0,20	0,95	4,57	4,70	23,28
27	2.4.4.1	MSC	4	PB	0,18	0,97	0,22	0,95	4,58	4,70	21,49
28	3.4.4.1	MSC	4	PB	0,16	0,97	0,26	0,93	3,86	4,70	18,30
29	1.10.10.1	MSC	6	PB	0,16	0,97	0,20	0,95	4,27	4,41	22,18
30	3.10.10.1	MSC	5	PB	0,15	0,98	0,21	0,96	4,87	4,70	22,80

SVN+D: variable normal estándar más ajuste de línea base (standard normal variate + detrending); MSC: corrección del efecto multiplicativo de dispersión (multiplicative scatter correction); ID: identificación de la ecuación de calibración; FDN: fibra detergente neutro (%); FDA: fibra detergente ácido (%) y PB: proteína bruta (%); SEC: error estándar de calibración ; R<sup>2</sup>: coeficiente de determinación de la calibración; SECV: error estándar de validación cruzada; R<sup>2</sup><sub>cv</sub>: coeficiente de determinación de la validación cruzada; RPD: desviación de predicción relativa (relative prediction deviation) (SD/SECV); RER ó FM: relación del error de predicción con el rango (range to error ratio).

Tabla 4.6. Estadísticas de predicción y tratamientos matemáticos las ecuaciones desarrolladas para planta de sorgo y maíz (sin grano) (PMYS).

ID	Pre tratamiento espectral		N° término	Parámetro	SEC	R <sup>2</sup>	SECV	R <sup>2</sup> <sub>cv</sub>	RPD	Rango	RER
1	1.4.4.1	SVN + D	6	FDN	1,65	0,85	1,69	0,84	2,48	15,77	9,36
2	2.4.4.1	SVN + D	2	FDN	1,60	0,85	1,70	0,83	2,46	15,77	9,26
3	3.4.4.1	SVN + D	2	FDN	1,69	0,84	1,75	0,82	2,40	15,77	9,01
4	1.10.10.1	SVN + D	2	FDN	1,59	0,86	1,70	0,83	2,47	15,77	9,30
5	3.10.10.1	SVN + D	2	FDN	1,47	0,87	1,60	0,85	2,59	15,77	9,85
6	1.4.4.1	MSC	6	FDN	1,27	0,91	1,53	0,87	2,71	15,77	10,32
7	2.4.4.1	MSC	2	FDN	1,50	0,87	1,65	0,84	2,54	15,77	9,53
8	3.4.4.1	MSC	2	FDN	1,65	0,85	1,71	0,83	2,45	15,77	9,21
9	<b>1.10.10.1</b>	<b>MSC</b>	<b>6</b>	<b>FDN</b>	<b>1,29</b>	<b>0,91</b>	<b>1,52</b>	<b>0,87</b>	<b>2,77</b>	<b>15,77</b>	<b>10,39</b>
10	3.10.10.1	MSC	2	FDN	1,52	0,87	1,60	0,85	2,59	15,77	9,85
11	<b>1.4.4.1</b>	<b>SVN + D</b>	<b>8</b>	<b>FDA</b>	<b>0,67</b>	<b>0,96</b>	<b>0,83</b>	<b>0,94</b>	<b>4,13</b>	<b>12,46</b>	<b>15,02</b>
12	2.4.4.1	SVN + D	6	FDA	0,68	0,96	0,97	0,92	3,49	12,46	12,90
13	3.4.4.1	SVN + D	6	FDA	0,46	0,98	0,90	0,93	3,68	12,46	13,83
14	1.10.10.1	SVN + D	8	FDA	0,69	0,96	0,92	0,93	3,72	12,46	13,51
15	3.10.10.1	SVN + D	5	FDA	0,80	0,94	0,94	0,92	3,59	12,46	13,24
16	1.4.4.1	MSC	8	FDA	0,72	0,96	0,92	0,93	3,70	12,46	13,50
17	2.4.4.1	MSC	5	FDA	0,83	0,94	1,04	0,91	3,30	12,46	11,99
18	3.4.4.1	MSC	6	FDA	0,47	0,98	0,90	0,93	3,67	12,46	13,79
19	1.10.10.1	MSC	9	FDA	0,68	0,96	0,86	0,94	3,98	12,46	14,45
20	3.10.10.1	MSC	5	FDA	0,80	0,94	0,95	0,92	3,57	12,46	13,18
21	1.4.4.1	SVN + D	6	PB	0,13	0,98	0,16	0,98	6,38	4,26	27,19
22	2.4.4.1	SVN + D	4	PB	0,14	0,98	0,17	0,97	5,99	4,26	25,33
23	3.4.4.1	SVN + D	3	PB	0,17	0,97	0,22	0,95	4,36	4,26	19,20
24	1.10.10.1	SVN + D	6	PB	0,13	0,98	0,16	0,97	6,24	4,26	26,59
25	3.10.10.1	SVN + D	4	PB	0,14	0,98	0,17	0,97	5,90	4,26	24,99
26	<b>1.4.4.1</b>	<b>MSC</b>	<b>6</b>	<b>PB</b>	<b>0,12</b>	<b>0,99</b>	<b>0,14</b>	<b>0,98</b>	<b>7,20</b>	<b>4,26</b>	<b>30,49</b>
27	2.4.4.1	MSC	4	PB	0,13	0,98	0,17	0,97	5,82	4,26	25,09
28	3.4.4.1	MSC	3	PB	0,17	0,97	0,22	0,95	4,36	4,26	19,18
29	1.10.10.1	MSC	6	PB	0,12	0,99	0,15	0,98	6,60	4,26	27,95
30	3.10.10.1	MSC	4	PB	0,14	0,98	0,17	0,97	5,90	4,26	24,96

SVN+D: variable normal estándar más ajuste de línea base (standard normal variate + detrending); MSC: corrección del efecto multiplicativo de dispersión (multiplicative scatter correction); ID: identificación de la ecuación de calibración; FDN: fibra detergente neutro (%); FDA: fibra detergente ácido (%) y PB: proteína bruta (%); SEC: error estándar de calibración ; R2: coeficiente de determinación de la calibración; SECV: error estándar de validación cruzada; R<sup>2</sup><sub>cv</sub>: coeficiente de determinación de la validación cruzada; RPD: desviación de predicción relativa (relative prediction deviation) (SD/SECV); RER ó FM: relación del error de predicción con el rango (range to error ratio).

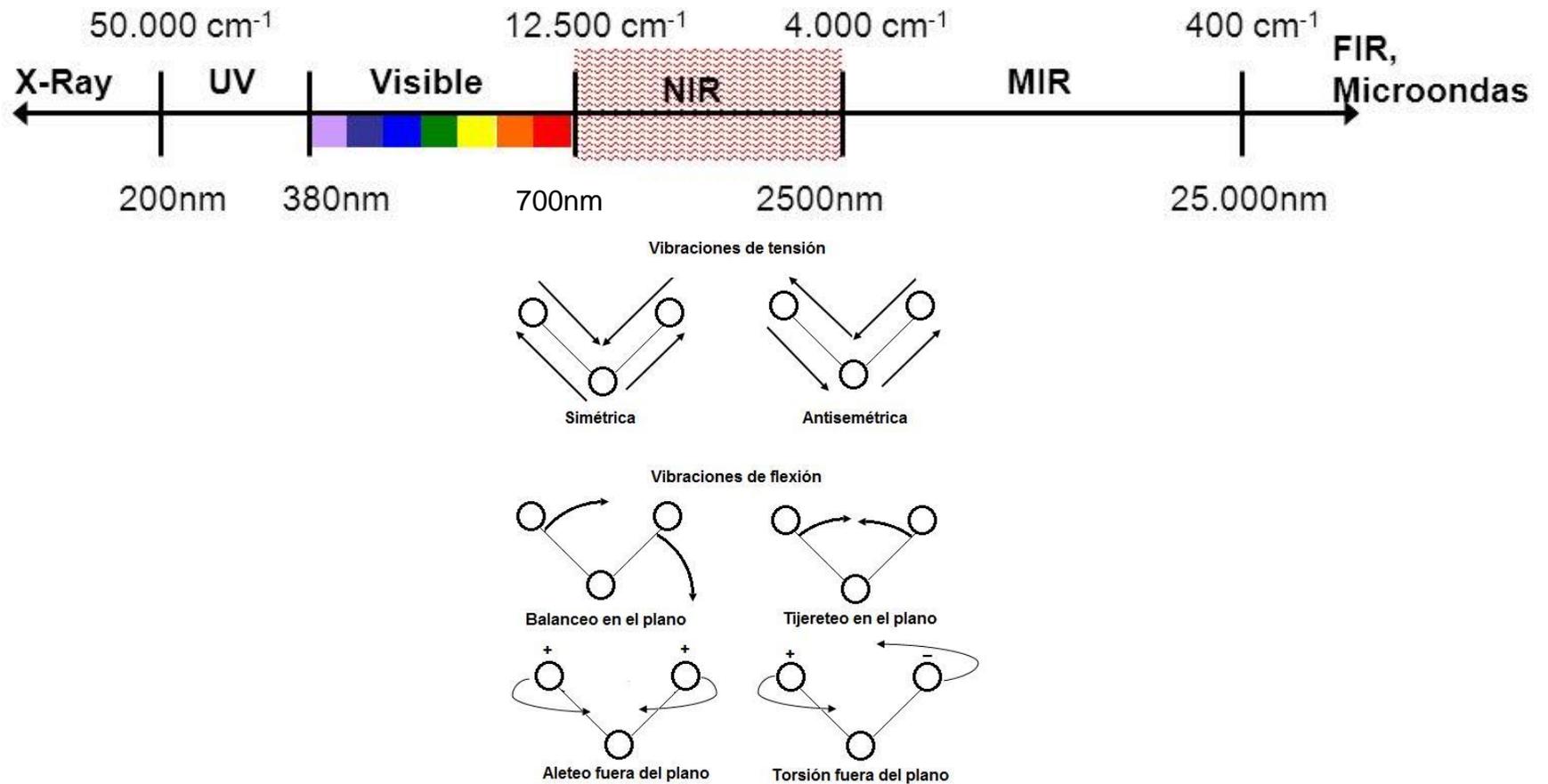


Figura 4.1. Espectro electromagnético y movimientos vibracionales posibles en el la region NIR.

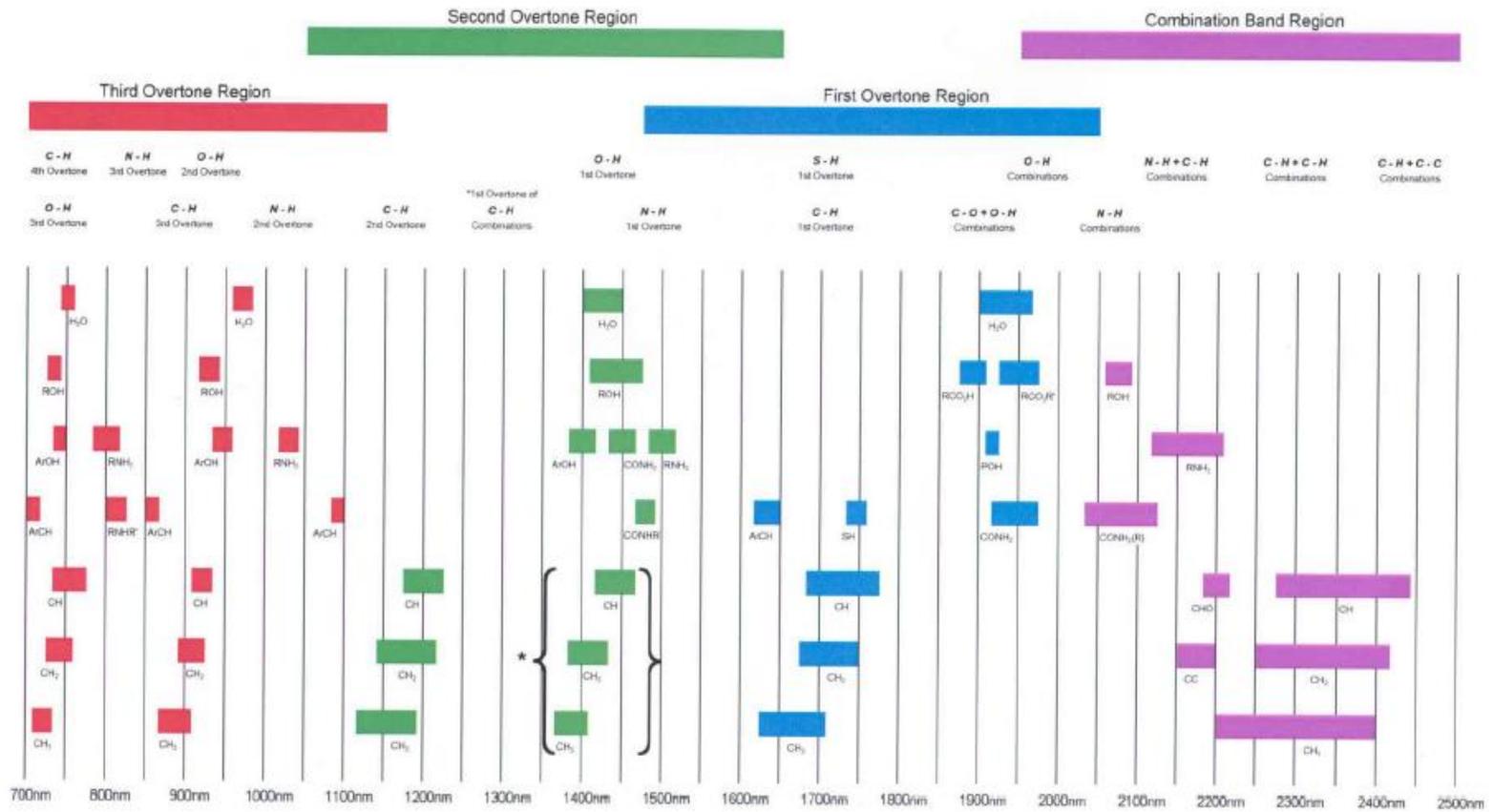


Figura 4.2. Asignación de la absorción de la radiación en el rango espectral del NIR. Principales sobretonos y bandas de combinación generadas por los distintos tipos de vibración de moléculas.

