

UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE AGRONOMIA

**Evaluación de la cinética degradativa de la
materia seca *in vitro* de tres dietas, de vacas
lecheras.**

Tesis presentada como
requisito para optar al grado
de Licenciado en Agronomía

Gonzalo Mario Andersen Ortiz

VALDIVIA – CHILE

2008

PROFESOR PATROCINANTE

FIRMA

Rubén Pulido F.
Med. Vet., M. Sc., Ph. D.

PROFESORES INFORMANTES

Daniel Alomar C.
Ing. Agr., M. Sc.

René Anrique G.
Ing. Agr., M. Sc., Ph. D.

INSTITUTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL

INDICE DE MATERIAS

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1	Descripción de la producción lechera en la zona sur	4
2.2	Digestión en la vaca lechera	5
2.2.1	Adaptación para utilizar fibra y nitrógeno no proteico	5
2.2.2	Las bacterias del rumen	5
2.3	Composición química del forraje	6
2.3.1	Carbohidratos	6
2.3.1.1	Carbohidratos estructurales (pared celular)	7
2.3.1.1.1	Impacto de la pared celular en el valor nutritivo	8
2.3.1.1.2	Digestión de la pared celular	8
2.3.1.2	Carbohidratos no estructurales CNE	8
2.3.1.2.1	Fructosa	9
2.3.1.2.2	Almidón	9
2.3.2	Proteína	10
2.3.3	Lípidos	11
2.4	Pradera como una fuente nutritiva	12
2.4.1	Limitaciones de la pradera	12
2.4.2	Cambios estacionales de la pradera	13
2.4.3	Contenido de materia seca del forraje	14
2.4.4	Tamaño de partícula y contenido de fibra del forraje	15
2.5	Digestión y fermentación de nutrientes	16
2.5.1	Carbohidratos	16
2.5.2	Proteína	17
2.5.3	Lípidos	18

Capítulo		Página
2.6	Técnicas para medir la digestión y fermentación de los Alimentos	19
2.6.1	<i>In sacco</i>	19
2.6.2	<i>In vitro</i>	20
2.6.2.1	Preparación de las muestras de alimento	20
2.6.2.2	Buffer	20
2.6.2.3	Efecto del gasificado y agente reductor	20
2.6.2.4	Efecto del pH	21
2.6.2.5	Efecto del inóculo ruminal	21
3	MATERIAL Y MÉTODO	23
3.1	Ubicación del ensayo	23
3.2	Etapas y duración del ensayo	23
3.3	Material experimental	24
3.4	Método experimental	26
3.4.1	Preparación de los frascos de incubación	26
3.4.2	Preparación del alimento	26
3.4.3	Experimentación en laboratorio	28
3.4.3.1	Manejo previo a la incubación	28
3.4.3.2	Incubación	29
3.4.4	Muestreos	30
3.4.4.1	Amonio	30
3.4.4.2	Ácidos grasos volátiles	30
3.4.5	Degradabilidad de la materia seca de las dietas	30

Capítulo		Página
3.4.6	Análisis de Ácidos Grasos Volátiles, Amonio y pH para las dietas incubadas	30
3.5	Diseño experimental y análisis estadístico	31
4	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	32
4.1	Composición química y digestibilidad de los alimentos	32
4.2	Degradabilidad de la materia seca	35
4.2.1	Resultados incubación realizada en Chile	35
4.2.2	Resultados incubación realizada en Nueva Zelanda	37
4.3	Variaciones en pH	40
4.3.1	Resultado incubación realizada en Chile	40
4.3.2	Resultado incubación realizada en Nueva Zelanda	41
4.4	Concentraciones de amonio	43
4.5	Producción de ácidos grasos volátiles	45
5	CONCLUSIONES	49
6	RESUMEN	50
	SUMMARY	52
7	BIBLIOGRAFÍA	53
	ANEXOS	64

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Indicadores globales de la importancia de la zona sur en producción de leche (% del total nacional)	4
2	Composición química y digestibilidad de los forrajes utilizados en la incubación in vitro, determinada mediante NIRS (valores expresados base 100% materia seca)	32
3	Composición botánica de la pradera utilizada (%)	34
4	Composición química y digestibilidad de los concentrados utilizados en la incubación in vitro, determinada mediante NIRS (valores expresados base 100% materia seca)	34
5	Producción neta de Ácidos Grasos Volátiles, valores promedios para el muestreo realizado a las 12 horas de incubadas las dietas	47

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Valores promedio del porcentaje de materia seca degradada en un periodo de 24 horas (tres repeticiones para cada tratamiento). Barras representan desviación estándar	36
2	Valores promedio del porcentaje de materia seca degradada en un periodo de 24 horas (tres repeticiones para cada tratamiento). Barras representan desviación estándar	38
3	Variación promedio en pH de cada dieta, para cada hora de muestreo, cuando fueron incubadas por 24 horas (tres repeticiones para cada tratamiento). Barras representan desviación estándar	40
4	Variación promedio en pH de cada dieta, para cada hora de muestreo, cuando fueron incubadas por 24 horas (tres repeticiones para cada tratamiento). Barras representan desviación estándar	41
5	Producción neta de amonio para 4 dietas distintas evaluadas de forma <i>in vitro</i> (tres repeticiones para cada tratamiento). Barras representan desviación estándar	44

Figura**Página**

6	Producción neta total de ácidos grasos volátiles (mg/gMS) de cada dieta, para cada hora de muestreo, cuando fueron incubadas <i>in vitro</i> por 24 horas (tres repeticiones para cada tratamiento)	46
---	---	----

INDICE DE ANEXOS

Anexo		Página
1	Frasco de 50 ml usado en la incubación	64
2	Máquina para moler marca Kenwood	64
3	Frascos al interior de la incubadora	65
4	Sobrenadante obtenido después de centrifugar	65
5	Filtrado para determinar degradación de la MS	66
6	Medición de pH	66
7	Cinética degradativa de la materia seca (promedio y desviación estándar) de tres dietas distintas incubadas de forma <i>in vitro</i> en el tiempo (% MS degradada). Incubaciones realizadas en Chile	67
8	Cinética degradativa de la materia seca (promedio y desviación estándar) de cuatro dietas distintas incubadas de forma <i>in vitro</i> en el tiempo (% MS degradada). Incubaciones realizadas en Nueva Zelanda	68

Anexo		Página
9	Cinética degradativa de la materia seca, valores promedios para 4 dietas distintas incubadas de forma <i>in vitro</i> . Nueva Zelandia	69
10	Variación de pH (promedio y desviación estándar) de tres dietas distintas incubadas de forma <i>in vitro</i> en el tiempo. Incubación realizada en Chile	70
11	Variación de pH (promedio y desviación estándar) de cuatro dietas distintas incubadas de forma <i>in vitro</i> en el tiempo. Incubación realizada en Nueva Zelandia	71
12	Variación de pH promedio para 4 dietas distintas incubadas de forma <i>in vitro</i>	72
13	Producción neta de Amonio, valores promedios para 4 dietas distintas incubadas de forma <i>in vitro</i>	73
14	Producción de ácidos grasos volátiles (mg/gMS). Valores promedios para las 12 horas de incubación	74
15	Producción neta total de ácido acético (mg/gMS) producida cuando 4 dietas distintas fueron evaluadas de forma <i>in vitro</i>	74

Anexo		Página
16	Producción neta total de ácido propiónico (mg/gMS) producida cuando 4 dietas distintas fueron evaluadas de forma <i>in vitro</i>	75
17	Producción neta total de ácido butírico (mg/gMS) producida cuando 4 dietas distintas fueron evaluadas de forma <i>in vitro</i>	75
18	Producción neta total de ácidos grasos menores (mg/gMS) producida cuando 4 dietas distintas fueron evaluadas de forma <i>in vitro</i>	76
19	Producción neta total de ácidos grasos volátiles (mg/gMS) después de 6, 12 y 24 horas (h) y tasas de producción (mg/gMS/h) entre 0 – 6 h, 6 – 12 h, 12 – 24 h y 0 – 24 h.	76

1 INTRODUCCIÓN

La mayor masa productora lechera del país se encuentra en el sur de Chile, principalmente en la Décima y Décima Cuarta regiones, la cual, desde el punto de vista alimentario se basa fundamentalmente en el pastoreo de praderas permanentes.