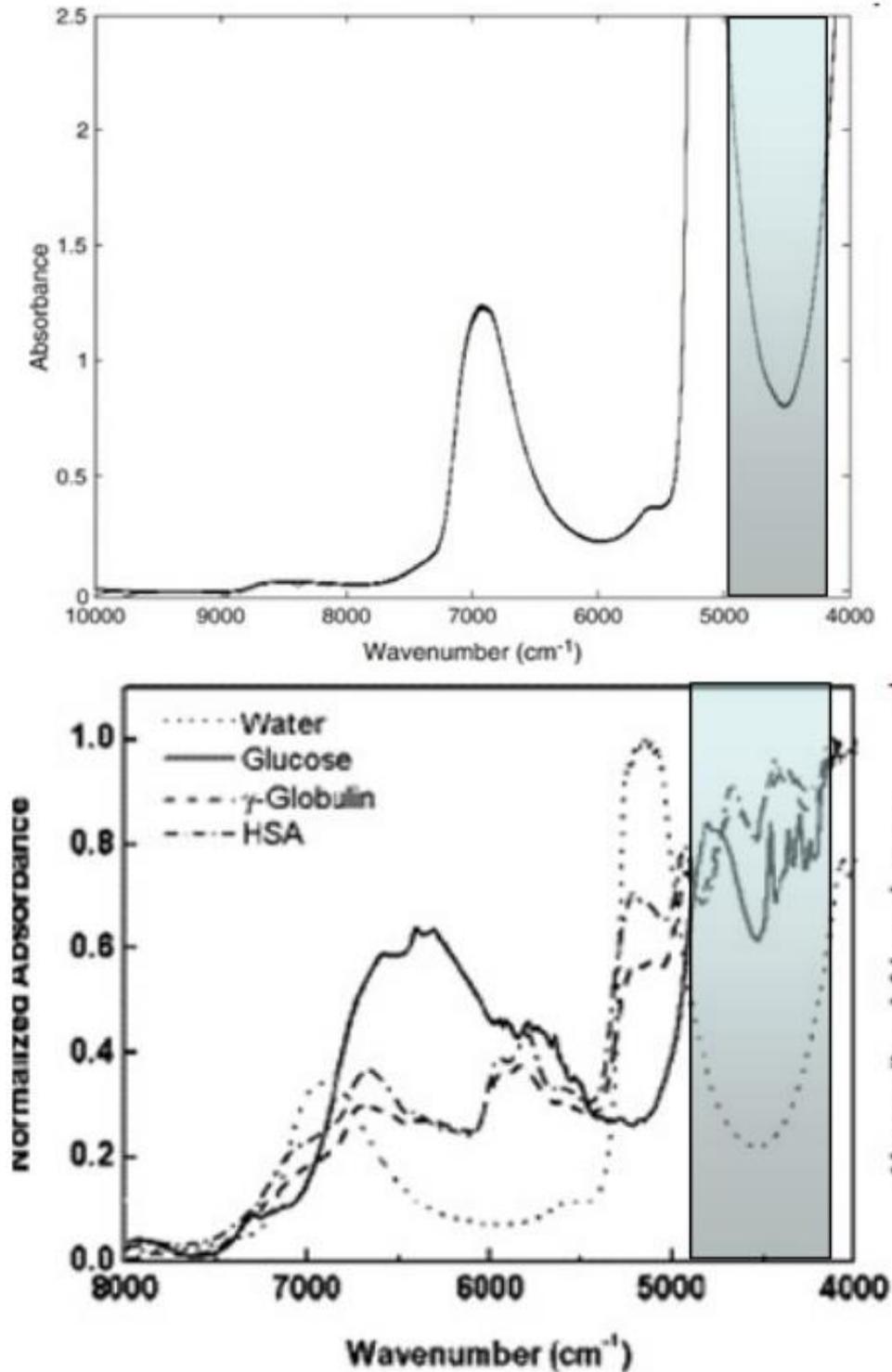


Figura 4.3 Espectros NIR de a) una muestra de suero y b) espectro puros solapados de glucosa y principales componentes del suero que influyen en la determinación de glucosa.

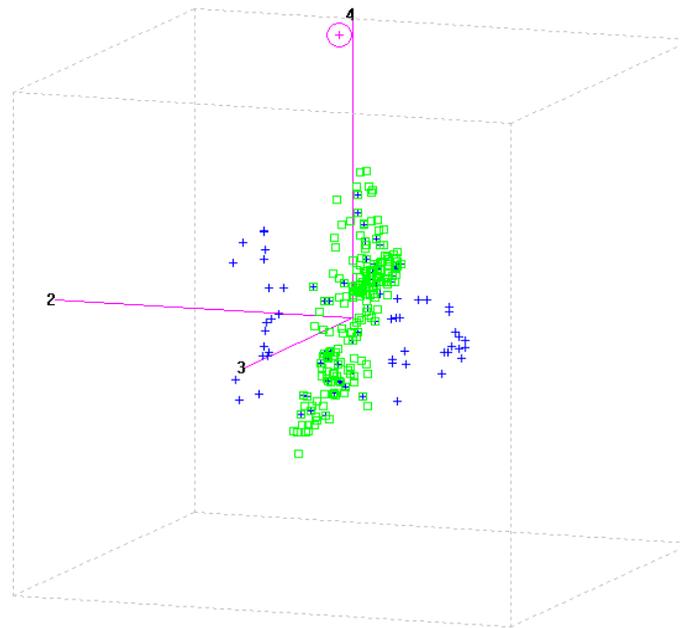


Figura 4.4. Grafico 3-D para un conjunto de muestras A (+) y B (■) distribuidas en los ejes de componentes principales 2,3 y 4 donde se puede observar un outlier espectral (+) fuera del cubo sobre la componente principal 4.

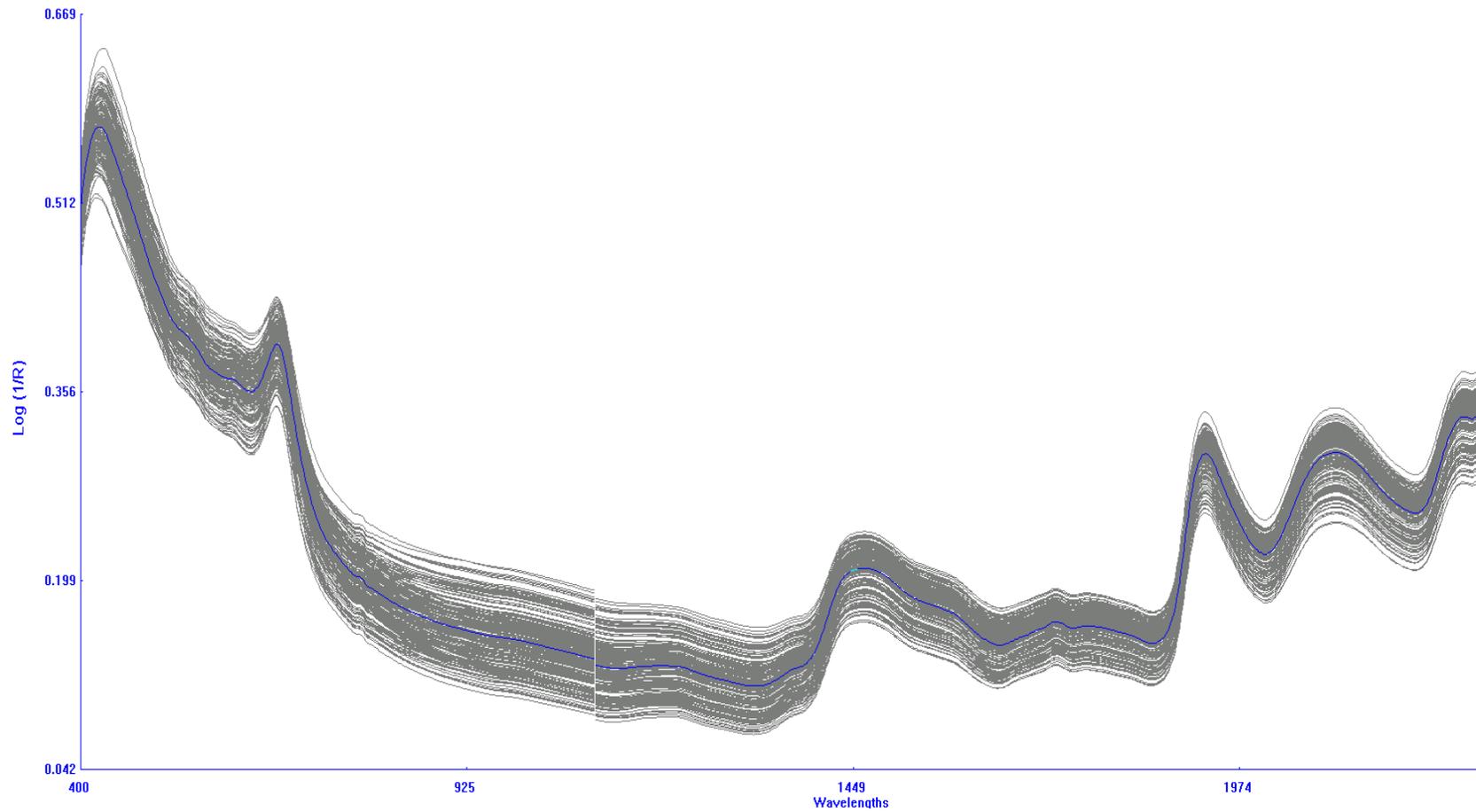


Figura 4.5. Espectros de residuos de degradación *in situ* de forraje de pasto llorón (PLL). En color azul se encuentra el promedio espectral del grupo.

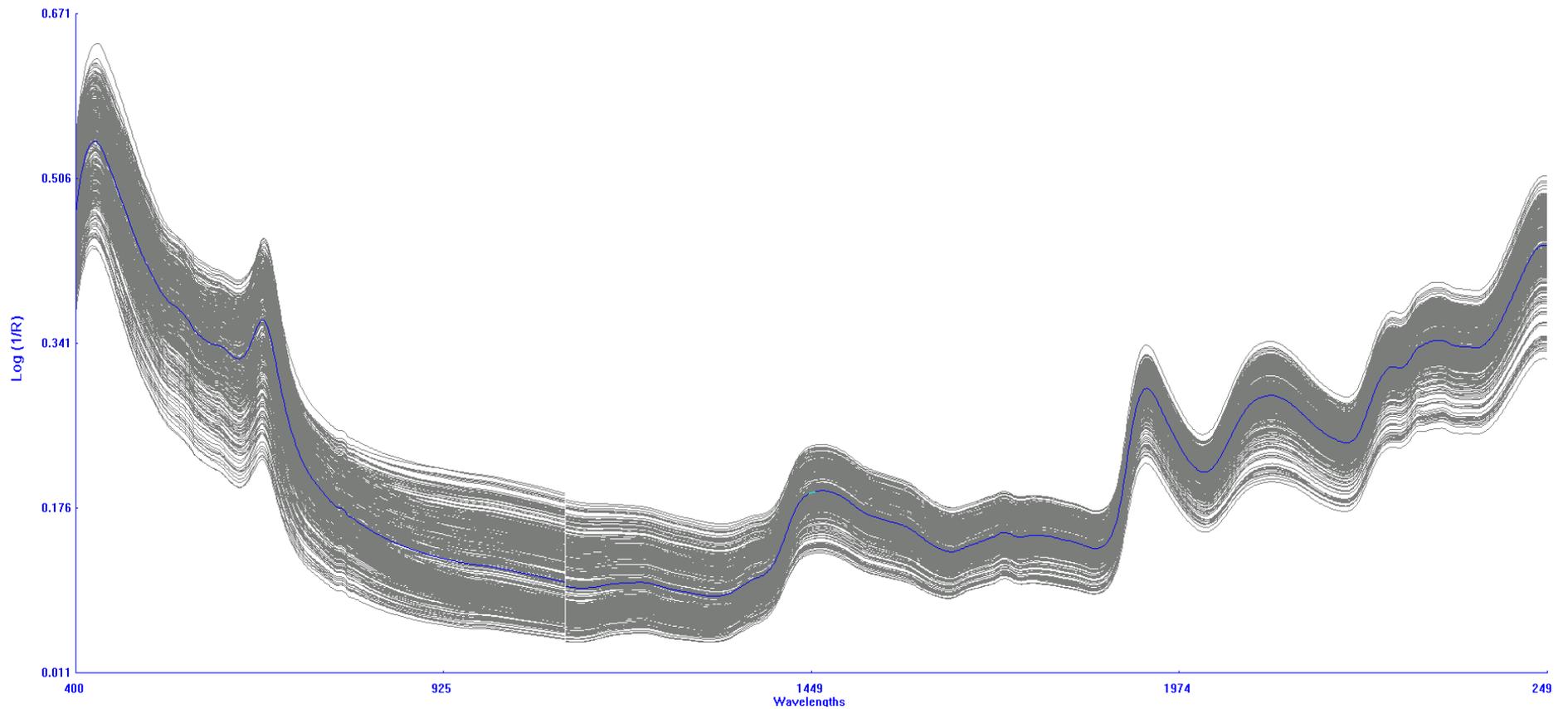


Figura 4.6. Espectros de residuos de degradación in situ de residuos de ensilaje de sorgo y maíz (sin grano) (SSYM). En color azul se encuentra el promedio espectral del grupo.

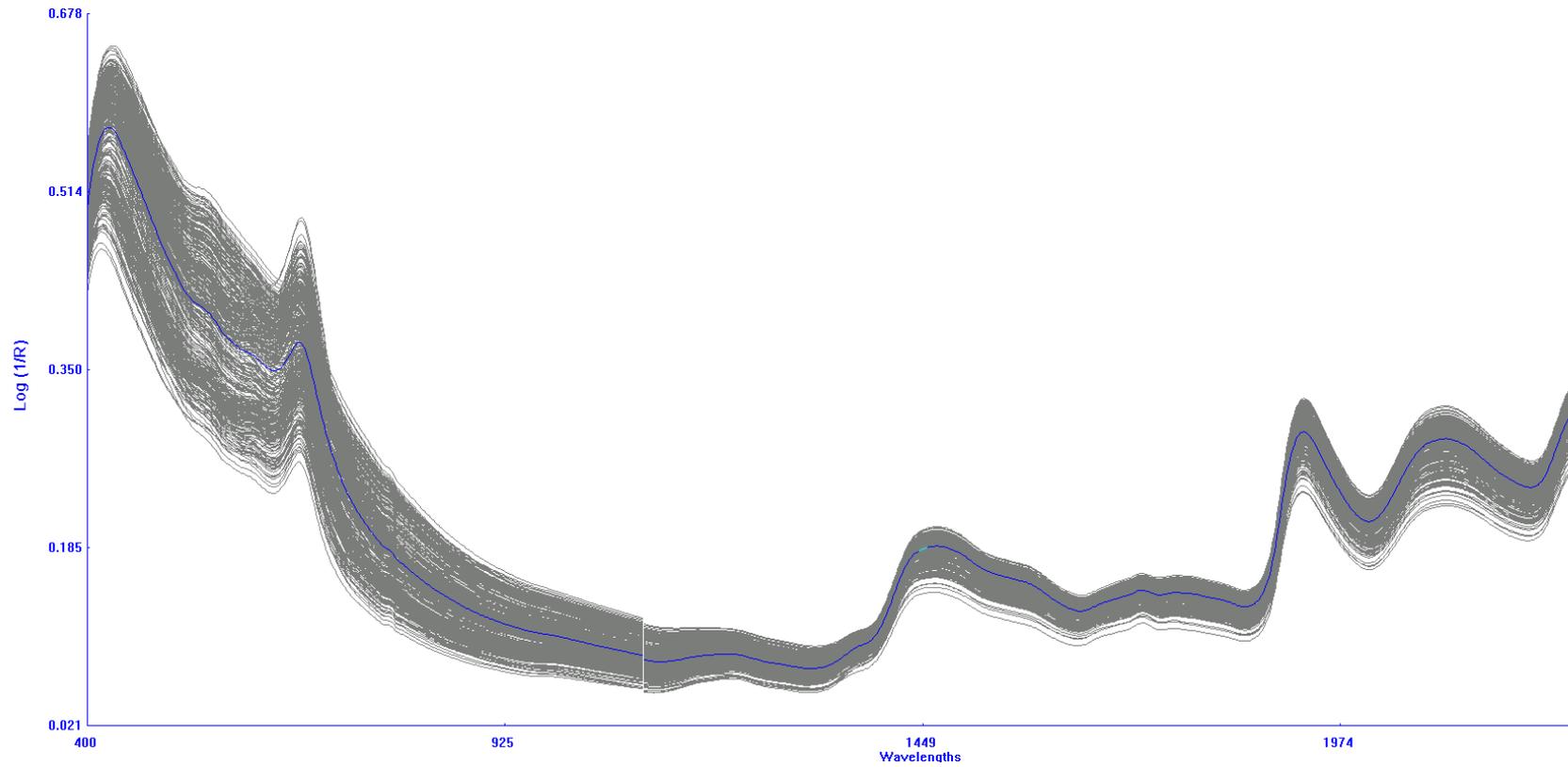


Figura 4.7. Espectros de residuos de degradación in situ de residuos de residuos de planta de sorgo y maíz (sin grano) (PSYM). En color azul se encuentra el promedio espectral del grupo.

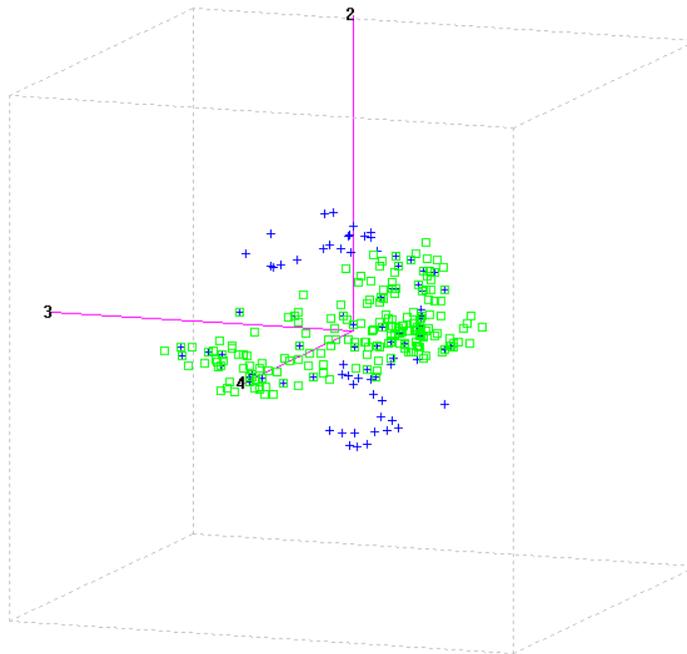


Figura 4.8. Gráfico 3-D de residuos de forraje de pasto llorón (PLL) degradados *in situ*. Los ejes corresponden a las componentes principales 2, 3 y 4, las muestras que integran el conjunto de calibración están indicadas con: + y las muestras de la población con: □, para los parámetros FDN (Fibra Detergente Neutro) y FDA (Fibra Detergente Acido).

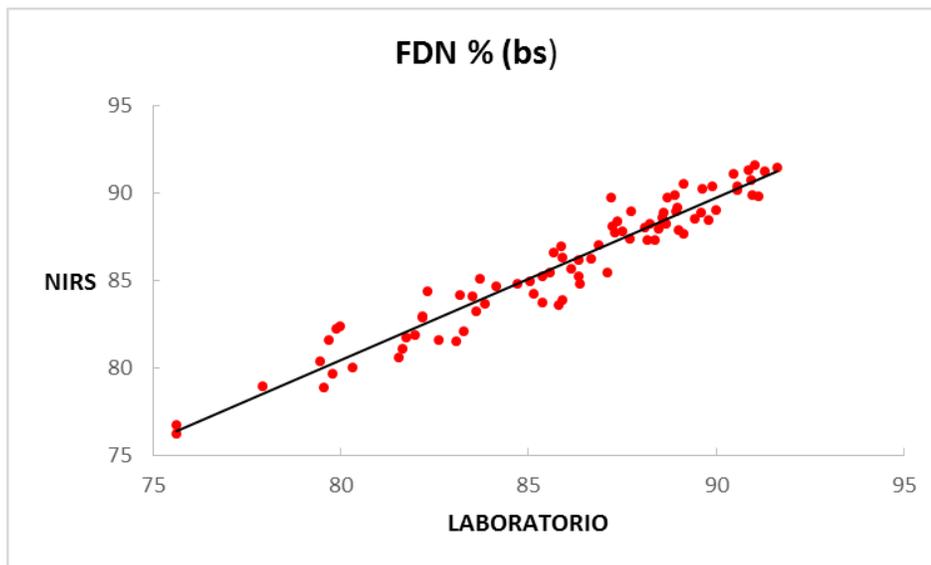


Figura 4.9. Curva de calibración entre valores de referencia (LABORATORIO) y valores predichos por NIRS para FDN (Fibra Detergente Neutro) en residuos de digestión in situ de forraje de pasto llorón (PLL). SECV: error estándar de validación cruzada; R2cv: coeficiente de determinación de la validación cruzada.

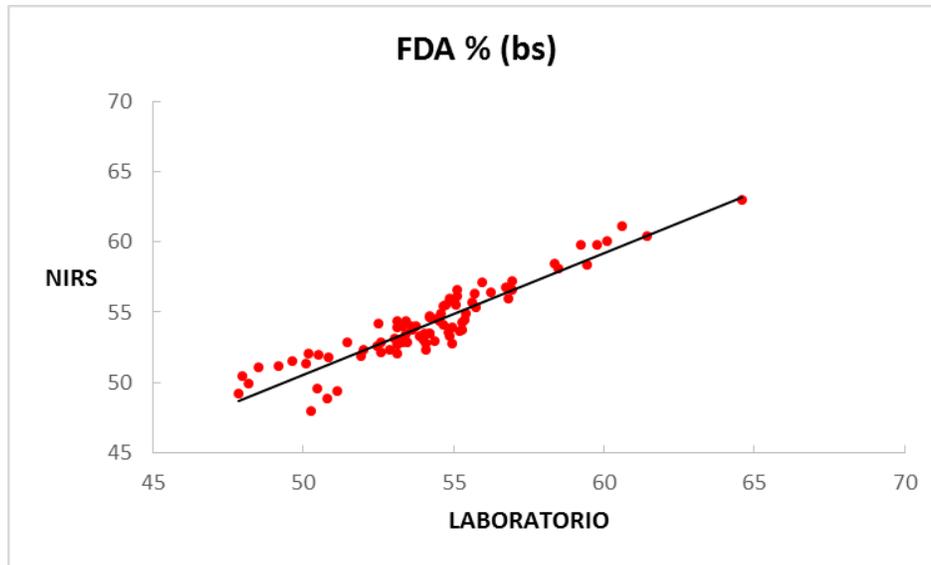


Figura 4.10. Curva de calibración entre valores de referencia (LABORATORIO) y valores predichos por NIRS para FDA (Fibra Detergente Acido) en residuos de digestión in situ de forraje de pasto llorón (PLL). SECV: error estándar de validación cruzada; R2cv: coeficiente de determinación de la validación cruzada.

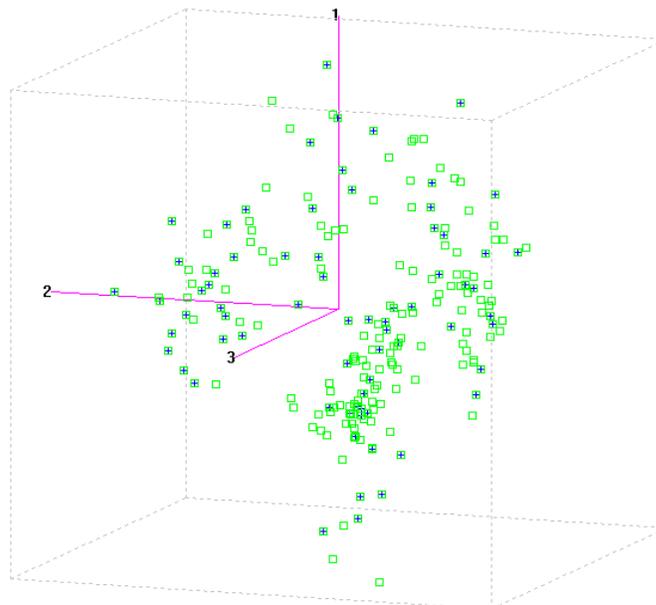


Figura 4.11. Grafico 3-D de residuos de forraje de pasto llorón (PLL) degradados in situ. Los ejes corresponden a las componentes principales 1, 2 y 3, las muestras que integran el conjunto de calibración están indicadas con: + y las muestras de la población con: □, para PB (Proteína Bruta).

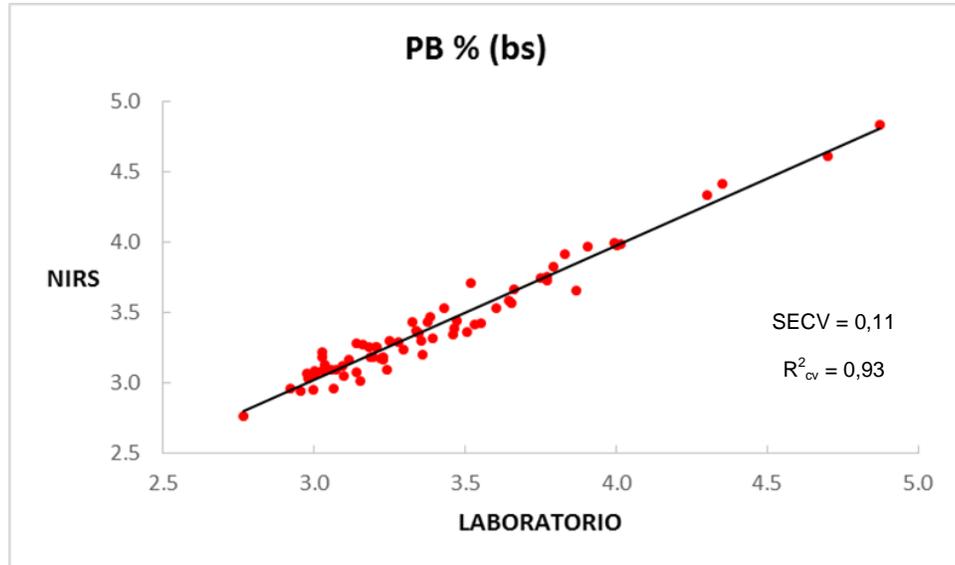


Figura 4.12. Curva de calibración entre valores de referencia (LABORATORIO) y valores predichos por NIRS para PB (Proteína Bruta) en residuos de digestión in situ de forraje de pasto llorón (PLL). SECV: error estándar de validación cruzada;  $R^2_{cv}$ : coeficiente de determinación de la validación cruzada.

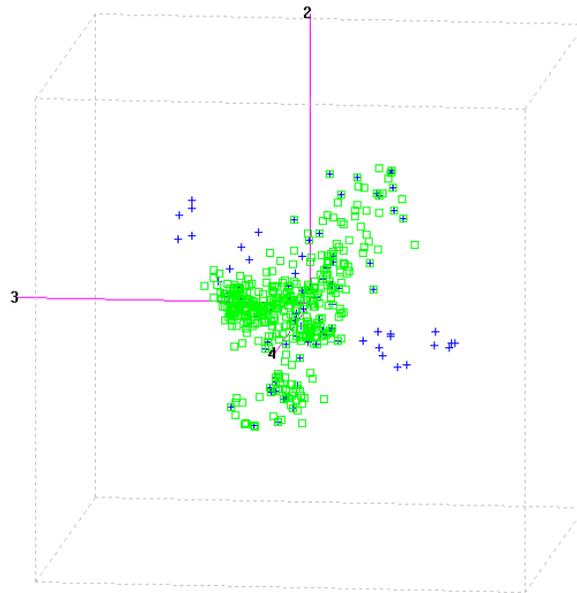


Figura 4.13. Gráfico 3-D de residuos de ensilajes de sorgo y maíz (sin grano) (SSYM) degradados in situ. Los ejes corresponden a las componentes principales 2, 3 y 4, las muestras que integran el conjunto de calibración están indicadas con: + y las muestras de la población con: □, para los parámetros FDN (Fibra Detergente Neutro) y FDA (Fibra Detergente Acido).

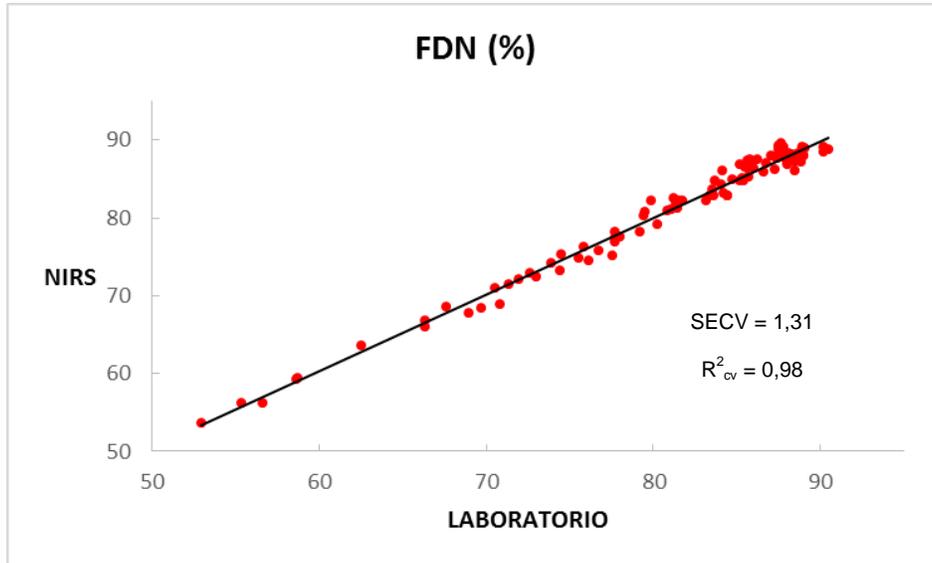


Figura 4.14. Curva de calibración entre valores de referencia (LABORATORIO) y valores predichos por NIRS para FDN (Fibra Detergente Neutro) en residuos de digestión *in situ* de ensilajes de maíz y sorgo (sin grano) (SSYM). SECv: error estándar de validación cruzada; R<sup>2</sup><sub>cv</sub>: coeficiente de determinación de la validación cruzada.