A medida que los sistemas productivos se vuelven más intensivos y producto de la continua variabilidad en calidad y cantidad productiva de las praderas a lo largo del año, con una baja disponibilidad en los meses de invierno y una madurez en los meses de verano, a menudo no se logran satisfacer los requerimientos nutritivos de animales productivos, teniendo que ser ellos suplementados, ya sea con alimentos voluminosos o concentrados.

El bajo consumo de materia seca de forraje y por lo tanto, la baja disponibilidad de energía y proteína limitan la producción de leche en sistemas a pastoreo, por lo que se requiere de suplementación para sobre llevar estas limitaciones.

Debido a que el precio del kilo de materia seca de pradera es menor al del alimento concentrado, el uso de éste debe ser racional, tratando de sacar el máximo provecho del suplemento.

Es sabido que existe una relación entre los resultados obtenidos en investigaciones realizadas *in vivo* y los resultados obtenidos *in vitro*, resultando este último un método adecuado para evaluar dietas.

La utilización de un método de evaluación *in vitro* nos permite obtener en forma rápida y con un número de recursos limitados, respuesta a la interrogante sobre la cinética degradativa, capacidad fermentativa y producción de desechos de la fermentación, de una dieta, permitiendo diseñar su uso más adecuado para un sistema productivo.

Los productos finales de la degradación de los carbohidratos en el rumen son ácidos grasos volátiles de cadena corta, siendo el ácido acético, propiónico y butírico los más importantes. Se sabe que existe una relación entre la degradabilidad de un alimento y la proporción de ácidos grasos volátiles producidos. La evaluación del nitrógeno amoniacal en los rumiantes es importante al idear estrategias de alimentación, que permiten evaluar la sincronización de los carbohidratos y del nitrógeno fermentable en el rumen.

La hipótesis que se planteó en este trabajo es: “La inclusión de concentrados (fibroso y amiláceo) en dietas basadas en forraje para vacas lecheras, aumentará la degradabilidad de la materia seca y la producción de ácidos grasos volátiles y reducirá la concentración de amonio en el líquido ruminal”.

El objetivo de esta investigación fue: “Evaluar *in vitro* la cinética de la degradación de la materia seca, la producción de ácidos grasos volátiles y de amonio, en dietas basadas en pradera, suplementadas con un concentrado fibroso o uno amiláceo”.

Objetivos Específicos.

- Evaluar las características degradativas de la materia seca, de las dietas; solo pradera, pradera más concentrado fibroso, pradera más concentrado amiláceo.

- Determinar la producción de ácidos grasos volátiles y las concentraciones de amonio ruminal de las dietas; solo pradera, pradera más concentrado fibroso, pradera más concentrado amiláceo.

2 REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 Descripción de la producción lechera en la zona sur

La zona sur es el área de mayor importancia en cuanto a producción láctea, concentrando el 77% de la producción nacional, generada por el 88% de los productores del país (ANRIQUE, 1999). En el Cuadro 1 se aprecia la relevancia de dicha zona dentro del territorio nacional respecto a este rubro pecuario, el cual, según RUIZ (1997) y KLEIN (1998), se ha transformado en un proceso productivo cada vez más intensivo y competitivo.

CUADRO 1 Indicadores globales de la importancia de la zona sur en producción de leche (% del total nacional).

	X y XIII Región	IX Región	Total zona sur
Productores	81	7	88
Vacas	62	12	74
Producción	64	13	77
Superficie	67	13	80

FUENTE: ANRIQUE (1999).

Debido a las condiciones climáticas imperantes en la zona sur de Chile, existe una marcada estacionalidad en la producción de las praderas permanentes, donde la mayor cantidad de forraje se obtiene en primavera, representando hasta un 50-60% del total anual (BALOCCHI, 1999).

En la zona sur, las explotaciones lecheras basan la alimentación del ganado en el pastoreo directo de la pradera, debido a que esta metodología representa el costo más barato de alimentar a las vacas, indistinto de su nivel productivo (PULIDO *et al.*, 1999).

2.2 Digestión en la vaca lechera

La vaca lechera y otros animales como ovejas son herbívoros y sus dietas están compuestas principalmente de materia vegetal. Los rumiantes son fácilmente identificados porque mastican la comida mucho aún cuando no ingieren alimentos. Esta acción de masticación se llama rumia y es parte del proceso que permite al rumiante obtener energía de las paredes de las células de las plantas, también llamada fibra (WATTIAUX Y ARMENTANO 2003).

2.2.1 Adaptación para utilizar fibra y nitrógeno no proteico. La fibra es la estructura que da fuerza y rigidez a las plantas y es el componente principal de los tallos de gramíneas y otras plantas. Los azúcares complejos (celulosa y hemicelulosa) se encuentran encerrados en las paredes de las células e inaccesibles para animales no-rumiantes. Sin embargo, la población de microbios que vive en el retículo y el rumen permite a la vaca obtener energía de la fibra. Compuestos de nitrógeno no proteico (NNP) no pueden ser utilizados por los animales no-rumiantes, pero las bacterias del rumen los utilizan como precursores para la síntesis de proteína. La vaca se beneficia de los aminoácidos de la proteína bacteriana producida de las sustancias de nitrógeno en los alimentos (WATTIAUX Y ARMENTANO 2003).

2.2.2 Las bacterias del rumen. El rumen provee un ambiente apropiado, con un suministro generoso de alimentos, para el crecimiento y reproducción de los microbios. La ausencia de aire (oxígeno) en el rumen favorece el crecimiento de especies de bacteria, entre ellos las que pueden digerir las paredes de las células de plantas (celulosa) para producir azúcares sencillos (glucosa). Los microbios fermentan glucosa para obtener la energía para crecer y ellos producen ácidos grasos volátiles (AGV) como los productos finales de fermentación. Los AGV

cruzan las paredes del rumen y sirven como fuentes de energía para la vaca (TERRY, 2003).

Mientras que crecen los microbios del rumen, producen aminoácidos, las piedras fundamentales para proteínas. Las bacterias pueden utilizar amoníaco o urea como fuentes de nitrógeno para producir aminoácidos. Sin la conversión bacteriana, el amoníaco y la urea son inútiles para la vaca. Sin embargo, las proteínas bacterianas producidas en el rumen son digeridas en el intestino delgado y constituyen la fuente principal de aminoácidos para la vaca (TERRY, 2003).

2.3 Composición química del forraje

2.3.1 Carbohidratos. Los carbohidratos son el mayor componente del tejido de la planta aportando con un 50 – 80% de la materia seca del forraje (MOORE y HATFIELD, 1994; VAN SOEST, 1994), los carbohidratos son la fuente más importante de energía en la dieta de los rumiantes y los principales precursores de grasa y azúcar (lactosa) en la leche de la vaca (WATTIAUX y ARMENTANO, 2003). Los carbohidratos que son digeridos rápidamente son clasificados como carbohidratos no estructurales, ellos pueden ser solubles en agua, por lo tanto son a veces denominados carbohidratos solubles. Sin embargo, las pectinas también son digeridas rápidamente pero son clasificadas como carbohidratos estructurales (SMITH, 1973). Carbohidratos no fibrosos es otro término utilizado por nutricionistas y éste incluye a los carbohidratos no estructurales más las pectinas, mientras que los carbohidratos fibrosos son la hemicelulosa, la celulosa y la lignina del alimento (MOORE y HATFIELD, 1994).

Los microorganismos en el rumen permiten a la vaca obtener energía de los carbohidratos fibrosos. La fibra es voluminosa y se retiene en el rumen donde la celulosa y la hemicelulosa fermentan lentamente. Los carbohidratos no-fibrosos (almidones y azúcares) fermentan rápidamente en el rumen. Éstos

incrementan la densidad de energía en la dieta mejorando el suministro de energía y determinando la cantidad de proteína bacteriana producida en el rumen. Sin embargo, los carbohidratos no-fibrosos no estimulan la rumia o la producción de saliva y cuando se encuentran en exceso pueden inhibir la fermentación de fibra. En consecuencia, el equilibrio entre carbohidratos fibrosos y no-fibrosos es importante al alimentar las vacas lecheras para la producción eficiente de leche (WATTIAUX y ARMENTANO, 2003).