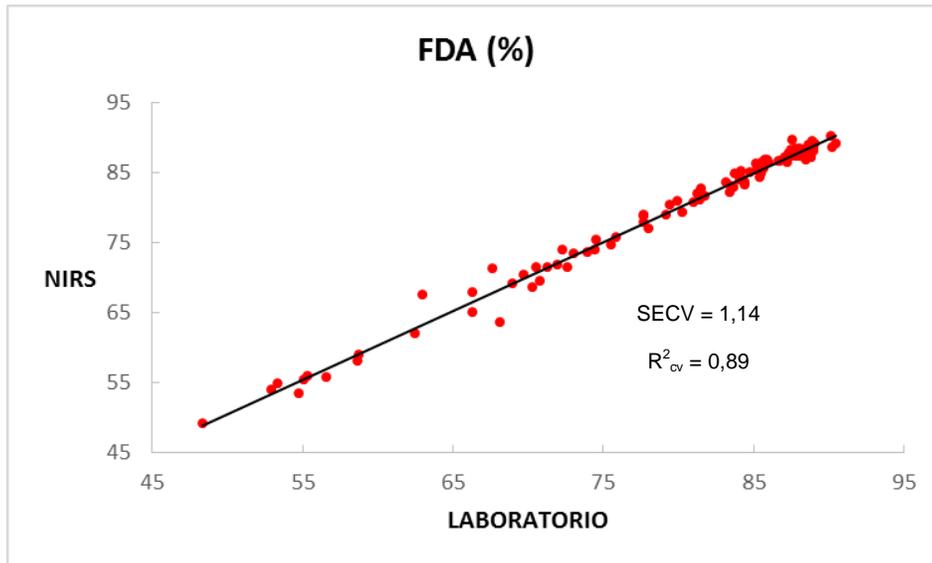


Figura 4.15. Curva de calibración entre valores de referencia (LABORATORIO) y valores predichos por NIRS para FDA (Fibra Detergente Acido) en residuos de digestión *in situ* de ensilajes de maíz y sorgo (sin grano) (SSYM). SECv: error estándar de validación cruzada; R<sup>2</sup><sub>cv</sub>: coeficiente de determinación de la validación cruzada.

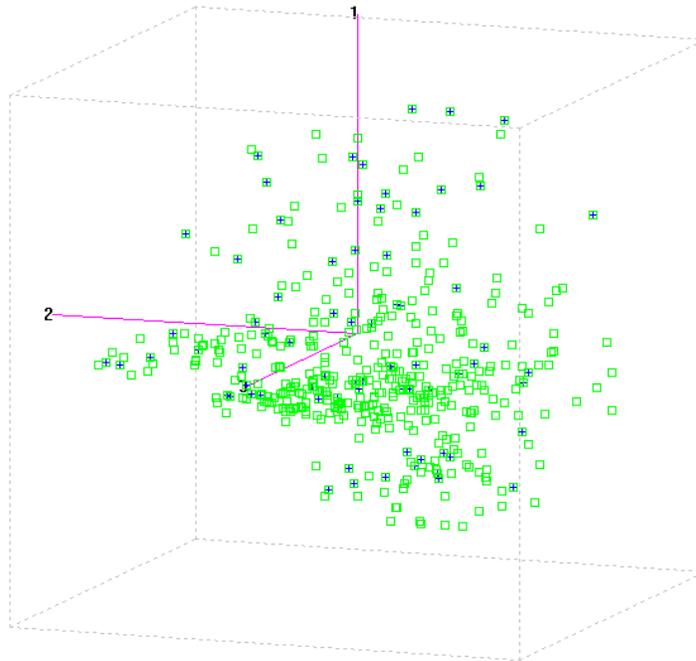


Figura 4.16. Gráfico 3-D de residuos de ensilajes de sorgo y maíz (sin grano) (SSYM) degradados *in situ*. Los ejes corresponden a las componentes principales 2, 3 y 4, las muestras que integran el conjunto de calibración están indicadas con: + y las muestras de la población con: □, para PB (Proteína Bruta).

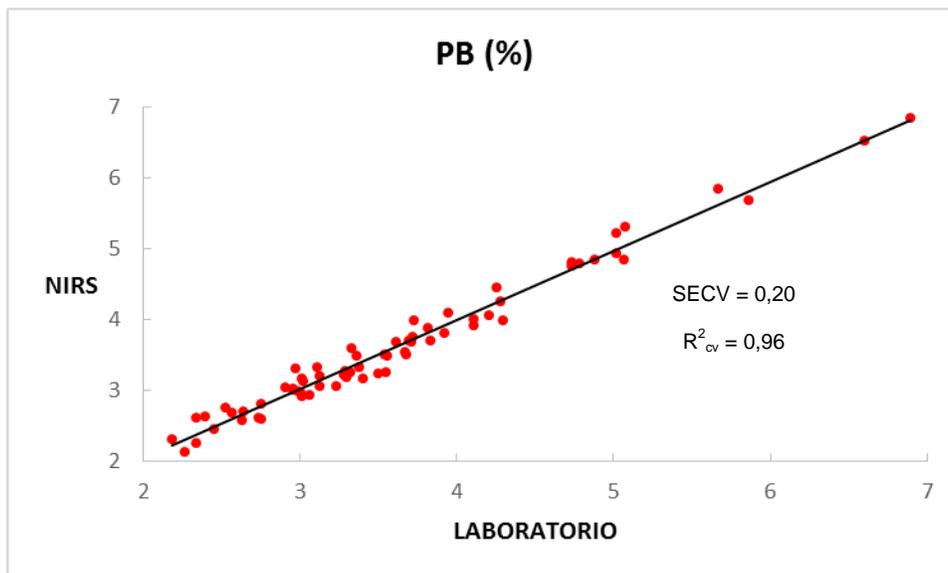


Figura 4.17. Curva de calibración entre valores de referencia (LABORATORIO) y valores predichos por NIRS para PB (Proteína Bruta) en residuos de digestión *in situ* de ensilajes de maíz y sorgo (sin grano) (SSYM). SECv: error estándar de validación cruzada; R<sup>2</sup><sub>cv</sub>: coeficiente de determinación de la validación cruzada.

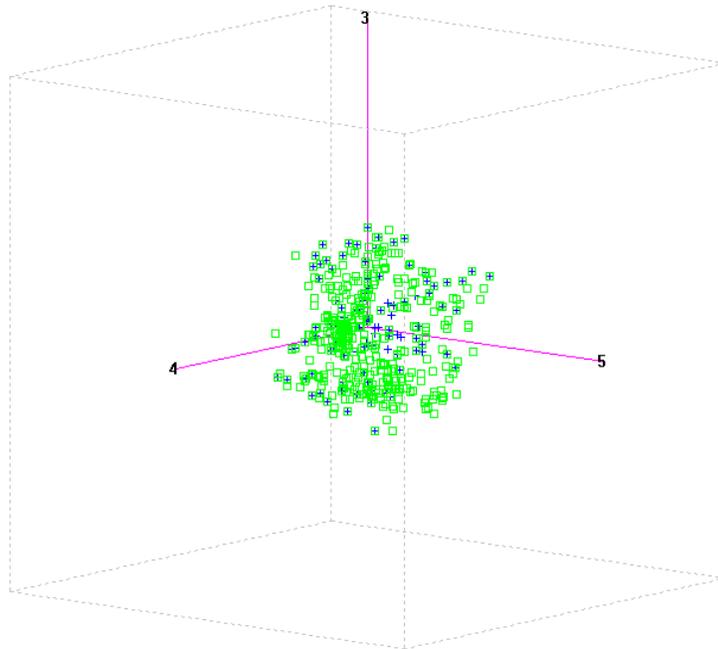


Figura 4.18. Gráfico 3-D de residuos de ensilajes de sorgo y maíz (sin grano) (PMYS) degradados *in situ*. Los ejes corresponden a las componentes principales 2, 3 y 4, las muestras que integran el conjunto de calibración están indicadas con: + y las muestras de la población con: □, para los parámetros FDN (Fibra Detergente Neutro) y FDA (Fibra Detergente Acido).

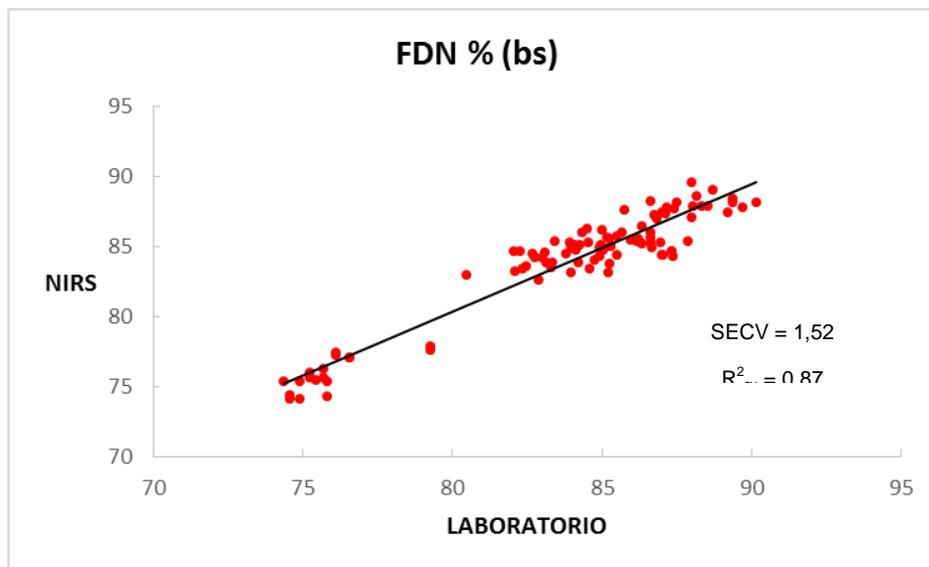


Figura 4.19. Curva de calibración entre valores de referencia (LABORATORIO) y valores predichos por NIRS para FDN (Fibra Detergente Neutro) en residuos de digestión *in situ* de planta de maíz y sorgo (sin grano) (PMYS). SECV: error estándar de validación cruzada;  $R^2_{cv}$ : coeficiente de determinación de la validación cruzada.

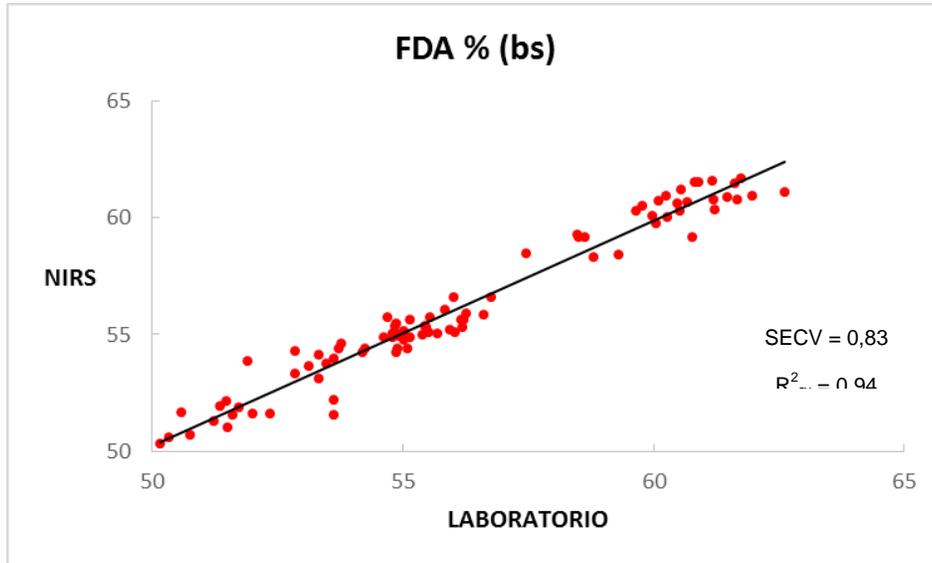


Figura 4.20. Curva de calibración entre valores de referencia (LABORATORIO) y valores predichos por NIRS para FDA (Fibra Detergente Acido) en residuos de digestión *in situ* de planta de maíz y sorgo (sin grano) (PMYS). SECV: error estándar de validación cruzada;  $R^2_{cv}$ : coeficiente de determinación de la validación cruzada.

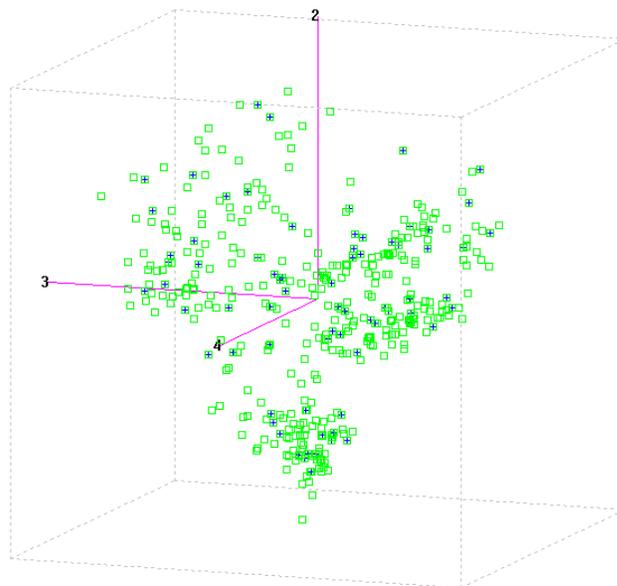


Figura 4.21. Gráfico 3-D de residuos de ensilajes de sorgo y maíz (sin grano) (PMYS) degradados *in situ*. Los ejes corresponden a las componentes principales 2, 3 y 4, las muestras que integran el conjunto de calibración están indicadas con: + y las muestras de la población con: □, para PB (Proteína Bruta).

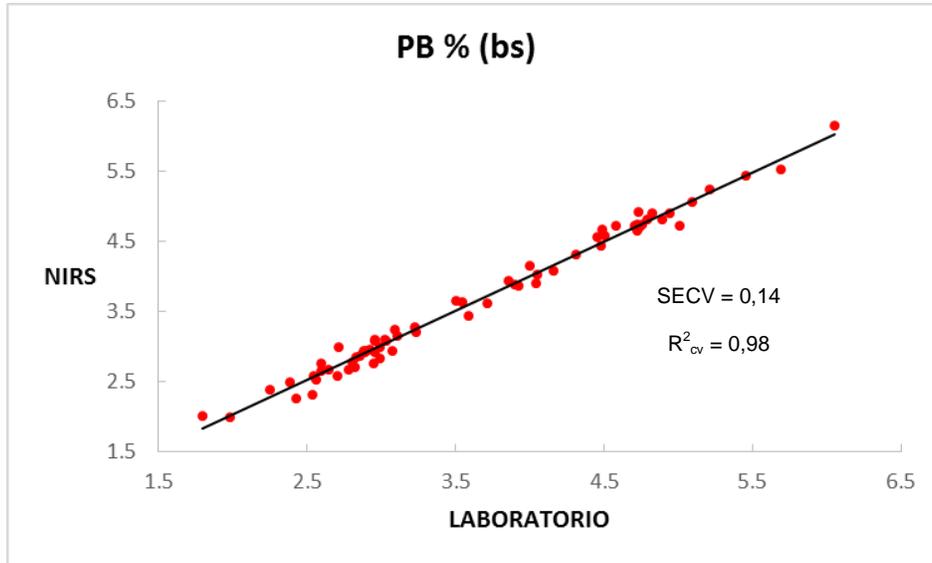


Figura 4.22. Curva de calibración entre valores de referencia (LABORATORIO) y valores predichos por NIRS para PB (Proteína Bruta) en residuos de digestión *in situ* de planta de maíz y sorgo (sin grano) (PMYS). SECV: error estándar de validación cruzada;  $R^2_{cv}$ : coeficiente de determinación de la validación cruzada.

## CONCLUSIONES E IMPLICANCIAS

---

La inclusión de grano de maíz en las dietas de rumiantes afectó los procesos digestivos de la fracción fibrosa de la dieta, lo que varió de acuerdo con la calidad del material fibroso, el nivel de inclusión de grano, la presencia de un buffer dietario y las interacciones entre todos estos factores.

En un primer ensayo se generaron tres ambientes ruminales diferentes de acuerdo con el contenido de grano en la dieta, y se evaluaron las interacciones con distintas fuentes de fibra. Se observó que en los ensilajes de maíz y sorgo (sin grano), la adición de grano de maíz tuvo un menor efecto sobre la degradabilidad de la fibra que en pasto llorón, a pesar de los pH del rumen medidos. El fuerte impacto negativo de un alto nivel de grano en la dieta sobre la degradación de la fibra del pasto llorón implica un aporte nutricional reducido de la misma en dicho tipo de dietas. El aporte del 30% de GM no afectó la degradabilidad de la fibra, mientras el agregado del 60% la afectó significativamente. También es posible que el ambiente de rumen que limita la degradabilidad de la fibra no sea el mismo para cada tipo de forraje, es decir que la microflora podría adaptarse a las condiciones que impone la dieta y modificar así los límites de pH que provocan efectos negativos.

En el segundo ensayo se generaron cuatro ambientes ruminales producto de la combinación de dos niveles de grano de maíz y dos niveles de bicarbonato de sodio. Si bien los tratamientos causaron variaciones en el pH ruminal, la inclusión de BS no contrarrestó los efectos negativos de un alto nivel de GM en la dieta. El uso de bicarbonato como modulador del pH ruminal no fue suficiente a la hora de aprovechar la fracción fibrosa en dietas con alto contenido de almidón en el experimento planteado. Esta práctica podría ser más efectiva si la proporción de concentrado fuera mayor a la utilizada en el presente estudio (60% de grano de maíz entero en la dieta), o también cuando el concentrado de la dieta fuera un almidón más rápidamente fermentecible, o fuera suministrado por períodos de tiempo más largos. Sin embargo en el horario de las 48 horas de incubación el agregado del BS provocó que la degradabilidad de la celulosa totalmente

disponible para su degradación (CEL) en la dieta 60GM+BS, presentara valores similares a los encontrados en dietas 0GM y 0GM+BS. Esto refuerza la idea de que para mejorar la utilización de la fracción fibrosa en dietas de alta densidad energética habría que aumentar la disponibilidad de la fracción potencialmente digestible (celulosa y hemicelulosa) en las matrices fibrosas, mediante la utilización de fuentes de fibra de mayor calidad o a través del tratamiento químico, mecánico o enzimático de las fibras, más que en recurrir al uso de buffers dietarios.

## BIBLIOGRAFIA

---

- Adesogan, A. T. (2002). What are feeds worth? A critical evaluation of selected nutritive value methods. Proceedings 13th Annual Florida Nutrition Symposium, pp. 33-47.
- AFRC. (1993). Energy and protein requirements of ruminants. An advisory manual prepared by the Technical Committee on responses to nutrients. CAB International, Wallingford, UK. 159 p.
- Akin, D. E., Chesson, A. (1989). Lignification as the major factor limiting forage feeding value especially in warm conditions. 16° International Grassland Congress, Nice, France, pp. 1753-1760.
- Allen, M. S., Mertens, D. R. (1988). Evaluating constraints on fiber digestion by rumen microbes. *The Journal of Nutrition*, 118:261-270.
- Allen, M. S. (1996). Relationship between forage quality and dairy cattle production. *Animal Feed Science and Technology*, 59:51-60.
- Andrés, S., Calleja, A., López, S., Mantecón, Á. R., y Giráldez, F. J. (2005). Nutritive evaluation of herbage from permanent meadows by near-infrared reflectance spectroscopy: 2. Prediction of crude protein and dry matter degradability. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(9), 1572–1579.
- AOAC. (1990). Official Methods of Analysis, 15th edition (AOAC, Arlington, VA).
- Arelovich, H. M., Arzadún, M. J., Laborde, H. E. y Vasquez, M. G. (2003). Performance of beef cattle grazing oats supplemented with energy, escape protein or high quality hay. *Animal Feed Science and Technology* 105: 29–42.
- Arias, S., Di Marco, O. N., y Aello, M. S. (2003). Effects of Hybrid and Maturity on Maize Stover Ruminant Degradability in Cattle Fed Different Diets. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 16(11), 1619–1624.
- Aschenbach, J. R., Penner, G. B., Stumpff, F. y Gäbel, G. (2011). Ruminant nutrition symposium: Role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH. *Journal of Animal Science* 89:1092-1107.
- Bach, A., y Casamiglia, S. (2002). Manual de Racionamiento para el ganado vacuno Lechero. Ed. Servet. ISBN: 8493292125.

- Bach, A., Calsamiglia, S., y Stern, M. D. (2005). Nitrogen metabolism in the rumen. *Journal Dairy Science*. 88: (E. Suppl.):E9–E21.
- Bach, A., Guasch, I., Elcoso, G., Duclos, J., y Khelil-Arfa, H. (2018). Modulation of rumen pH by sodium bicarbonate and a blend of different sources of magnesium oxide in lactating dairy cows submitted to a concentrate challenge. *Journal of Dairy Science*, 101(11), 9777–9788.
- Balch, C.C., 1971. Proposal to use time spent chewing as an index of the extent to which diet for ruminant possess the physical property of fibrousness characteristics of roughages. *British Journal of Nutrition*, 389–394.
- Bannink, A., France, J, Lopez, S. Gerrits, W. J. J., Kebreab, E., Tamminga, S. y Dijkstra, J. (2008). Modelling the implications of feeding strategy on rumen.
- Bargo, F., Muller, L.D., Delahoy, J.E. y Cassidy, T.W. (2002). Milk response to concentrate supplementation of high producing dairy cows grazing at two pasture allowances. *Journal of Dairy Science* 85: 1777-1792.
- Bargo, F., Muller, L.D., Kolver, E.S. y Delahoy, J.E. (2003). Production and digestion of supplemented Dairy cows on pasture. *Journal of Dairy Science* 86: 1- 42.
- Barnes, R. J., Dhanoa, M. S. y Lister, S. J. (1989). Standard Normal Variate Transformation and De-Trending of Near-Infrared Diffuse Reflectance Spectra. *Applied Spectroscopy*, 43(5), 772–777.
- Bath, I.H. y Rook, J.A.F. (1965). The evaluation of cattle foods and diets in terms of the ruminal concentration of volatile fatty acids: II. Roughages and succulents. *Journal of Agricultural Science*. 64: 67-75.
- Beebe, K. R., Pell, R. J. y Seasholtz, M. B. (1998). *Chemometrics. A practical guide*, John Wiley y sons, New York.
- Behling Neto, A., Pereira dos Reis, R. H., da Silva Cabral, L., Gonçalves de Abreu, J., de Paula Sousa, D. y Gama de Sousa, F. (2017). Nutritional value of sorghum silage of different purposes. *Ciência e Agrotecnologia*, 41(3): 288-299.
- Bertrand, D. y Dufour, E. (2000). *La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques*. Editions TEC y DOC, Paris, France.

- Bertrand, D. (1993). Data pre-treatment and original analysis in spectroscopy. Advanced Comet Chemometrics School. Libramont Belgium, April 26-28, 1993.
- Berzaghi, P., Herbein, J.H. y Polan, C.E. (1996). Intake, site, and extent of nutrient digestion of lactating cows grazing pasture. *Journal of Dairy Science* 79:1581–1589.
- Block, E. (1994). Manipulation of dietary cation-anion difference on nutritionally related production diseases, productivity, and metabolic responses of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 77(5): 1437-1450.
- Bodas, R., Frutos, P., Giráldez, F. J., Hervás, G. y López S. (2009) Effect of sodium bicarbonate supplementation on feed intake, digestibility, digesta kinetics, nitrogen balance and ruminal fermentation in young fattening lambs. *Spanish Journal of Agricultural Research* 7(2): 330-34.
- Brethour, J. R., J. Riley, y B. Lee. (1986). Adding fat and/or sodium bicarbonate to steer finishing rations that contain wheat. *Kansas State Univ. Rep. of Prog.* 494. pp 4-11. Manhattan.
- Broderick, G. A., y Kang, J. H. (1979). Automated Simultaneous Determination of Ammonia and Total Amino Acids in Ruminal Fluid and In Vitro Media. *Journal of Dairy Science*, 63(1), 64–75.
- Burns, D. A. y Ciurczak, E.W. (1992). *Handbook of near infrared analysis*. Burns, D. A. and Ciurczak, E.W. (eds.) Marcel Dekker, New York, NY, USA.
- Burroughs, W., Gerlaugh P., Edington B. H. y Bethke R. M. (1949). The influence or corn starch upon roughage digestion in cattle. *Journal Animal and Science*, 8:271
- Buxton, D. R. y Redfearn, D. (1997). Plant limitations to fiber digestion and utilization. In: *New development in forages science contributing to enhanced fiber utilization by ruminants*. 37th Annual Ruminant Nutrition Conference, Washington. pp. 814S-816S.
- Calabro S., Cutrignelli M.I., Piccolo G., Bovera F., Zicarelli F., Gazaneo M.P., Infascelli F.(2005). In vitro fermentation kinetics of fresh and dried silage. *Animal Feed Science and Technology*, 123-124 Part 1 , pp. 129-137.

- Calsamiglia, S. (1997). Nuevas bases para la utilización de la fibra en dietas de rumiantes. XIII Curso de Especialización FEDNA: Avances en Nutrición y Alimentación Animal. Eds.: P. G<sup>a</sup>. Rebollar, C. de Blas y G. G. Mateos. Pp 3-19
- Calsamiglia, S., Blanch M., Ferret A. y Moya D. (2012). Es la acidosis un problema asociado al pH? Causas y herramientas para su control. XXVIII Curso de Especialización FEDNA: Avances en Nutrición y Alimentación Animal. Eds.: P.G<sup>a</sup>. Rebollar, C. de Blas y G.G. Mateos. Pp 105-120.
- Calsamiglia, S., Ferret, A. y Devant, M. (2002). Effects of pH and pH fluctuations on microbial fermentation and nutrient flow from a dual-flow continuous culture system. *Journal of Dairy Science* 85:574–579.
- Calsamiglia, S., Cardozo, P. W., Ferret, A., y Bach, A. (2008). Changes in rumen microbial fermentation are due to a combined effect of type of diet and pH1. *Journal of Animal Science*, 86(3): 702–711.
- Camps N. D. y González G. O. 2003. Grano de maíz en la alimentación del ganado: ¿entero o partido?. Disponible en URL [http://www.produccionanimal.com.ar/informacion\\_tecnica/suplementacion/04-grano\\_maiz.pdf](http://www.produccionanimal.com.ar/informacion_tecnica/suplementacion/04-grano_maiz.pdf).
- Carpita, N. C., Gibeut, D. M. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*, 3:1-30.
- Carruthers, V.R., Neil, P.G. y Dalley, D.E. (1997). Effect of altering the non-structural: structural carbohydrate ratio in a pasture diet on milk production and ruminal metabolites in cows in early and late lactation. *Animal Science* 64:393– 402.
- Cerrato-Sánchez, M., Calsamiglia, S. y Ferret, A. (2008). Effect of the magnitude of the decrease of rumen pH on rumen fermentation in a dual-flow continuous culture system. *Journal of Animal Science*, 86:378-383.
- Cerrato-Sanchez, M., Calsamiglia, S. y Ferret, A. (2007a). Effects of patterns of suboptimal pH on rumen fermentation in a dual-flow continuous culture system. *Journal of Dairy Science*, 90: 4368-4377.

- Cerrato-Sanchez, M., Calsamiglia, S. y Ferret, A. (2007b). Effects of time at suboptimal pH on rumen fermentation in a dual-flow continuous culture system. *Journal of Dairy Science*, 90: 1486-1492.
- Chang V. S. y Holstzaple M. T. (2000). Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 84- 86:5-37.
- Chase, C.C. Jr. y Hibberd, C.A. (1987). Utilization of low-quality native grass by beef cows fed increasing quantities of corn grain. *Journal of Animal Science* 65:557-566.
- Cheng, K. J., J. Fay y R. Howarth. (1980). Sequence of events in the digestion of fresh legume leaves by rumen bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 40:613–619.
- Cherney, J. H., Moore, K. J., Volenec, J. J. y Axtell, J.D. (1986). Rate and extent of digestion of cell wall components of brown-midrib sorghum species. *Crop Science*, 26:1055-59.
- Church, D. E. (1988). El rumiante, fisiología digestiva y nutrición, Editorial ACRIBIA SA P, Cap 8; 168-172, Cap 3; 283.
- Christensen, L.K. (2004). NPK Deficiencies Discrimination by use of Spectral and Spatial Response. Doctoral dissertation. The Royal Veterinary and Agricultural University, Denmark, p. 102
- Coleman S. W., Moore J. E. y Wilson J. R. (2004). Quality and Utilization. En *Warm-Season (C4) Grasses*. Editado por Moser L. E., Burson B. L. y Sollenberger L. E.
- Colman E., Khafipour E., Vlaeminck B., De Baets B., Plaizier J. C. y Fievez V. (2013). Grain-based versus alfalfa-based subacute ruminal acidosis induction experiments: Similarities and differences between changes in milk fatty acids *Journal of Dairy Science*, 96: 4100-4111
- Colombini, S., Rapetti, L., Colombo, D., Galassi, G., y Crovetto, G. M. (2010). Brown midrib forage sorghum silage for the dairy cow: Nutritive value and comparison with corn silage in the diet. *Italian Journal of Animal Science*, 9(3), 273–277.

- Cone, J. W. y Becker, P. M. (2012). Fermentation kinetics and production of volatile fatty acids and microbial protein by starchy feedstuffs. *Animal Feed Science and Technology*, 172: 34– 41.
- Cooper, S. D. B., Kyriazakis, I. y Oldham, J. D. (1996). The Effects of Physical Form of Feed, Carbohydrate Source, and Inclusion of Sodium Bicarbonate on the Diet Selections of Sheep. *Journal of Animal Science*, 74(6), 1240–1251.
- Correa, L. B., Zanetti, M. A., Saran Netto, A., Del Claro, G. R., Paiva, F. A., y Martins, P. G. M. A. (2014). Effects of supplemental dietary sodium bicarbonate on performance of lactating Holstein cows during the summer season in Brazil. *Livestock Science*, 169(C), 78–82.
- Corson, D. G., Waghorn, G. C., Ulyatt, M. J. y Lee, J. (1999). Forage analysis and livestock feeding. *Proceedings of the New Zealand Grasslands Association* 61 127–132.
- Cruywagen, C. W., Taylor, S., Beya, M. M., y Calitz, T. (2015). The effect of buffering dairy cow diets with limestone, calcareous marine algae, or sodium bicarbonate on ruminal pH profiles, production responses, and rumen fermentation. *Journal of Dairy Science*, 98(8), 5506–5514.
- Dalke B. S., Sonon R. N., Gramlich S. M. y Bolsen K.K. (1993). Whole plant corn, forage sorghum and grain sorghum silages for growing cattle. *Kansas State University Cattlemen´s Day* 93: 678:16-18.
- de Veth, M. J., and Kolver, E. S. (2001). Diurnal variation in pH reduces digestion and synthesis of microbial protein when pasture is fermented in continuous culture. *Journal of Dairy Science*, 84: 2066-2072.
- Deaville E. R. y Flinn P. C. editado por Givens, D. I. (D. I. (2000). Forage evaluation in ruminant nutrition. CABI Pub.
- Debroas, D., y Blanchart, G. (1993). Interactions between proteolytic and cellulolytic rumen bacteria during hydrolysis of plant cell wall protein. *Reproduction Nutrition Development* 33:283–288.