2.3.1.1 Carbohidratos estructurales (pared celular). Los carbohidratos estructurales conforman la pared celular de la planta y están compuestos por hemicelulosa, celulosa y pectina, unidos por lignina y una baja concentración de nitrógeno (WILSON, 1994). Éstos son insolubles y proveen a la planta soporte estructural y protección para asegurar su supervivencia. La tasa de digestión para estos carbohidratos es bien amplia, cuando la digestión de los carbohidratos es lenta el consumo de alimento es limitado (BUXTON *et al.*, 1996). Proteína cruda (PC), fibra de detergente ácido (FDA) y fibra de detergente neutro (FDN) son las mediciones más comunes para determinar fibra utilizada en los análisis de alimento rutinario. La fibra es importante para la funcionalidad del rumen, ésta estimula la rumia y la producción de saliva (VAN SOEST *et al.*, 1991). Esto es importante en sistemas donde se alimenta el ganado con una mezcla de raciones en donde el consumo de fibra es menor que cuando se alimenta con dietas a base de pradera. Existen situaciones en donde la fibra, en dietas basadas a pradera (principalmente praderas de primavera) no es efectiva para una adecuada salivación, lo cual no produce un adecuado ambiente en el rumen para una digestión óptima (WAGHORN, 2002). Un 34 – 40% de FDN, en praderas primaverales de alta calidad, es relacionado con un pH ruminal de 6,0 a 6,1, los cuales son valores adecuados para una óptima digestibilidad. Si el contenido de FDN en pasturas de primavera es menor al 34% el pH ruminal es probable que sea menor a 6,0 y si la FDN es

mayor a 34%, el contenido de fibra resultará ser más que suficiente para mantener el pH y altos niveles de digestibilidad (DE VETH y KOLVER, 2001).

2.3.1.1.1 Impacto de la pared celular en el valor nutritivo. El contenido de la pared celular en forrajes varía según especies, componentes de la planta, madurez de la planta y ambiente (WILSON, 1994). Morfología de la planta y cambios en el tejido explican diferencias en la digestibilidad y rompimiento de partículas. Los tejidos de las plantas son colonizados y degradados a diferentes velocidades por los microbios ruminales (AKIN, 1989). Las diferentes proporciones de células en las plantas presentan una alta correlación con la digestibilidad y el valor nutritivo de diferentes plantas (WILSON y HATTERSLEY, 1989).

2.3.1.1.2 Digestión de la pared celular. Ambos, lignina y ceras cuticulares afectan la digestión impidiendo el acceso microbial y enzimático al componente digestible (WILSON y KENNEDY, 1996). La degradación del tejido lignificado se lleva a cabo desde el interior de la célula, porque los microbios no pueden penetrar la pared primaria, por eso los microbios deben entrar al interior de las células de la planta a través de estomas, fracturas en la cutícula o a través de cortes de la superficie (WILSON, 1993). La dura epidermis de las hojas es una barrera efectiva para la digestión, la digestión puede ser más rápida incrementándose el número de cortes y rupturas de la superficie de la cutícula (MONSON y BURTON, 1972).

2.3.1.2 Carbohidratos no estructurales CNE. Azúcares, almidones, ácidos orgánicos y otras reservas de carbohidratos forman parte de estos carbohidratos. Los carbohidratos no estructurales, en relación a la pared celular, se presentan en menor porcentaje tanto en leguminosas como en gramíneas, en contraste con los cereales y cosechas de raíces en donde llegan a un 50 – 90% del total contenido de carbohidratos. Carbohidratos no estructurales en

ensilaje de maíz, granos y subproductos de semillas son mayoritariamente almidón, mientras que fructosa y sacarosa son el mayor componente de CNE en pastos. Las leguminosas presentan una mayor concentración de sacarosa y otros azúcares solubles que las gramíneas (MOORE y HATFIELD, 1994).

2.3.1.2.1 Fructosa. Los fructanos constituyen un grupo de polisacáridos de reserva presentes en algunas especies vegetales. Se ha estimado que los fructanos podrían estar presentes en aproximadamente un 12% de las especies de plantas vasculares.

Dentro de cada planta individual, los fructanos se localizan en la vacuola donde se acumulan, llegando a constituir más del 70% del peso seco de órganos específicos. Esta acumulación en tejidos vegetativos está típicamente asociada a procesos de perennación, por ejemplo en los tubérculos de topinambur, pero también se produce en tallos y semillas de gramíneas.

Es incuestionable que la función primordial de los fructanos es actuar como carbohidratos de reserva. Azúcares solubles (sacarosa, glucosa, fructosa y maltosa) se encuentran presentes en mayores cantidades en leguminosas y no tanto en gramíneas. Todos los carbohidratos no estructurales son degradados rápidamente por los microorganismos del rumen (VAN SOEST, 1994).

2.3.1.2.2 Almidón. Almidón es el carbohidrato más importante en grano de cereales, semillas y tubérculos. El almidón es un componente menor de las hojas y tallos de leguminosas y gramíneas (< 1% de la materia seca). Una pequeña cantidad es almacenada en la semilla de gramíneas, mientras que en la mayoría de las leguminosas el almidón es acumulado en las raíces; en el caso del trébol blanco, el almidón es almacenado en los estolones (MOORE y HATFIELD, 1994). La amilopectina comprende alrededor del 75% del total del

almidón en pastos (MCLLROY, 1967), mientras que amilasa es predominante en el maíz y sorgo (BAILEY, 1973).

El almidón conforma entre un 50% – 100% de los carbohidratos no estructurales en la mayoría de los granos y semillas, esto puede traer un efecto negativo en la producción ruminal si la concentración de carbohidratos no estructurales excede los 30% – 40% de materia seca en la dieta (NOCEK, 1997). El almidón, en la mayoría de los granos de cereales, (cebada, trigo, avena) es fermentado rápidamente en el rumen, pero en el caso del maíz, un 40% del almidón escapa a la fermentación en el rumen y es luego digerido en forma post ruminal (OWENS *et al.*, 1986).

2.3.2 Proteína. Las proteínas en la planta permiten la fotosíntesis y la utilización de la energía para crecimiento y reproducción. El nitrógeno en forraje fresco alcanza entre un 70% a un 90% de proteína verdadera y un 10 – 30% de nitrógeno no proteico, pero la proporción de proteína nitrogenada, nitrógeno no proteico y la degradabilidad ruminal de la proteína nitrogenada varía con el tipo de alimento. Ensilajes y forrajes inmaduros tiene una mayor proporción de nitrógeno no proteico. La proporción de nitrógeno no proteico es menor al 12% del total de nitrógeno en la mayoría de los gases (VAN SOEST, 1994).

Las diferentes proporciones de proteína no nitrogenada y la fracción proteica en las plantas afectan el grado de degradación ruminal de la proteína de la planta, la proteína proveniente de forraje fresco es degradada más rápido que la proteína de forraje seco. Rangos de degradación de proteína han sido estudiados y medidos utilizando técnicas *in sacco* e *in vitro*. Proteína proveniente de las hojas de leguminosa es 45% – 50% soluble y es degradada a una tasa de un 15% – 20% por hora, mientras que la proveniente de gramíneas es soluble un 35% - 45% y degradada a una tasa del 6% – 11% por hora (HOFFMAN *et al.*, 1993). La maduración reduce la solubilidad de la

proteína y la tasa degradativa de ésta, siempre manteniéndose la diferencia entre leguminosas y gramíneas. Aplicaciones de fertilizante nitrogenado en la dieta aumentan la solubilidad de la proteína y su tasa de degradación. Resultados obtenidos de forma in sacco sobre tasas degradativas de proteína en forrajes frescos son comparables con información obtenida de forma in vitro (VAN VURREN, 1990).

2.3.3 Lípidos. Las dietas para rumiantes generalmente contienen entre el 2% y 5% de lípidos totales, de los cuales la mitad son ácidos grasos. Lípidos superficiales son mayoritariamente ceras y ácidos grasos indigestibles. Lípidos almacenados en frutas y semillas son predominantemente triglicéridos, y la diversidad de lípidos afecta su disponibilidad y absorción durante la digestión. La presencia de grasa en la dieta reduce la habilidad de la bacteria del rumen para digerir la fibra, cuando la concentración de grasa en la dieta excede entre el 5% y 7% de la materia seca, la digestión de la fibra se ve reducida (MCDONALD *et al.*, 1995).