- De Boever, J.L.; Aerts, J.M.; Vanacker, J.M.; De Brabander, D.L. (2005). Evaluation of the nutritive value of maize silages using a gas production technique. *Animal Feed Science Technology*, 123-124:255-265.
- De Veth M.J., Kolver E.S.(2001). Digestion of ryegrass pasture in response to change in pH in continuous culture. *Journal of Dairy Science*, 84 (6) , pp. 1449-1457.
- Dewhurst R.J., Davies D.R., Merry R.J. (2000). Microbial protein supply from the rumen. *Animal Feed Science and Technology*, 85 (1-2) , pp. 1-21.
- Dhanao, M.S. (1988). On the analysis of dacron bag data for low degradability feeds. *Grass Forage Sci.*,43, 441–444.
- Dhanao, M. S., Lister, S. J., Sanderson, R. y Barnes, R. J. (1994). The link between Multiplicative Scatter Correction (MSC) and Standard Normal Variate (SNV) transformations of NIR spectra. *Journal Near Infrared Spectroscopy* (2) 43-47.
- Dhanao, M.S.; Lopez, S.; Dijkstra, J.; Davies, D.R.; Sanderson, R.; Williams, B.A.; Sileshi, Z.; France, J. (2000). Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed in vitro: comparison of models. *British Journal of Nutrition*, 83:131-142.
- Dixon, R.M., Stockdale, C.R. (1999). Associative effects between forages and grains: consequences for feed utilization. *Australian Journal of Agricultural Research*, 50, 757-774.
- Di Marco, O. N., Aello, M. S., y Arias, S. (2005). Digestibility and ruminant digestion kinetics of corn silage. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, 57(2), 223–228.
- Di Marco, O. N., Ressia, M. A., Arias, S., Aello, M. S., y Arzadún, M. (2009). Digestibility of forage silages from grain, sweet and bmr sorghum types: Comparison of in vivo, in situ and in vitro data. *Animal Feed Science and Technology*, 153(3–4), 161–168.
- Dirksen, G. (1969) En: *Third Intr. Symp. Cambridge, Physiology of digestion y metabolism in the ruminant*. Oriel Press Ltd., Newcastle upon Tyne, England, pp. 612.

- Disjksstra, J., Ellis, J. L., Kebreab, E., Strathe, A. B., López, S., France, J. y Bannink, A. (2012). Ruminant pH regulation and nutritional consequences of low pH. *Animal Feed Science and Technology*, 172: 22-33.
- Doepel, L. y Hayirli, A. (2011). Exclusion of dietary sodium bicarbonate from a wheat-based diet: Effects on milk production and ruminal fermentation. *Journal of Dairy Science*, 94(1), 370–375.
- DONG S.-Z., Azarfar A., ZOU Y., LI S.-L., WANG Y.-J., CAO Z.-J. (2017) Effects of sequence of nylon bags rumen incubation on kinetics of degradation in some commonly used feedstuffs in dairy rations. *Journal of Integrative Agriculture*, 16 (1) , pp. 162-168.
- Elizalde, J. y Rifle, S. (2011). El futuro de la ganadería argentina y sus desafíos: Alimentación y sistemas de producción. En: 2º Jornada Nacional de Forrajes Conservados. EEA INTA Manfredi. 19-25.
- Emery, R.S. y Brown, L.D., 1961. Effect of feeding sodium and potassium bicarbonates on milk fat, rumen pH and VFA production in the rumen. *Journal of Dairy Science*, 44: 1899–1902.
- Emmanuel, B., Lawlor, M. J. y Mcleese, D. (1970). The effect of phosphate and carbonate-bicarbonate supplements on the rumen buffering systems of sheep. *British Journal of Nutrition*, 24: 653–660.
- Erdman, R. A. (1988). Dietary buffering requirements of the lactating dairy cow: A review. *Journal of Dairy Science*, 71:3246-3266.
- Erdman, R.A., Hemken, R.W. y Bull, L.S., (1982). Dietary sodium bicarbonate and magnesium oxide for early postpartum lactating dairy cows: effect of production, acid–base metabolism and digestion. *Journal of Dairy Science*, 65: 712–731.
- Erfle, J. D., R. J. Boila, R. M. Teather, S. Mahadevan, y F. D. Sauer. (1982). Effect of pH on fermentation characteristics and protein degradation by rumen microorganisms in vitro. *Journal of Dairy Science*, 65:1457–1464.
- El-Shazly, K., Dehority, B.A. y Johnson, R.R., 1961. Effect of starch on digestion of cellulose in vitro and in vivo by rumen microorganism. *Journal of Animal Science*, 20: 268–273.

- Fassio, A., Restaino, E., y Cozzolino, D. (2014). Prediction of fiber fractions, ash and organic matter digestibility in untreated maize stover by near infrared reflectance spectroscopy. *Agro Sur*, 42(1): 41–46.
- Fekadu, D., Bediye S. y Sileshi Z. (2010). Characterizing and predicting chemical composition and in vitro digestibility of crop residue using near infrared reflectance spectroscopy (NIRS). *Livestock Research for Rural Development*. Volume 22, Article 29.
- Fernández-Cabanás, V. y Garrido-Varo, A. (1999). The use of “standard normal variate” and “detrending” as signal improvement tools for the interpretation of near infrared spectra of agro-food products. *Química Analítica*, 18: 113-118.
- Fernando, S. C., Purvis, H. T., Najar, F. Z., Sukharnikov, L. O., Krehbiel, C. R., Nagaraja, T. G., Roe, B. A., y Desilva, U. (2010). Rumen microbial population dynamics during adaptation to a high-grain diet. *Applied and environmental microbiology*, 76(22), 7482–7490.
- Foskolos, A., Calsamiglia, S., Chrenková, M., Weisbjerg, M. R., y Albanell, E. (2015). Prediction of rumen degradability parameters of a wide range of forages and non-forages by NIRS. *Animal*, 9(07): 1163–1171.
- French N., Kennelly J.J. (1990) Effects of Feeding Frequency on Ruminal Parameters, Plasma Insulin, Milk Yield, and Milk Composition in Holstein Cows. *Journal of Dairy Science*, 73 (7) , pp. 1857-1863.
- Fritz, J. O., Moore, K. J. y Jaster, E. H. (1990). Digestion kinetics and cell wall composition of brown midrib sorghum x sudangrass morphological components. *Crop Science*, 30:213-219.
- Fuentes, M. (2016). Suplementación energética de bovinos a pastoreo. Efecto de niveles moderados de suplemento sobre la dinámica de digestión de la dieta basal. Tesis de Maestría. UNS Bahía Blanca.
- Garrett, E.F., Pereira, M.N., Nordlund, K.V., Armentano, L.E., Goodger, W.J. y Oetzel, G.R. (1999). Diagnostic methods for the detection of subacute ruminal acidosis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 82: 1170-1178.
- Gagliostro, G. A. y Schroeder, G. F. (2007). Efectos de la suplementación con sales cálcicas de ácidos grasos insaturados sobre la digestión ruminal en

- vacas lecheras en pastoreo Effects of supplementation with calcium salts of unsaturated fatty acids on ruminal digestion by grazing dairy cows. Archivos Latinoamericanos de Producción Animal. Estación Experimental Balcarce Aceptado Mayo, 276(6), 85–97.
- Gargano, O.A. y Adúriz, M.A. (1984). Manejo de la defoliación y fertilización nitrogenada en pasto llorón, *Eragrostis curvula* cv. Tanganyka. I. Rendimiento de material seca, digestibilidad in vitro y rendimiento de materia seca digestible. Revista de la Facultad de Agronomía (UBA) 5: 7-14.
- Garriz, M., y A. López. 2002. Suplementación con nitrógeno no proteico en rumiantes. Sitio Argentino de Producción Animal.
- Getachew, G., Blümmel, M., Makkar, H.P.S., Becker, K. (1998). In vitro gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. Animal Feed Science and Technology, 72:261-281.
- Getachew, G.; Robinson, P.H.; Depeters, E.J.; Taylor, S.J. (2004). Relationships between chemical composition, dry matter degradation and in vitro gas production of several ruminant feeds. Animal Feed Science and Technology, 111:57-71.
- Giordano, J. M., Peiretti, J. y Sánchez, F. (2013). Hacia la tecnificación del heno de alta calidad. En: 4° Jornada Nacional de Forrajes Conservados. EEA INTA Manfredi. Pp. 93-110.
- Givens, D. I., Baker, C. W., y Zamime, B. (1992). Regions of normalised near infrared reflectance difference spectra related to the rumen digestion of straws. Animal Feed Science and Technology, 36(1–2): 1–12.
- González, L., Manteca, X., Calsamiglia, S., Schwartzkopf-Genswein, K., y Ferret, A. (2012). Ruminal acidosis in feedlot cattle: Interplay between feed ingredients, rumen function and feeding behavior: A review. Animal Feed Science and Technology, 172: 66-79.
- Grant, R.J.; Haddad, S.G.; Moore, K.J.; Pedersen, J.F. (1995). Brown midrib sorghum silage for mid lactation dairy cows. J. Dairy Sci. 78:1970-1980.

- Hadjipanayiotou, M. (1982). Effect of Sodium Bicarbonate and of Roughage on Milk Yield and Milk Composition of Goats and on Rumen Fermentation of Sheep. *Journal of Dairy Science*, 65(1): 59–64.
- Hart, S. P. y Doyle, J. J. (1985). Adaptation of early-weaned lambs to high-concentrate diets with three grain sources, with or without sodium bicarbonate. *Journal Animal Science*, 61: 975- 984.
- Hoover, W. H. (1986). Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. *Journal Dairy Science*, 69:2755–2766.
- Horlick, G. (1972). Digital data handling of spectra utilizing Fourier transformations. *Analitical Chemistry*, 44: 943-947.
- Hu, W. y Murphy M.R., (2005). Statistical evaluation of early- and mid-lactation dairy cow responses to dietary sodium bicarbonate addition. *Animal Feed Science and Technology*, 119 (1-2): 43–54.
- Hu, Z. H., Wang, G., y Yu, H. Q. (2004). Anaerobic degradation of cellulose by rumen microorganisms at various pH values. *Biochemical Engineering Journal*, 21(1): 59–62.
- Hu, Z. H., Yu, H. Q., y Zhu, R. F. (2005). Influence of particle size and pH on anaerobic degradation of cellulose by ruminal microbes. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 55(3), 233–238.
- Hsu, H., McNeil, A., Okine, E., Mathison, G., y Soofi-Siawash, R. (1998). Journal of near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 6: 129–143.
- Hussain, A. y Miller, E.L. (1999). Effect of sucrose and lactose with sodium bicarbonate on rumen metabolism and microbial protein synthesis in sheep (abstract). *Annual Proceedings of Animal Science* 77:28
- Ingentron, F. M., Dominguez, F., Rabotnikof, C. M., y Stritzler, N. P. (2013). Degradabilidad ruminal in situ de granos de maíz de genotipos contrastantes en bovinos. *Revista de La Facultad de Agronomía UNLPam*, 23 (2): 27-32.
- Iwamoto, M., (1991). Application of Near Infrared Spectroscopy for quality control in food and feed industries. En *Proceedings of the 3rd International*

- Conference on Near Infrared Spectroscopy. Biston, R. and Bartiaux-Thill, N. (eds.). Agricultural Research Centre, Gembloux, Belgium. 175-186.
- James, L. G. y Wohlt, J. E. (1985). Effect of supplementing equi-valent cation amounts from NaCl, MgO, NaHCO<sub>3</sub> and CaCO<sub>3</sub> on nutrient utilization and acid-base status of growing dorset lambs fed high concentrate diets. *Journal Animal Science*, 60, 307-315.
- Jaurena G, Fiedler D and Danelón JL. (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* 17:36–37
- Jones-Endsley, J.M., Cecava, M.J. y Johnson, T.R. (1997). Effects of dietary supplementation on nutrient digestion and the milk yield of intensively grazed lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 80: 3283–3292.
- Juan, N.A., Ortiz, D.A., Pordomingo, A.B. y Funaro, D.O. (2016). “Tecnología NIRS para estimar el valor nutritivo de planta entera de maíz y sorgo para silaje y sus fracciones (tallo, hoja, panoja/espiga)”. *Revista de la Asociación Argentina de Producción Animal*, 36 (1): 230
- Jung, H. G. (2012). Forage Digestibility: The intersection of cell Wall lignification and Plant Tissue Anatomy. Dept. of Agronomy and Plant Genetics, Dept. of Animal Science, University of Minnesota.
- Jung, H. J. (1989). Forage lignins and their effects on fiber digestibility. *Agronomy Journal*, 81:33-38.
- Jung, H.J. y Allen, M.S. (1995). Characteristics of plant cell walls affecting intake and digestibility of forages by ruminants. *Journal Animal Science*, 73:2774-2790.
- Jung, H.J. y Deetz, D.A. (1993). Cell wall lignification and degradability. In: H.G. Jung, D.R. Buxton, R.D. Hatfield y J. Ralph (Ed). Forage cell wall structure and digestibility. ASA-CSSASSA, Madison, WI. pp. 315-346.
- Kalscheur, K.F., Teter, B.B., Piperova, L.S. y Erdman R.A. (1997). Effect of dietary forage concentration and buffer addition on duodenal flow of trans-C18:1 fatty acids and milk fat production in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 80: 2104-2114.

- Kaiser, A. G.; Plitz, J. W.; Burns, H. M.; Griffiths, N. W. (2004). Successful silage. Orange: Dairy Australia NSW Department of Primary Industries, 468 p.
- Kamalak, A., Canbolat, O., Gurbuz, Y., y Ozay, O. (2005). Comparison of in vitro gas production technique with in situ nylon bag technique to estimate dry matter degradation. *Czech Journal of Animal Science*, 50(2), 60–67.
- Kawas, J. R., García-Castillo, R., Fimbres-Durazo, H., Garza-Cazares, F., Hernández-Vidal, J. F. G., Olivares-Saenz E. y Lu, C.D. (2007). Effects of sodium bicarbonate and yeast on nutrient intake, digestibility, and ruminal fermentation of lightweight lambs fed finishing diets. *Small Ruminant Research*, 67:149-156.
- Keim, J. P., Charles, H., y Alomar, D. (2016). Prediction of crude protein and neutral detergent fibre concentration in residues of in situ ruminal degradation of pasture samples by near-infrared spectroscopy (NIRS). *Animal Production Science*, 56(9), 1504–1511.
- Kennelly, J., Robinson, B. y Khorasani, G. (1999). Influence of carbohydrate source and buffer on rumen fermentation characteristics, milk yield, and milk composition in early-lactation Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 82:2486–2496.
- Kent, F., Pordomingo, A.J. y Jouli, R. (2011). Efecto del tipo de sorgo sobre la performance animal en dietas basadas ensilaje. *Revista Argentina de Producción Animal*, 31 (1): 271-401 p 313.
- Kent, F. 2019. Ensilaje de sorgo y maíz. Ciclo de Talleres de Ganadería de Cría, Realicó, convenio INTA - SRA. Cartilla técnica. Publicado en internet, disponible en: [https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta\\_federico\\_kent\\_ensilajes\\_sra\\_realico.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta_federico_kent_ensilajes_sra_realico.pdf). Activo octubre 2019.
- Kilmer, L. H., Muller, L. D. y Snyder, T. J. (1981). Addition of sodium bicarbonate to rations of postpartum dairy cows: physiological and metabolic effects. *Journal of Dairy Science*, 64: 2357–2369.