2.4 Pradera como una fuente nutritiva

2.4.1 Limitaciones de la pradera. La pradera como fuente nutritiva para la industria lechera resulta ser la fuente nutritiva de menor costo a la cual se puede acceder, sin embargo la pradera en algunas épocas del año presenta limitaciones para la producción animal. Las principales limitaciones en dietas basadas en pradera son (BURKE, 2004):

1. Baja concentración de energía y digestibilidad limitada.
2. Bajo contenido de materia seca y excesiva fibra (en ballica), lo que puede transformarse en una lenta digestibilidad, produciéndose una baja en el consumo.
3. Baja concentración de carbohidratos fermentables rápidamente (azúcares solubles, ácidos orgánicos y pectina).
4. Alta concentración de proteína cruda y proteína degradable, lo que requiere que el exceso de amonio (NH_3) sea eliminado con consecuencias metabólicas.
5. Cantidades y proporciones de ácidos grasos volátiles aumentando producto de la fermentación, lo cual puede ser no óptimo para la producción de leche.
6. Deficiencia de minerales, exceso de potasio y la incidencia de toxinas endófitas también pueden limitar la producción animal.

2.4.2 Cambios estacionales de la pradera. Los cambios estacionales en digestibilidad de la pradera y la composición del alimento, pueden aumentar o llevar más lejos las limitaciones que ésta presenta. Algunos estudios han intentado identificar los cambios estacionales, en composición nutricional de la pradera (MOLLER *et al.*, 1996).

La composición nutricional de la pradera es extremadamente variable, con grandes variaciones durante un año y entre años.

Las praderas de primavera presentan una baja concentración de fibra (40% – 45% FDN), alta digestibilidad (80% – 85%) y alto contenido de energía metabolizable (11,5 – 12,0 MJ/kg MS). Altas cantidades de proteína cruda, con una alta degradabilidad en el rumen, resultan en una alta concentración de NH₃ absorbida al torrente sanguíneo (WAGHORN, 1994). Según Beever (1993), los animales desvían parte de la energía destinada a producción y la utilizan para remover el exceso de NH₃, como urea.

Las praderas de primavera contienen entre un 12% y 16% de materia seca, por lo tanto grandes cantidades deben ser consumidas para alcanzar los requerimientos de energía. La energía es frecuentemente el primer nutriente limitante en una dieta basada en pradera, esto asociado al bajo contenido de materia seca y altas concentraciones de fibra lentamente degradable en ballicas, el animal se ve incapacitado de consumir suficiente alimento para alcanzar los requerimientos nutricionales para obtener una alta producción (KOLVER y MULLER, 1998). La maduración de la ballica durante el final de la primavera reduce la cantidad de alimento y el consumo nutritivo, lo que se ve demostrado por una rápida baja en la producción de leche, lo cual es característico en sistemas basados en pastoreo. En contraste a esto, praderas de verano son más maduras y la proporción de semilla, tallo y hojas muertas aumenta en relación a las hojas (WAGHORN, 1987). Aumento en la

concentración de fibra detergente neutro (45% – 55% MS), y bajas en la concentración de proteína cruda (< 20% MS), digestibilidad (< 70%) y energía metabolizable (< 10,5 MJ/kg MS) son las características más obvias de un cambio en la calidad del forraje (WILSON y MOLLER, 1993).

Cháves *et al.* (2002), han descrito la relación entre ballica y madurez. Señalan que en la ballica madura, la concentración de fibra detergente neutro aumenta y la digestibilidad de la materia orgánica se reduce, la concentración de proteína cruda disminuye, lo que en consecuencia trae una reducción en la concentración de NH₃, medido de forma *in vitro*. La lenta digestibilidad de la fibra y el bajo contenido de proteína cruda del pasto maduro limitarán las entradas de energía y proteína, por eso la producción del animal se verá afectada.

Praderas de otoño son de similar calidad que las de primavera, con altas concentraciones de proteína cruda. La concentración de fibra es generalmente mayor en otoño que en primavera y la disponibilidad de alimento es insuficiente, por lo tanto, la suplementación es crucial para mantener una producción (WILSON y MOLLER, 1993).

2.4.3 Contenido de materia seca del forraje. El forraje es extremadamente húmedo, con contenidos de agua que varían desde un 90% en primavera hasta un 70% – 80% en verano. Es sabido que el contenido de agua es un factor limitante en el consumo de nutrientes del forraje (JOHN y ULYATT, 1987). Verite y Journet (1970) encontraron que el contenido de agua en forrajes puede disminuir el consumo de éste, por cada incremento del 1% en el contenido de agua del forraje, con un contenido alrededor del 81,9%, el consumo voluntario en vacas lactantes decrece en 0,34 kg materia seca. A mayor contenido de agua del forraje, se limita el consumo producto del volumen de material que el animal físicamente debe consumir para comer la misma cantidad de materia

seca que un rumiante alimentado con una dieta seca, picada, molida y peletizada (ULYATT y WAGHORN, 1993).

2.4.4 Tamaño de partícula y contenido de fibra del forraje. El tamaño límite de partícula, capaz de pasar a través del rumen en oveja y vaca, es aquel con un tamaño de 1 y 2 mm respectivamente. Partículas más grandes necesitan ser regurgitadas y disminuidas en tamaño mediante la rumia (ULYATT, 1983).

La diferencia en el contenido de fibra y tamaño de partícula entre forrajes (gramíneas vs. leguminosas) y dietas (base forraje vs. ración completa) afectan el rompimiento de partículas, tasa de pasaje y consumo de alimento (WAGHORN, 2002). En una comparación hecha entre ballica y alfalfa, la masticación durante el consumo, reduce un 61% de la materia seca de la alfalfa y un 46% de la materia seca de la ballica a un tamaño óptimo de 2 mm (WAGHORN *et al.*, 1989).

Comparando dietas, raciones completas tienen una diferente composición nutricional y tamaño de partícula, a diferencia del forraje. Al momento de entregar el alimento al ganado, el tamaño de partículas de raciones completas es más corto que el del forraje o pradera, producto del proceso previo a ser ofrecido el alimento (WAGHORN, 2002). En consecuencia, la diferencia que presentan dietas a base de ballica y dietas en base a ración completa con respecto a la composición nutricional, tamaño de partícula y contenido de materia seca, afectan la digestión, fermentación, tasa de pasaje y consumo, lo cual conlleva a una baja en la producción de la vaca.

2.5 Digestión y fermentación de nutrientes

Alimentos y sus componentes son expuestos a degradación y digestión en el rumen antes que los residuos pasen al intestino delgado. Los constituyentes de la dieta (ballica, ensilaje de maíz, trébol blanco, etc.) y sus componentes (pared celular, carbohidratos no estructurales, proteína cruda, lípidos) son degradados por la microflora del rumen.

2.5.1 Carbohidratos. Carbohidratos estructurales y no estructurales son digeridos para producir ácidos grasos volátiles, los cuales son responsables del mayor desaparecimiento o consumo de energía desde el rumen (SUTTON, 1972). Los carbohidratos estructurales son la fuente energética de mayor importancia, esto al ser comparados con los no estructurales y pectinas, pero son fermentados de forma lenta en relación a los no estructurales. Una mayor proporción de almidón de maíz es soluble (20% – 50% carbohidratos no estructurales) y tasa de degradación de un 4% – 30%/h en comparación con la fibra de detergente neutro en forrajes perennes la cual fue menos soluble (0 – 30% FDN) y con una tasa de 2% – 15%/h (HOFFMAN *et al.*, 1993). Los carbohidratos deben ser degradados en azúcares simples (glucosa, fructosa y pentosa) por las enzimas microbiales para luego ser absorbidos y metabolizados por los microorganismos del rumen, y así resultar producto de esto, ácidos grasos volátiles y energía (ATP). La energía es utilizada para mantenimiento y crecimiento de la población microbial. La sacarosa y fructosa son fermentadas más rápido, seguidas por el almidón, y luego los carbohidratos de la pared celular. La digestión de la pared celular es dependiente de la ruptura física de ésta, permitiendo el acceso de las bacterias para que éstas puedan digerir los constituyentes, especialmente en tejidos lignificados (LASSITER y EDWARDS, 1982).