- Krause, K. M., y Oetzel, G. R. (2006). Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. *Animal Feed Science and Technology*, 126, 215-236.
- Krehbiel, C. R., McCoy, R. A., Stock, R. A., Klopfenstein, T. J., Shain, D. H., Huffman, R. P. (1995). Influence of grain type, tallow level, and tallow feeding system on feedlot cattle performance. *Journal of Animal Science*, 73 (10): 2916–2921.
- Kohn, R. A. y Dunlap T. F. (1998). Calculation of the buffering capacity of bicarbonate in the rumen and in vitro. *Journal of Animal Science*, 76 (6): 1702–1709
- Kumar R, y Wayman C. E. (2009). Cellulase adsorption and relationship to features of corn stover solids produced by leading pretreatments. *Biotechnology and Bioengineering*, 103:252-267.
- Lechartier, C., y Peyraud, J. L. (2011). The effects of starch and rapidly degradable dry matter from concentrate on ruminal digestion in dairy cows fed corn silage-based diets with fixed forage proportion. *Journal of Dairy Science*, 94(5): 2440–2454.
- Lechtenberg, V. L., Muller, L. D., Bauman, L. F., Rhykerd, C. L. y Barnes, R. F. (1972). Laboratory and in vitro evaluation of inbred and F2 populations of brown midrib mutants of *Zea mays* L. *Agronomy Journal*, 64:657-660.
- Li, F., Cao, Y., Liu, N., Yang, X., Yao, J., y Yan, D. (2014). Subacute ruminal acidosis challenge changed in situ degradability of feedstuffs in dairy goats. *Journal of Dairy Science*, 97(8): 5101–5109.
- Licitra, G.; Hernandez, T. M. y Van Soest, P. J. (1996). Standardizations of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 57:347-358.
- Lofgreen, G. P. (1976). A comparison of sodium bicarbonate with rumensin in a finishing ration. *California Feeders Day Rep.* pp 15-20. Davis.
- Lowman RS, Theodorou MK and Cuddeford D.(1992). The effect of sample processing on gas production profiles obtained using the pressure transducer technique. *Anim Feed Sci Technol* 97:221–237.

- Mandebvu, P. y Galbraith, H. (1999). Effect of sodium bicarbonate supplementation and variation in the proportion of barley and sugar beet pulp on growth performance and rumen, blood and carcass characteristics in young entire lambs. *Animal Feed Science and Technology*, 82:37–49.
- Marden, J. P., Julien, C., Monteils, V., Auclair, E., Moncoulon, R. y Bayourthe C. (2008). How does live yeast differ from sodium bicarbonate to stabilize ruminal pH in high-yielding dairy cows? *Journal of Dairy Science*, 91:3528–3535.
- Maresca, S., Santini, F., Elizalde, J. (2003). Grano de maíz entero en la alimentación de ganado. Unidad Operativa Cuenca del Salado. INTA [http://www.produccionanimal.com.ar/produccion\\_y\\_manejo\\_reservas/reserva\\_granos/11-grano\\_maiz.pdf](http://www.produccionanimal.com.ar/produccion_y_manejo_reservas/reserva_granos/11-grano_maiz.pdf)
- Maresca S., Pavan E. y Santini F.J. 2001. Comportamiento productivo de terneras alimentadas a corral con grano de maíz entero y partido. *Revista Argentina de Produccion Animal*. Vol 21. Supl.1. 60.
- Marquardt, W. (1963). An algorithm for leastsquares estimation of nonlinear parameters. *Journal of the Society for Industrial and Applied Mathematics*, 11(2): 431.
- Martens, H. y Martens, M. (2001). *Multivariate Analysis of Quality. An Introduction*. *Measurement Science and Technology*, 12(10), 1746–1746.
- Martin, C., Brossard, L., y Doreau, M. (2006a). Mechanisms of appearance of ruminal acidosis and consequences on physiopathology and performances. *Productions Animales -Paris- Institut National de la Recherche Agronomique-*. 19(2), 93-107.
- Maspoch, S. A., Ríos Castro, A., Moreno Bondi, M. C., y Simonet Suau, B. M. (2012). El procesado de la señal espectroscópica. *Técnicas espectroscópicas en química analítica. Síntesis*.
- McDonald, I. (1981). A revised model for the estimation of protein degradability in the rumen. *The Journal of Agricultural Science*, 96(01), 251.
- McDonald, P., Edwards, R.A., Greenhalgh, J.F.D. y Morgan, C.A. (1995). *Animal Nutrition*. 5th Ed. Longman, Singapore. 607 p.

- Mees, D. C., Merchen, N. R. y Mitchel, C. J. (1985). Effects of sodium bicarbonate on nitrogen balance, bacterial protein synthesis and sites of nutrient digestion in sheep. *Journal of Animal Science*, 61, 985-994.
- Mehrez, A. Z., y Ørskov, E. R. (1977). A study of artificial fibre bag technique for determining the dig estibility of feeds in the rumen. *The Journal of Agricultural Science*, 88(03), 645.
- Mehrez, A.Z., Ørskov, E. R., McDonald, I.W. (1977). Rates of rumen fermentation in relation to ammonia concentration. *British Journal of Nutrition* 38: 437-443.
- Menke, K.; Raab, L.; Salewski, A.; Steingass, H.; Fritz, D.; Schneider, W. (1979). The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feeding stuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. *Journal Agricultural Science*, 93:217-222.
- Mertens, D. R., y Ely, L. O. (1982). Relationship of Rate and Extent of Digestion to Forage Utilization-A Dynamic Model Evaluation. *Journal of Animal Science*, 54(4), 895–905.
- Mertens, D.R. (1987). Predicting intake and digestibility using mathematical models of ruminal function. *Journal Animal Science*, 64: 1548-1558.
- Mertens, D.R., Ely, L.O., (1979). A dynamic model of fiber digestion and passage in the ruminant for evaluating forage quality. *Journal Animal Science*, 49: 1085–1095.
- Molina, L. R., Gonçalves, L. C., Rodriguez, N. M., Rodrigues, J. A. S., Ferreira, J. J., y Castro Neto, A. G. (2002). Degradabilidade in Situ da Matéria Seca e Proteína Bruta das Silagens de Seis Genótipos de Sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) em Diferentes Estádios de Maturação. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 31(1), 148–156.
- Montiel M.D. y J.C. Elizalde. (2004). Factores que afectan la utilización ruminal del grano de sorgo en vacunos. *Revista Argentina de Produccion Animal*, 24: 1-20.
- Mould, F. L. y E. R. Ørskov. (1983). Manipulation of rumen fluid pH and its influence on cellulolysis in sacco, dry matter degradation and the ruminal

- microflora of sheep offered either hay or concentrate. *Animal Feed Science and Technology*, 10:1–14.
- Mould, F. L., E. R. Ørskov y S. O. Mann. (1984). Associative effect of mixed feeds. I. Effects of type and level of supplementation and the influence of the rumen fluid pH on cellulolysis in vivo and dry matter digestion of various roughages. *Animal Feed Science and Technology*, 10:15–30.
- Mourino, F., Akkarawongsa, R. y Weimer, P. J. (2001). Initial pH as a determinant of cellulose digestion rate by mixed ruminal microorganisms in vitro. *Journal of Dairy Science*, 84, 848-859.
- Muniz, J. A., Savian, T. V., y Scalon, J. D. (2008). Parameters estimation in the model for in situ degradability of mertens and loften. *Ciência e Agrotecnologia*, 32(5), 1622-1628.
- Naes, T., Issaksson, T., Fearn, T. y Davies, T. (2002). A user-friendly guide to multivariate calibration and classification. NIR Publications, Chichester, UK.
- Nagaraja, T. y Titgemeyer, E. (2007). Ruminal acidosis in beef cattle: The current microbiological and nutritional outlook. *Journal of Dairy Science*, 90: 17-38.
- Neville, E. W., Fahey, A. G., Gath, V. P., Molloy, B. P., Taylor, S. J., y Mulligan, F. J. (2019). The effect of calcareous marine algae, with or without marine magnesium oxide, and sodium bicarbonate on rumen pH and milk production in mid-lactation dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 102(9), 8027–8039.
- Newbold, C. J., Thomas, P. C. y Chamberlain, D. G. (1988). Effect of dietary supplements of sodium bicarbonate on the utilization of nitrogen in the rumen of sheep receiving a silage-based diet. *The Journal of Agricultural Science*, 110, 383-386.
- Nicholson, J. W. G., Cunningham, H. M. y Friend, D. W. (1963). Effect of adding buffers to all-concentrate rations on feedlot performance of steers, ration digestibility and intra-rumen environment. *Journal Animal Science*, 22:368.
- Nocek, J.E. Braund, J.E. (1985). Effect of feeding frequency on diurnal dry matter consumption, liquid dilution rate, and milk yield in first lactation. *Journal Dairy Science*, 198 (1985), pp. 2238-2247

- NRC. (2000). Nutrient Requirements of Beef Cattle. Seventh Revised Edition: Update 2000. Subcommittee on Beef Cattle Nutrition. Committee on Animal Nutrition, National Research Council. National Academy press. Washington DC.
- Oba, M. and Allen, M. (2005). In vitro Digestibility of Forages. Tri-State Dairy Nutrition Conference. May 2-3:81-91.
- Olivieri, A. C. (2015). Practical guidelines for reporting results in single- and multi-component analytical calibration: A tutorial. *Analytica Chimica Acta*, 868, 10–22.
- Ørskov, E.R. y McDonald, P. (1979). The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal of Agricultural Science* 92:499-503.
- Orskov, E. R., Mayes R. W. y Penn, A. 1971. The capacity for the removal of glucose from the small intestine by mature sheep. *Proc. Nutr. Soc.* 30:43A.
- Osborne, B. G. (2000). Near-Infrared Spectroscopy in Food Analysis. En *Encyclopedia of Analytical Chemistry*.
- Osborne, B. G., Fearn, T. y Hindle, P. (1993). *Practical NIR Spectroscopy with Applications in Food and Beverage Analysis*. Longman Scientific and Technical London, UK.
- Owens, F. N. y Goetsch, A. L. (1993). Fermentación ruminal. En: Church, D.C. *El Rumiante: fisiología digestiva y nutrición*. Editorial Acribia, Zaragoza. España. Cap. 8. p 159-190.
- Owens, F. N., Secrist, D. S., Hill, W. J. y Gill, D. R. (1998). Acidosis in cattle: a review. *Journal of Animal Science*, 76 (1): 275–286.
- Palladino, R. A., Wawrzekiewicz, M., Danelón, J. L., Gaggiotti, M., y Jaurena, G. (2010). In vitro digestion of fresh alfalfa under different conditions of ruminal pH. *Journal of the science of food and agriculture*, 90(4), 574–579
- Park, H. S., Kim, J. H., Choi, K. C. y Kim, H. S. (2016). Mathematical Transformation Influencing Accuracy of Near Infrared Spectroscopy (NIRS) Calibrations for the Prediction of Chemical Composition and Fermentation

- Parameters in Corn Silage. *Journal of The Korean Society of Grassland and Forage Science*, 36(1), 50–57.
- Pedraza Olivera, R.M. (2001). Estimación del valor nutritivo de los alimentos para ruminantes con énfasis en las técnicas in sacco y de producción de gas in vitro. *Revista de Produccion Animal Argentina*, 13:45-51.
- Peyrat, J., Nozière, P., Le Morvan, A., Férard, A., Protin, P. V., & Baumont, R. (2014). Effects of ensiling maize and sample conditioning on in situ rumen degradation of dry matter, starch and fibre. *Animal Feed Science and Technology*, 196, 12–21.
- Philippeau, C., Landry, J. y Michalet-Doreau B. (2000). Influence of the protein distribution of maize endosperm on ruminal starch degradability. *Journal Science Food Agriculture*, 80: 404-408.
- Pordomingo, A. J., J. D. Wallace, A. S. Freeman, M. L. Galyean. 1991. Supplemental corn grain for steers grazing blue grama rangeland during summer. *Journal Animal Science*, 69:1678-1687.
- Pordomingo, A.J. (2013). La ganadería bovina. En: 4° Jornada Nacional de Forrajes Conservados. EEA INTA Manfredi. Pp. 21-24.
- Pordomingo, A. J. (2013). Feedlot. Alimentación, diseño y manejo. EEA “Guillermo Covas” INTA Anguil. Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLPam
- Pordomingo, A.J., Jouli R., Kent F. y Felice G. (2012). Sustitución de silaje por grano de maíz en un engorde a corral. *Revista de Produccion Animal Argentina*, 32: 156.
- Posada, S.L.; Noguera, R.R. (2005). Técnica in vitro de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. *Livestock Research for Rural Development*. Vol. 1, Art. 36.
- Rabotnikof, C. M., Planas, G. M., Colomer, J. S., y Stritzler, N. P. (1995). Near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) for predicting forage quality of perennial warm-season grasses in La Pampa, Argentina. *Annales de Zootechnie*, 44(1), 97–100.

- Rearte D. (2003). El futuro de la ganadería argentina. Publicado en Internet, disponible en [http://ffyl1.uncu.edu.ar/IMG/pdf/REARTE D. El futuro de la ganaderA-a\\_argentina.pdf](http://ffyl1.uncu.edu.ar/IMG/pdf/REARTE_D._El_futuro_de_la_ganaderA-a_argentina.pdf). Activo Agosto 2019.
- Reeves, J. B., Blosser, T. H., y Colenbrander, V. F. (1989). Near Infrared Reflectance Spectroscopy for Analyzing Undried Silage. *Journal of Dairy Science*, 72(1), 79–88.
- Relling, A. y Mattioli, G. (2003). Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata, 74 p.
- Ressia, M. A. (2007). Digestibilidad in vivo de silajes de tres híbridos de sorgo cosechados en inicio de panojamiento y su comparación con estimaciones de métodos indirectos.
- Revilla, G. y Zarra, E. (2008). Fisiología vegetal. Introducción a las células de las plantas: membrana y pared. En: *Fundamentos de fisiología vegetal*. Azcon – Bieto J y M Talón (eds). Ed. UBe. España. Cap.1:3-22 pp.
- Ribeiro S.S., Vasconcelos J.T., Morais M.G., Itavo C.B.C.F., Franco G.L. (2011). Effects of ruminal infusion of a slow-release polymer-coated urea or conventional urea on apparent nutrient digestibility, in situ degradability, and rumen parameters in cattle fed low-quality hay. *Animal Feed Science and Technology*, 164 (1-2) , pp. 53-61
- Robles V., González L.A., Ferret A., Manteca X., Calsamiglia S. (2007). Effects of feeding frequency on intake, ruminal fermentation, and feeding behavior in heifers fed high-concentrate diets. *Journal of Animal Science*. 85:2538–2547.
- Rogers, J.A., Muller, L.D., Davis, C.L., Chalupa, W., Kronfeld, D.S., Karcher, L.F. y Cummings, K.R. (1985). Response of dairy cows to sodium bicarbonate and limestone in early lactation. *Journal of Dairy Science*, 68: 646-660
- Roggo, Y., Chalus, P., Maurer, L., Lema-Martinez, C., Edmond, A., y Jent, N. (2007). A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44(3), 683–700.