Producto de la fermentación de los carbohidratos, se obtienen los principales ácidos grasos volátiles (AGV) que son: Acético, propiónico y butírico. El contenido ruminal de animales alimentados en base a forraje, presenta las siguientes proporciones de AGV: 60 – 72% acético, 15 – 23% propiónico, 12 – 18% butírico; y una concentración de AGV totales de 50 – 150 mmol/L (HOLMES et al., 2002). La maduración del forraje aumenta la producción de ácido acético a expensas del propiónico, mientras que una alta proporción de carbohidratos no estructurales resultan en una mayor proporción de ácido propiónico y ácido láctico. La producción de ácido butírico puede aumentar cuando algunos concentrados son ofrecidos, debido a una alta población de protozoos, pero el mayor efecto que producen los concentrados es aumentar la proporción de propiónico y ácido láctico (BERGMAN, 1990). El almidón es degradado por la α – amilasa a dextrosa para luego ser fermentada a glucosa. Pequeños granos pueden fácilmente escapar la digestión en el rumen, lo cual es un desperdicio, por lo tanto es recomendable procesar el grano para asegurar un alto grado de utilización. Sin embargo el bajo pH del rumen, asociado a estos alimentos, puede reducir el número de bacterias que digieren la fibra, resultando una baja relación acetato:propionato y una acidosis producto de la formación de ácido láctico (MCDONALD *et al.*, 1995).

2.5.2 Proteína. Cuando el forraje fresco es ofrecido, 65% - 75% de proteína verdadera es degradado a peptinas, amino ácido y amoniac (NH₃), mientras que la proteína no degradada pasa al intestino delgado para ser digerida y absorbida. Los microbios del rumen utilizan NH₃, pectina y amino ácidos para sintetizar la proteína microbial, la cual pasa al abomaso e intestino delgado para ser digerida y absorbida por el animal (MINSON, 1990). Cuando la degradación de la proteína a NH₃ excede lo necesario para la síntesis de proteína microbial, ocurre una absorción substancial (alrededor del 25% - 40% del nitrógeno ingerido). La urea sintetizada en el hígado puede ser reciclada como saliva, pero la mayoría es excretada como orina (LENG y NOLAN, 1984). La urea

sintetizada por un exceso de NH_3 representa un costo para el proceso en términos energéticos y de amino ácidos (BALDWIN, 1995). El costo de convertir amonio a urea en exceso en combinación con una baja disponibilidad de carbohidratos y con praderas de alto contenido de proteína cruda, puede disminuir el potencial productivo en 11 litros por vaca al día, si el contenido de proteína cruda de la ballica sube de un 20% a un 35% (LEAN *et al.*, 1996). Infusiones de amonio (como bicarbonato de amonio) fueron dadas a ovejas en lactancia, resultando en una disminución en la producción de leche de un 15% (MALIK *et al.*, 1990).

El nitrógeno no amoniacal, absorbido desde el intestino, es compuesto por proteína de la planta no degradada, proteína cruda microbial y nitrógeno no amoniacal endógeno. Aproximadamente el 80% del nitrógeno no amoniacal que entra al intestino delgado es proteína verdadera y lo que queda es ácido nucleico. Cualquier proteína cruda que entre al intestino grueso puede ser fermentada a AGV o simplemente excretada en las fecas.

2.5.3 Lípidos. Los lípidos son una parte pequeña en la dieta de los animales. Ellos son hidrolizados por lipasas bacterianas o protozoos. Los microbios del rumen son incapaces de metabolizar los ácidos grasos (VAN SOEST, 1994).

Las porciones de glicerol y galactosa de los lípidos de la planta son fermentados por los microbios a AGV, mientras que los ácidos grasos, linoléico (18:2) y linolénico (18:3) insaturados, son hidrogenados a ácido esteárico (C18:0) (DRACKLEY, 2000). La mayoría de los lípidos que entran al intestino son ácidos grasos saturados. La carne y leche contienen relativamente más ácidos grasos saturados que la dieta que las vacas consumen, producto del proceso de hidrogenación.

2.6 Técnicas para medir la digestión y fermentación de los alimentos

Existen muchos métodos disponibles para predecir el valor nutritivo de los alimentos, cada uno con sus ventajas y desventajas (MCDONALD *et al.*, 1999). Sistemas convencionales para estimar digestibilidad son costosos y laboriosos, por lo tanto existen dos procesos para determinar la cinética de la digestión, incubando de forma *in vitro* forraje fresco (con inóculo ruminal) y de forma *in sacco* (forraje introducido en bolsas porosas en el rumen) (CHURCH *et al.*, 2002). Estos dos procedimientos permiten evaluar la digestión en términos de dos productos de la digestión *in vitro* (amonio y ácidos grasos volátiles) y rangos de desaparición de materia seca (MCDONALD *et al.*, 1999). En combinación, estos métodos entregan buena información acerca de la cinética de la digestión y del valor nutritivo de los alimentos (BURKE *et al.*, 2000).

Experimentos *in vivo*, involucran la colección de fecas y orina en animales alimentados con cantidades medidas de alimento, por un periodo, generalmente, de 7 a 10 días para así calcular el coeficiente de digestibilidad del alimento (MCDONALD *et al.*, 1999).

2.6.1 *In sacco*. El método *in sacco* o *in situ* mide la tasa a que los alimentos son degradados en el rumen, colocando pequeñas cantidades de alimento en bolsas indegradables y con poros, las cuales son suspendidas en el rumen del animal. Esta técnica es usada para caracterizar la digestibilidad de la materia seca en el rumen y fracciones de nutrientes tales como N y fibra. Valores sobre digestibilidad de los forrajes obtenidos de forma *in sacco* presentan una alta correlación con valores obtenidos de forma *in vivo* (HUNTINGTON y GIVENS, 1995).

2.6.2 *in vitro*. Tempranamente, las técnicas *in vitro* eran utilizadas solamente para medir la desaparición de la materia seca de un alimento incubando en presencia de contenido ruminal y un buffer en un medio anaeróbico, pero los principios pueden también ser aplicados para medir la digestión de nutrientes y fermentación. Debido al desarrollo de un apropiado buffer, basado en la composición mineral de la saliva de ovinos, se ha permitido extender las incubaciones en el tiempo. (MCDUGALL, 1948). Según Johnson (1963) existen distintos métodos de incubación, pero todos deben cumplir con el siguiente criterio:

1. La mantención de una población microbial normal
2. La mantención de una tasa de digestión normal
3. La habilidad de predecir resultados *in vivo*

2.6.2.1 Preparación de las muestras de alimento. Las indicaciones para preparar el alimento son similares a las utilizadas en el método *in sacco*, es decir secado por liofilización y molido son los métodos más comúnmente utilizados, pero el picado del alimento, en vez del molido, parece ser más apropiado para trabajar con muestras de forraje fresco (BARRELL *et al.*, 2000).

2.6.2.2 Buffer. El buffer debería mantener el pH en condiciones similares al animal. El buffer que ha sido calentado y gasificado es adherido al sustrato (también calentado y gasificado), al agente reductor y licor ruminal.

2.6.2.3 Efecto del gasificado y agente reductor. Grant y Mertens (1992) recomiendan que en un método *in vitro* para medir la cinética degradativa se realice un continuo gasificado con dióxido de carbono para asegurar y mantener un ambiente anaeróbico y maximizar los rangos de digestión de la fibra de

detergente neutro. La adición de un agente reductor, reduce la variación entre réplicas y maximiza los rangos de fermentación y degradación.

2.6.2.4 Efecto del pH. Idealmente el pH se debería mantener entre un 6,5 a un 6,8 para que los microbios del rumen maximicen la digestión de la fibra, pero la producción de AGV reduce éste. El pH típico para vacas alimentadas con un forraje de alta calidad está entre el 5,8 y 6,4, lo cual puede ser sub óptimo para la digestión de la fibra (Stewart, 1977). Es importante utilizar cantidades correctas de sustrato para que el pH no se vea reducido a niveles no realistas. Una reducción del pH por debajo del crítico puede traer negativas consecuencias para las bacterias y la digestión de la fibra. Para pradera éste es aproximadamente de 5,8 y para forraje conservado y dietas de concentrado es de 6,0 a 6,2.

2.6.2.5 Efecto del inóculo ruminal. El inóculo ruminal puede ser preparado sacando contenido ruminal desde una vaca fistulada, homogeneizado, estrujado a través de una tela y puesto en un termo para mantener la temperatura. El homogenizado es importante para asegurar que el licor ruminal contiene altos índices de bacteria asociada a la fibra para así maximizar la digestión de la proteína y la fibra de detergente neutro. Existen diferencias en la metodología descrita por Furchtenicht y Broderick (1987) y la descrita por Waghorn y Caradus (1994), la tela ocupada por los primeros autores para el filtrado del contenido ruminal fue doblada en 8 partes para así obtener poros pequeños, restringiendo el paso de partículas, mientras que la utilizada por Waghorn y Caradus (1994) presenta poros grandes para permitir el paso de partículas y por ende se evitaría el tener que homogeneizar demasiado el licor ruminal.

Bacterias ruminales, protozoos y hongos son responsables de la fermentación del alimento para obtener productos utilizables por el animal. La interacción entre la dieta, animal y microorganismos es complicada.

Por lo tanto, es importante utilizar licor ruminal de un donante con alimentación similar al que estamos apuntando a obtener resultados. Además es recomendable que un mismo animal sea utilizado como donante para realizar comparaciones entre dietas, el cual debería ser alimentado con una dieta común y a la misma hora de ser recolectada la muestra para así minimizar la diferencia del inóculo (WEISS, 1994).

3 MATERIALES Y METODO

3.1 Ubicación del ensayo

Para esta tesis se realizaron dos evaluaciones *in vitro*. El primer ensayo, se realizó en el Laboratorio de Nutrición Animal, ubicado en el Instituto de Producción Animal, de la Universidad Austral de Chile, provincia de Valdivia, Décima Cuarta región, Chile. El segundo ensayo *in vitro* se realizó en los laboratorios de AgResearch, ubicados en la ciudad de Palmerston North, Nueva Zelanda. La descripción de materiales y métodos empleados en las incubaciones y muestreos realizados en los laboratorios de la Universidad Austral de Chile y de AgResearch, fueron los mismos.

De la incubación realizada en Chile, solo se presenta en la tesis la información sobre la degradación de la materia seca y del pH, ya que se presentaron problemas para realizar el análisis de amonio y ácidos grasos volátiles al momento del ensayo. Por lo tanto, se consideró conveniente y necesario realizar una segunda incubación donde fuera posible analizar la concentración de amonio y ácidos grasos volátiles en las muestras incubadas. Lo anterior fue posible realizar en el laboratorio del Dr. Waghorn en Nueva Zelanda.

3.2 Etapas y duración del ensayo

El trabajo de laboratorio del ensayo contempló tres etapas; previa al desarrollo de incubación, incubación y filtrado de muestras. La primera etapa consistió en la preparación de los equipos y reactivos necesarios para desarrollar la incubación, en la segunda se llevó a cabo la incubación y finalmente en la tercera se desarrolló el filtrado de las muestras. Todo este proceso se realizó en un periodo de una semana.

3.3 Material experimental

Los materiales utilizados en ambos ensayos se detallan en la siguiente lista:

- **Equipos:**
 - Balanza
 - Incubadora
 - Centrifuga
 - Medidor de pH

- **Materiales:**
 - Termo
 - Paño
 - Frascos con válvula
 - Tubos Eppendorf
 - Pipetas automáticas
 - Licor ruminal (obtenido de vaca fistulada)

- **Alimentos:**
 - Pradera
 - Concentrado fibroso
 - Concentrado amiláceo
 - Alfalfa

- **Reactivos:**

- Buffer McDougal's (saliva artificial)

Por litro:

- NaHCO_3 9,8 g/L
- Na_2HPO_4 3,6 g/L
- NaCl 0,47 g/L
- KCl 0,57 g/L
- CaCl_2 anhídrido 0,04 g/L
- MgCl_2 anhídrido 0,06 g/L

- Agente reductor

Por cada 50 ml:

- Cisteina HCl 315 mg
- Sulfito de sodio 315 mg
- Agua 48 ml
- 1 mol/LM NaOH 2 ml

3.4 Método experimental

El ensayo de la Universidad Austral de Chile correspondió a una incubación *in vitro* de tres dietas, las que clasificaron como Tratamiento 1, sólo pradera; Tratamiento 2, pradera más concentrado fibroso (Coseta); y Tratamiento 3, pradera más concentrado amiláceo (Cebada). El ensayo que se realizó en Nueva Zelanda correspondió a cuatro dietas distintas las cuales fueron clasificadas como: Tratamiento 1, sólo pradera; Tratamiento 2, pradera más concentrado fibroso (Coseta); Tratamiento 3, pradera más concentrado amiláceo (Cebada); y Tratamiento 4, alfalfa. En cada incubación se realizaron tres repeticiones.

La metodología que se utilizó es la descrita por BARRELL *et al* (2000).

3.4.1 Preparación de los frascos de incubación. Se utilizaron frascos de 50 ml cada uno, a los cuales se les perforó la tapa, con un taladro y una broca de 5 milímetros, para instalarles una válvula con la finalidad de permitir la salida de gases desde el interior de los frascos, impidiéndose la entrada de aire a los mismos (Anexo 1).

3.4.2 Preparación del alimento. Para el ensayo realizado en la Universidad Austral de Chile, los alimentos utilizados correspondieron a:

1. Pradera: La pradera cosechada en el mes de Octubre 2005, correspondió a una pradera permanente sembrada. La pradera se congeló para evitar el proceso de descomposición y mantener sus características estables. Con una maquina eléctrica, marca Kenwood modelo Chef, se realizó el picado de la pradera (diámetro picado de 7 mm) (Anexo 2).

2. Concentrados: Los concentrados que se emplearon estaban constituidos por los siguientes ingredientes:

- Concentrado fibroso:

○ Coseta seca de remolacha	86,5%
○ Harina de soja	11,5%
○ Melaza de remolacha	2,0%
Total	100%

- Concentrado amiláceo:

○ Cebada	93,0%
○ Harina de soja	5,0%
○ Melaza de remolacha	2,0%
Total	100%

Ambos se molieron, previo secado por 48 horas en estufa de aire forzado, utilizando un molino de martillo marca Wiley, con lo que se obtuvo un tamaño de partícula homogéneo de 1 milímetro de diámetro.

Para el ensayo realizado en Nueva Zelanda los alimentos que se utilizaron corresponden a los que se detallan a continuación:

1. Pradera: La pradera utilizada y su manejo son los mismos que los empleados en los ensayos realizados en Chile.

2. Alfalfa: Correspondió a una pradera cosechada en el mes de Octubre 2006 en Nueva Zelanda, la cual fue congelada y luego picada con una maquina eléctrica marca Kenwood modelo Chef (diámetro picado de 7 mm).

3. Concentrados: Los concentrados y su manejo son los mismos que los empleados en los ensayos realizados en la Universidad Austral de Chile.

3.4.3 Experimentación en laboratorio

3.4.3.1 Manejo previo a la incubación. A continuación se detallan las actividades previas a la incubación (día anterior).

- Se realizó el pesaje y registro de todos los frascos de incubación vacíos.
- Se introdujo en los frascos cantidades pesadas de pradera y/o concentrado y alfalfa (tal como ofrecido), según los tratamientos, utilizando una balanza de precisión; según se describe, para Chile como para Nueva Zelanda:
 - 2,9 g (+/- 0,2) de pradera picada congelada para el tratamiento 1.
 - 2,4 g (+/- 0,2) de pradera picada congelada, mas 0,17 g (+/- 0,02) de concentrado, coqueta (T2) o cebada (T3).
 - 2,9 g (+/- 0,2) de alfalfa picada congelada para el tratamiento 4.
- Los frascos se taparon y colocaron en el freezer durante la noche.
- Se encendió el horno incubador, con lo cual se logró una temperatura estable de 40° Celsius del agua.
- Se preparó un litro y medio de Buffer McDougal's (saliva artificial). El Buffer McDougal's se preparó según especificación.
- Marcado de los tubos Eppendorf.

Cantidades pesadas de pradera y/o concentrado y alfalfa (base materia seca) según tratamientos son presentadas a continuación (Chile y Nueva Zelanda):

- 0,48 g (+/- 0,03) de pradera picada para el tratamiento 1.

- 0,40 g (+/- 0,03) de pradera picada, más 0,15 g (+/- 0,018) de concentrado, fibroso (T2) o amiláceo (T3).
- 0,59 g (+/- 0,04) de alfalfa picada congelada para el tratamiento 4.

3.4.3.2 Incubación. En el día de la incubación, a una vaca fistulada se le extrajo licor ruminal. Para obtener éste se requirió extraer contenido ruminal, prensarlo y colarlo con un paño. Finalmente se colocó el licor ruminal en un termo para mantener la temperatura y el medio anaeróbico de éste.

Mientras se extrajo el licor ruminal, se calentó a baño María el Buffer McDougal's hasta alcanzar una temperatura de 40° Celsius. Además, mientras era calentado se aplicó CO₂ a la botella que lo contiene para lograr un ambiente anaeróbico. Inmediatamente se colocaron los frascos a incubar en el horno, con lo que adquirieron lentamente una temperatura de 40°.