- Rooney L.W. & R.L. Pflugfelder. (1986). Factors affecting starch digestibility with special emphasis on sorghum and corn. *Journal Animal Science*, 63: 1607-1623.
- Russell, J. B. (1998). The importance of pH in the regulation of ruminal acetate to propionate ratio and methane production in vitro. *Journal of Dairy Science*, 81, 3222-3230.
- Russell, J. B., y Wilson, D. B. (1996). Why Are Ruminal Cellulolytic Bacteria Unable to Digest Cellulose at Low pH? *Journal of Dairy Science*, 79(8), 1503–1509.
- Russell, J. B., y Dombrowski, D. B. (1980). Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 39:604–610.
- Russell, J. B., y Chow, J. M. (1993). Another theory for the action of ruminal buffer salts: Decreased starch fermentation and propionate production. *Journal of Dairy Science*, 76:826–830.
- Russell, J. B., Muck, R. E., y Weimer, P. J. (2009). Quantitative analysis of cellulose degradation and growth of cellulolytic bacteria in the rumen. *FEMS Microbiology Ecology*, 67(2), 183–197.
- Russell, J.B., Connors, J.D., Fox, D.G, Van Soest, P.J. y Sniffen, C.J. (1992). A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. I. Ruminal fermentation. *Journal of Animal Science* 70:3551-3651.
- Rymer, C.; Huntington, J.A.; Williams, B.A.; Givens, D.I. (2005). In vitro cumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. *Animal Feed Science and Technolgy*, 123-124:9-30.
- Sanderson, M. A., Voigt, P., y Jones, R. M. (1999). Yield and Quality of Warm-Season Grasses in Central Texas. *Journal of Range Management*, 52(2), 145.
- Santini, F.J., Hardie, A.R., Jorgensen, N.A. y Finner M.F. (1983). Proposed use of adjusted intake based on forage particle length for calculation of roughage indexes. *Journal Dairy Science*, 66: 811-820

- Santini, F.J. (2014). Conceptos básicos de la nutrición de rumiantes. En: Nutrición Animal Aplicada. Grupo de Nutrición Animal de la Unidad Integrada Balcarce. INTA EEA Balcarce. 159 p.
- Santini, F.J. y Elizalde, J.C. (1993). Utilización de granos en la alimentación de rumiantes. *Revista Argentina de Producción Animal* 13: 39-60.
- Santra, A., Chaturvedi, O. H., Tripathi, M.K., Kumar, R. y Karim S.A. (2003). Effect of dietary sodium bicarbonate supplementation on fermentation characteristics and ciliate protozoal population in rumen of lambs. *Small Ruminant Research*, 47: 203-212.
- SAS. (2001). SAS/STAT® User's guide. SAS Inst. Inc., Cary, NC.
- Satoshi, K. y Kobayashi, Y. (2009). Fibrolytic Rumen Bacteria: Their Ecology and Functions. *Asian-Aust. Journal Animal Science* 22: 131- 138.
- Satter, L.D y Slyter, L.L. (1974). Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. *British Journal of Nutrition* 32:199-205.
- Sauvant, D., Meschy, F. y Mertens, D.R. (1999). Les composantes de l'acidose ruminale et les effets acidogènes des rations. *INRA Productions Animales* 12:49– 60.
- Savian, T. V. y Muniz, J. A. (2007). A study of in situ degradability: heterogeneity of variances and correlated errors. *Scientia Agricola*, 64(5), 548-554.
- Savitzky A. y Golay, M. J. E. (1964). Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Analitical Chemistry* (36) 1627-1639.
- Schofield, P.; Pitt, R.E.; Pell, A.N. (1994). Kinetics of fiber digestion from in vitro gas production. *Journal Animal Science*, 72:2980-2991.
- Shenk, J. S., Workman, J. J. y Westerhaus, M. O. (1992). Application of NIR Spectroscopy to Agricultural Products. En: *Handbook of near infrared analysis*. Burns, P.A. and Ciurczak, E.W. (eds.). Marcel Dekker, New York, NY, USA. pp. 383-427.
- Shenk, J. S., Workman, J. J., Westerhaus, M. O., Burns, D. A. y Ciurczak, E. W. (2001). Application of NIR Spectroscopy to Agricultural Products. En *Handbook of near-infrared analysis*. M. Dekker.

- Sokal, R.R. y Rohlf, F.J. (1995). Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. Tercera Edición, Freeman & Co., Nueva York, U.S.A.
- Soto-Navarro S.A., Krehbiel C.R., Duff G.C., Galyean M.L., Brown M.S., Steiner R.L. (2000). Influence of feed intake fluctuation and frequency of feeding on nutrient digestion, digesta kinetics, and ruminal fermentation profiles in limited steers. *Journal Animal Science*. 78:2215–2222.
- Southgate, D. A. T.; (1991). Determination of Food Carbohydrates Second Edition; Elsevier Applied Science, London and New York.
- Spada M.C. y Mombelli J.C. (2007). Estudios de la relación entre el contenido de lignina y digestibilidad en sorgos de nervadura marrón. 30º Congreso Argentino de Producción Animal, Santiago del Estero, Argentina.
- Staples C. R. y Lough D. S. (1989). Efficacy of supplemental dietary neutralising agents for lactating dairy cows: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 23: 277-303.
- Stercova, E., Pazout, V., Strakova, E. y Suchy, P. (2005). Effect of intensive fattening of bulls based on a high-grain diet on growth intensity and biochemical and acid-base parameters of blood. *Czech Journal of Animal Science*, 50: 355-361.
- Stone, W.C. (2004). Nutritional approaches to minimize subacute ruminal acidosis and laminitis in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 87: E13-E26.
- Stritzler, N. P. (2008). Producción y calidad nutritiva de especies forrajeras megatérmicas. XXXIº Congreso Argentino de Producción Animal, Potrero de los Funes, San Luis. [http://www.produccion-animal.com.ar/produccion\\_y\\_manejo\\_pasturas/pasturas\\_cultivadas\\_megatermicas/131-Produccion\\_y\\_calidad.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_y_manejo_pasturas/pasturas_cultivadas_megatermicas/131-Produccion_y_calidad.pdf)
- Stritzler, N. P., Rabortnikof, C. M., Ferri, C. M. y Pagella, H. J. (2011). Los forrajes en la alimentación de los rumiantes. En: Cangiano, C.A. y Brizuela, M.A. Producción animal en pastoreo. 2º Ed. Ediciones INTA .512 p.
- Sudweeks, E. M., Ely, L. O., Mertens, D. R. y Sisk, L. R. (1981). Assessing minimum amounts and form of roughages in ruminant diets: roughage value index system. *Journal Animal Science*, 53:1406.

- Sutton, J., Hart, I., Brosters, W., Elliott, R., & Schuller, E. (1986). Feeding frequency for lactating cows: Effects on rumen fermentation and blood metabolites and hormones. *British Journal of Nutrition*, 56(1), 181-192.
- Terashima, N., Fukushima, K., He, L. F. y Takabe, K. (1993). Comprehensive model of the lignified plant cell wall. In: Jung, H.G, Buxton, D.R., Hatfield, R.D. y Ralph, J. Ed. *Forage cell wall structure and digestibility*. ASA-CSSASSA, Madison, WI. pp. 247-270.
- Tessmann, N. J., Radloff, H. D., Kleinmans, J., Dhiman, T. R., y Satter, L. D. (1991). Milk production response to dietary forage:grain ratio. *Journal of Dairy Science*, 74: 2696-2707.
- Theodorou, M.K.; Williams, B.A.; Mcallan, A.B.; France, J. (1994). A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 48:185-197.
- Thomas, M. E., Foster, J. L., McCuiston, K. C., Redmon, L. A., & Jessup, R. W. (2013). Nutritive value, fermentation characteristics, and in situ disappearance kinetics of sorghum silage treated with inoculants. *Journal of Dairy Science*, 96(11), 7120–7131.
- Tilley, J. y Terry, R. (1963). A two stages technique for the in vitro digestion of forages crops. *J. Br. Grassland Soc.* 18:104-111.
- Tonani, F. L., Ruggieri, A. C., Queiroz, A. C., y Andrade, P. (2001). Degradabilidade ruminal in situ da matéria seca e da fibra em detergente neutro em silagens de híbridos de sorgo colhidos em diferentes épocas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, 53(1), 100–104.
- Torrecillas M.G. (2004). El cultivo de sorgo como alternativa para ensilaje. Laboratorio NIRS - Facultad de Ciencias Agrarias – Universidad Nacional de Lomas de Zamora. Publicado en internet, disponible en <http://www.cerealesyforrajes.com.ar/TechNotes/PDF/TechNote04.PDF>. Activo enero 2015.
- Tripathi M. K., Santra A., Chaturvedi O. H., Karim S. A. (2004). Effect of sodium bicarbonate supplementation on ruminal fluid pH, feed intake, nutrient

- utilization and growth of lambs fed high concentrate diets. *Animal Feed Science and Technology* 111: 27–39.
- Trujillo, A.I., Marichal, M. de J., Carriquiry, M. (2010). Comparison of dry matter and neutral detergent fibre degradation of fibrous feedstuffs as determined with in situ and in vitro gravimetric procedures. *Anim. Feed Sci. Technol.* 161, 49–57.
- Valentin, S.F.; Williams, P.E.V.; Forbes, J.M.; Sauvant, D. (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. *Animal Feed Science and Technology*, 78:81-99.
- Van Gelder, A.H.; Hetta, M.; Rodrigues, M.A.M.; De Boever, J.L.; Den Hartigh, H.; Rymer, C.; Van Oostrum, M.; Van Kaathoven, R.; Cone, J.W. (2005). Ranking of in vitro fermentability of 20 feedstuffs with an automated gas production technique: Results of a ring test. *Animal Feed Science and Technology*, 123-124:243-253.
- Van Soest, P. J. (1967). Development of a comprehensive system of feed analyses and its application to forages. *Journal Dairy Science*. 119-128
- Van Soest, P. J. (1993). Cell wall matrix interactions and degradation-Session synopsis. In: Jung, H. G., Buxton, D. R., Hatfield, R. D. y Ralph, J. Ed. *Forage cell wall structure and digestibility*. ASA-CSSASSA, Madison, WI. pp. 377-395
- Van Soest, P. J. (1994). *Nutritional ecology of the ruminant*. 2<sup>a</sup> Ed. Ithaca. Cornell University Press. 476 p.
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B., y Lewis, B. A. (1991). Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74(10), 3583–3597.
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B., Lewis, B.A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74:3583-3597.
- Vanderlip, R. L., y Reeves, H. E. (1972). Growth Stages of Sorghum [*Sorghum bicolor*, (L.) Moench]. *Agronomy Journal*, 64(1), 13.

- Vargas Bayona, J., Mejía Porras, G., Bedoya Mashuth, J., & Gómez Patiño, J. F. (2013). Estimación de la técnica in vitro de gases frente a otras técnicas de digestibilidad. *Spei Domus*, 9(18)
- Vazant, E.S., Cochran, R.C.; Titgemeyer, E.V. (1998). Standardization of in situ techniques for ruminant feedstuff evaluation. *Journal Animal Science*, 76: 2717-2729.
- Wanapat, M., Gunun, P., Anantasook, N. y Kang, S. (2014). Changes of rumen pH, fermentation and microbial population as influenced by different ratios of roughage (rice straw) to concentrate in dairy steers. *Journal of Agricultural Science*, 152(4), 675–685.
- Wang, G., y Yu, H. Q. (2004). Anaerobic degradation of cellulose by rumen microorganisms at various pH values. *Biochemical Engineering Journal*, 21(1): 59–62.
- Weiss, W. P. (1993). Symposium: prevailing concepts in energy utilization by ruminants. Predicting energy values of feeds. *Journal Dairy Science*, 76:1802-1811.
- Williams B A. (2000). Cumulative gas-production techniques for forage evaluation. In: Givens D I, Owen E, Omed H M and Axford R F E (editors). *Forage Evaluation in Ruminant Nutrition*. Wallingford (UK). CAB International. 475 p.
- Wilman, D., Field, M., Lister, S. J., y Givens, D. I. (2000). The use of near infrared spectroscopy to investigate the composition of silages and the rate and extent of cell-wall degradation. *Animal Feed Science and Technology*, 88(3–4), 139–151.
- Wilson J. R. y Hatfield R. D. (1997). Structural and chemical changes of cell wall types during stem development: Consequences for fibre degradation by rumen microflora. *Australian Journal of Agricultural Research*, 48: 165-180.
- Wilson J. R. y Mertens D. R. (1995). Cell Wall accessibility and cell structure limitations to microbial digestión of forage. *Crop Science*, 35: 251-516.
- Wison J. R. (1993). Organization of forage plant tissues. P 1-32. En: *Forage cell wall structure and digestibility*. Jung et al. (eds), ASA, SSA, y SSSA, Madison, WI.

- Workman, L., Weyer, J. y Weyer, L. (2012). Practical Guide and Spectral Atlas for Interpretive Near-Infrared Spectroscopy, Second Edition Spectroscopy.
- Yang, W. Z. y K. A. Beauchemin. (2007). Altering physically effective fiber intake through forage proportion and particle length: Chewing and ruminal pH. *Journal Dairy Science*, 90:2826–2838.
- Yang, W. Z. y K. A. Beauchemin. (2009). Increasing physically effective fiber content of dairy cow diets through forage proportion versus forage chop length: Chewing and ruminal pH. *Journal Dairy Science*, 92:1603–1615.
- Yang C.M., Varga G. (1989). Effect of three concentrate feeding frequencies on rumen protozoa, rumen digest kinetics, and milk yield in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 72:950–957.
- Yáñez-Ruiz, D. R. (2016). Modulación de la fermentación ruminal: Desafíos y oportunidades. II Jornada FEDNA- ANEMBE sobre alimentación de rumiantes. Eds.: P.G<sup>a</sup>. Rebollar, C. de Blas y G.G. Mateos. Pp 47-58
- Zebeli, Q. y Metzler-Zebeli, B. U. (2012). Interplay between rumen digestive disorders and diet-induced inflammation in dairy cattle. *Research in Veterinary Science*, 93: 1099-1108.
- Zebeli, Q., Aschenbach, J. R., Tafaj, M., Boguhn, J., Ametaj, B. N. y Drochner, W. (2012). Invited review: Role of physically effective fiber and estimation of dietary fiber adequacy in high-producing dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 95: 1041-1056.
- Zhang, L., Chung, J., Jiang, Q., Sun, R., Zhang, J., Zhong, Y., y Ren, N. (2017). Characteristics of rumen microorganisms involved in anaerobic degradation of cellulose at various pH values. *RSC Advances*, 7(64), 40303–40310.
- Zinn, R. A. (1991). Comparative feeding value of steam-flaked corn and sorghum in finishing diets supplemented with or without sodium bicarbonate. *Journal Animal Science*, 69:905.
- Zinn, R.A., Borques, J.L., 1993. Influence of sodium bicarbonate and monensin on utilization of a fat-supplemented, high energy growing finishing diet by feedlot steers. *Journal of Animal Science*, 71: 18–25.