Posteriormente se prepararon 50 ml de agente reductor, de acuerdo a especificación previamente señalada en los materiales utilizados.

Al haber alcanzado una temperatura de 40° Celsius, los frascos fueron retirados, uno a uno, del horno, para agregarles el buffer y el agente reductor. Los frascos fueron colocados bajo CO₂ al momento de agregarles el buffer y el agente reductor. Se agregó 12 ml de buffer, utilizando la pipeta automática, seguido por 0,5 ml de agente reductor. Finalizado este proceso los frascos fueron llevados a la incubadora (Anexo 3). Se dejó que el agente reductor actúe por 15 minutos antes de agregar el licor ruminal. Previo a ser agregado el licor ruminal en los frascos, se midió el pH y se muestreó éste para almacenarlo.

Una vez transcurrido el periodo de 15 minutos, 3 ml de licor ruminal fueron agregado en cada frasco. Finalmente se colocaron los frascos nuevamente en la incubadora y se encendió el agitador.

3.4.4 Muestreos. A continuación se presenta la metodología utilizada para realizar los muestreos, tanto para ácidos grasos volátiles como para amonio, desarrollada en ambas incubaciones.

3.4.4.1 Amonio. Los muestreos para amonio se realizaron cada 2 horas, hasta las 12 horas de iniciada la incubación, después se realizó un muestreo a las 24 horas de iniciada la incubación. Se realizaron los muestreos de la siguiente forma; Después de haber retirado los frascos correspondiente al horario de muestreo de la incubadora, se tomó una muestra de 1,5 ml y se colocó en un tubo de micro centrifugado (Eppendorf). Se centrifugó por 8 minutos a 10.000 RPM. Luego se extrajo el sobrenadante (Anexo 4) y transfirió a otro tubo de micro centrifugado para finalmente congelarlo a -20° Celsius.

3.4.4.2 Ácidos grasos volátiles. Los muestreos para ácidos grasos volátiles se realizaron a las 0, 6, 12 y 24 horas de iniciada la incubación. El muestreo para ácidos grasos volátiles fue realizado de la misma forma que para amonio.

Una vez que los muestreos fueron realizados, los frascos fueron introducidos en un congelador para detener los procesos biológicos.

3.4.5 Degradabilidad de la materia seca de las dietas. La Degradabilidad de la materia seca fue determinada mediante la metodología descrita por GOERING y VAN SOEST (1972), para lo cual se utilizó crisoles porosos para el filtrado (Anexo 5).

3.4.6 Análisis de Ácidos Grasos Volátiles, Amonio y pH para las dietas incubadas. Las muestras del contenido incubado y centrifugado fueron enviadas al Laboratorio de Nutrición, perteneciente al Instituto de Alimentos, Nutrición y Salud Humana de la Universidad de Massey en Nueva Zelanda para determinar concentración de ácidos grasos volátiles y amonio. Para el caso de

ácidos grasos volátiles la metodología utilizada fue la descrita por Attwood (1998) y para el caso del amonio la metodología fue la descrita por Neely y Phillipson (1988).

Después se realizó la medición de pH del contenido de los frascos con un medidor de pH marca Orión modelo SA520 (Anexo 6).

3.5 Diseño experimental y análisis estadístico

En el desarrollo del análisis de las variables, éstas se dividieron en pruebas para las variables pH, degradabilidad de la materia seca, concentración de amonio y AGV. Para las variables pH, degradabilidad de la materia seca y amonio, el análisis se realizó a las horas 0, 6, 8 y 12 y para los AGV a las 12 horas.

A todas las variables se aplicó un test de normalidad de Anderson. Una vez aplicado el test, al no rechazar la normalidad se optó por un Análisis de Varianza a una vía por efecto estudiado. Así los efectos a considerar fueron los tratamientos (3) y (4) por cada variable. En general los modelos ocupados son de efecto fijo exceptuando la variable hora en la cual se realizó un análisis especial de regresión por ser una variable que relaciona los datos. En el caso de los AGV, se tuvo como respuesta de la dócima de Anderson, el rechazo de la distribución normal como ajuste a los datos, por ello se realizó la prueba de Friedman.

Al existir en los análisis diferencias entre tratamientos, se aplicó la dócima rápida de Tukey.

4 PRESENTACION Y DISCUSION DE RESULTADOS

4.1 Composición química y digestibilidad de los alimentos

A la pradera y concentrados del ensayo se les realizaron análisis químicos-nutricionales, para poder tener una referencia definida de sus aportes para la alimentación del ganado.

En el Cuadro 2 se muestra la composición nutricional de los alimentos pradera y alfalfa, utilizados durante el ensayo.

CUADRO 2 Composición química y digestibilidad de los forrajes utilizados en la incubación in vitro, determinada mediante NIRS (valores expresados base 100% materia seca).

	Pradera	Alfalfa
Materia seca (%)	16,7	20,4
Cenizas totales (%)	9,7	10,8
Proteína cruda (%)	21,6	29,5
EM (Mcal/kg MS)	2,64	2,90
FDN (%)	46,3	33,1
FDA (%)	24,2	23,0
Digestibilidad (%)	88,6	75,7

Los contenidos de nutrientes corresponden a valores que se encuentran levemente superior a los indicados por ANRIQUE *et al.* (1995), para praderas con similares características.

Valores obtenidos por BERNDT (2005) en cuanto a composición nutricional de praderas, de época primaveral, pertenecientes a la Provincia de Valdivia, presentan mínimas variaciones con respecto a los valores obtenidos en el ensayo, en donde el promedio de MS (%) fue de un 15,6; CT (%) 10,9; PC (%) 20,8; EM (Mcal/kg MS) 2,61; FDA (%) 30,1; FDN (%) 52,1.

Para CLARK y KANNEGANTI (1998), una pradera con un buen manejo debe presentar características tales como: 18 a 24% de materia seca, 18 a 25% de PC, 40 a 55% FDN y 2,5 a 2,9 Mcal de energía metabolizable por kilo de materia seca. La pradera usada en este ensayo estuvo dentro de los rangos anteriormente mencionados, a excepción del porcentaje de materia seca, el cual está por debajo del rango, lo cual es característico en esta época del año.

Para el caso de la alfalfa se puede apreciar que presenta baja concentración de fibra comparado con la pradera mixta y un contenido de proteína cruda mayor. BURKE (2004), apreció las mismas diferencias para el caso de leguminosas en donde la alfalfa presentó un contenido de proteína cruda de un 23,3%, FDN de un 30,5 y FDA de un 23,1.

La composición botánica de la pradera ocupada en el ensayo, estimada por medio de separación manual, se presenta en el Cuadro 3, en donde se aprecia un amplio dominio de las gramíneas de carácter forrajero. Las malezas encontradas fueron mayoritariamente del grupo de las denominadas de hoja ancha.

CUADRO 3 Composición botánica de la pradera utilizada (%).

	Promedio
Gramíneas	90,65
Leguminosas	7,00
Malezas	2,35
Total	100,00

En el Cuadro 4 se indica la composición nutricional del concentrado amiláceo y del concentrado fibroso (determinado mediante NIRS).

CUADRO 4 Composición química y digestibilidad de los concentrados utilizados en la incubación in vitro, determinada mediante NIRS (valores expresados base 100% materia seca).

	Concentrados	
	Amiláceo	Fibroso
Materia seca (%)	88,2	88,9
Cenizas totales (%)	2,5	6,9
Proteína cruda (%)	12,1	11,5
Extracto etéreo (%)	1,8	1,6
EM (Mcal/kg MS)	3,14	3,15
FDN (%)	28,1	37,9
FDA (%)	6,3	23,3
Digestibilidad (%)	88,0	88,3

Se observa que los concentrados poseen valores energéticos y proteicos muy similares. El contenido de fibra es muy superior en el concentrado fibroso.

La utilización de un concentrado rico en fibra altamente digestible podría aumentar el pH del rumen, facilitar la síntesis de proteína microbiana y generar mayores producciones de leche (MULLER, 1999). El uso de coseta seca de remolacha en concentrados resulta ser una forma muy apropiada de aportar energía metabolizable a la dieta, la que deriva de la fibra digestible, la cual fermenta de forma lenta en el rumen sincronizando mejor con los requerimientos de los microorganismos ruminales (ANRIQUE, 1989 y WEBSTER, 1993 citados por BERNDT, 2005).

Con respecto a concentrados amiláceos, estos se caracterizan por una rápida fermentación en el rumen, por lo que consumos masivos provocan que el pH del rumen disminuya bruscamente. Además se han reportado altas tasas de sustitución de forraje por concentrados, esperándose un efecto desfavorable respecto del metabolismo ruminal, pero que no necesariamente disminuye la producción láctea (VAN SOEST, 1994).

4.2 Degradabilidad de la materia seca

A continuación se presentan los resultados de materia seca degradada, resultados obtenidos en la incubación realizada en Chile y en Nueva Zelanda.

4.2.1 Resultados incubación realizada en Chile

Los resultados de porcentaje de materia seca degradada que se entregan a continuación en la Figura 1 corresponden al promedio de tres incubaciones, cuadro de valores promedios y desviaciones estándar son presentados en los anexos (Anexo 7).

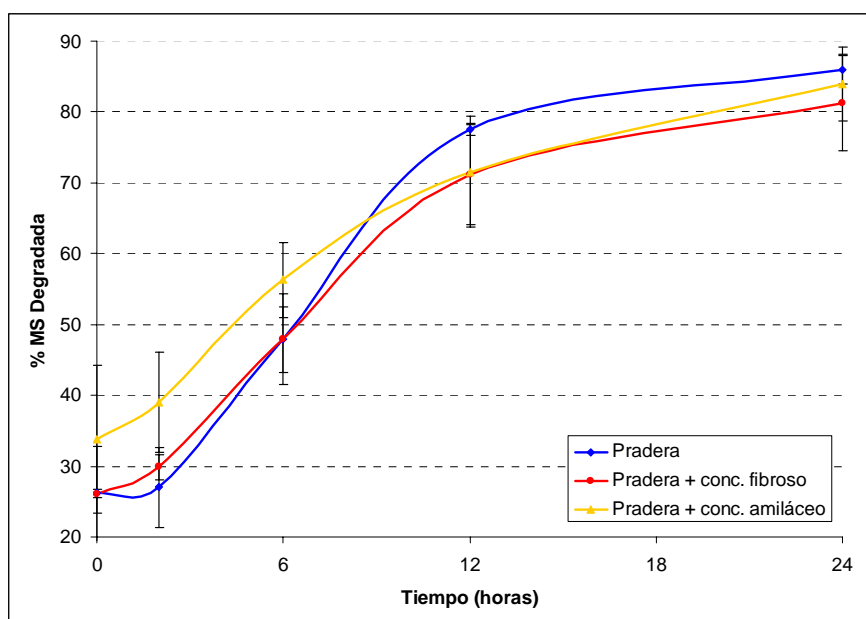


FIGURA 1 Valores promedio del porcentaje de materia seca degradada en un periodo de 24 horas (tres repeticiones para cada tratamiento). Barras representan desviación estándar.

Se puede apreciar que al momento de iniciada la incubación (hora 0), existe un porcentaje de materia seca degradada, esto se debe principalmente al proceso de molienda al cual las dietas fueron sometidas, lo que solubilizó parte de la materia seca, observándose una situación similar *in vivo* con los bovinos (WAGHORN, 1996). Similares resultados fueron obtenidos por ALOMAR et al. (1996), donde señalaban valores iniciales de degradabilidad entre un 20% y un 40%, dependiendo del tipo de forraje y el estado de madurez, para praderas permanentes similares a las utilizadas en este ensayo.

Se puede apreciar que en el caso de la dieta pradera + concentrado fibroso y la dieta solo pradera existe una lenta respuesta a la degradación al inicio, producto del mayor porcentaje de FDN y FDA. A su vez, la dieta pradera + concentrado amiláceo tuvo una pronta respuesta degradativa debido al menor

porcentaje de fibra que ésta presenta, llegando a ser más constante que las otras dietas.

En la Figura 1 podemos ver, para todas las dietas, que la mayoría de la materia seca es degradada durante las primeras 12 horas, entre las 12 y 24 horas empieza a estabilizarse para ya, a las 24 detenerse prácticamente por completo.

4.2.2 Resultados incubación realizada en Nueva Zelanda

En el ensayo realizado en Nueva Zelanda, se incubaron cuatro dietas distintas, las tres primeras corresponden a las mismas utilizadas en Chile, agregándose una cuarta correspondiente a alfalfa. En el ensayo, la determinación de la degradabilidad se realizó cada 2 horas desde el inicio hasta las 12 horas transcurrido el ensayo y posteriormente se realizó un último muestreo a las 24 horas de iniciado el ensayo. En la Figura 2 se entregan los promedios de las incubaciones para las cuatro dietas. Cuadro de valores promedios y desviaciones estándar son presentados en los anexos (Anexo 8).

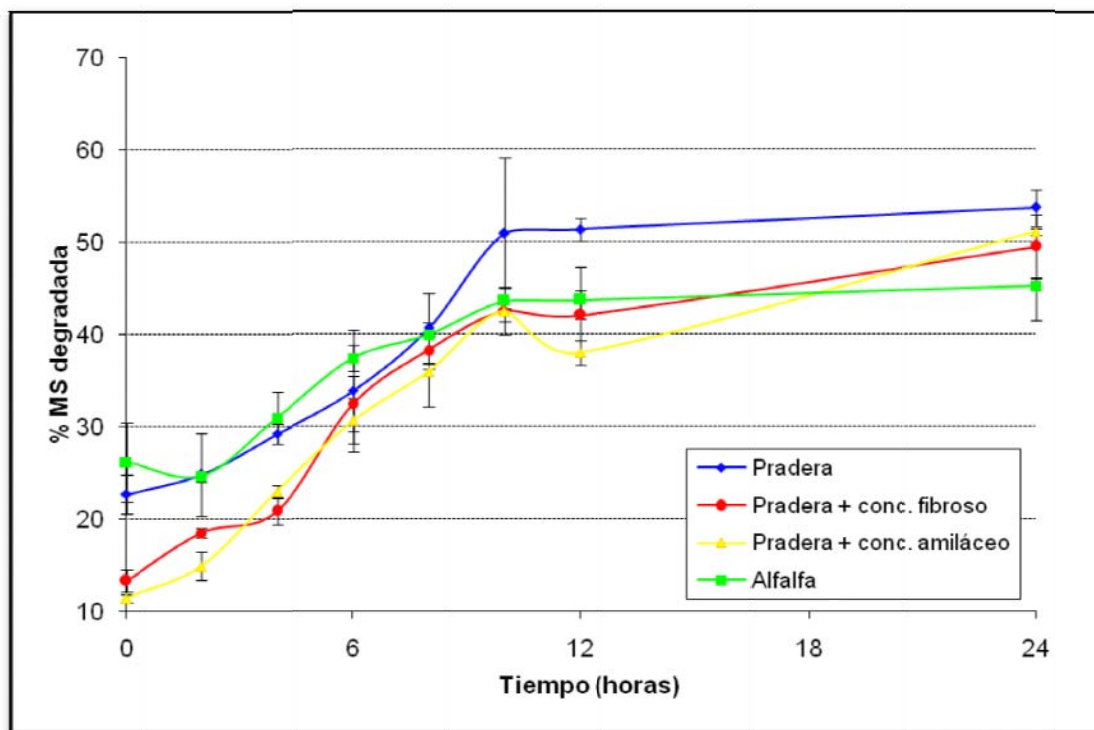


FIGURA 2 Valores promedio del porcentaje de materia seca degradada en un periodo de 24 horas (tres repeticiones para cada tratamiento). Barras representan desviación estándar.

Al igual que los resultados obtenidos en Chile, a las 0 horas aparece materia seca degradada, producto del molido de las dietas. Se pueden apreciar diferencias con respecto a los resultados obtenidos en Chile en cuanto a valores de materia seca degradada para la dieta Pradera + concentrado amiláceo ya que ésta con anterioridad presentaba los valores más altos hasta las nueve horas de transcurrido el ensayo. Además, es importante señalar que los valores obtenidos son menores a los anteriores logrados en la incubación realizada en la Universidad Austral de Chile, para todos los horarios, esto se debe principalmente a la técnica de filtrado utilizada, en la cual al utilizar un papel filtro existió la posibilidad de que mayor materia seca traspasase el filtro o que existiera una falla humana al momento del filtrado. En dietas como alfalfa; pradera + concentrado fibroso; pradera + concentrado amiláceo, existen

algunos puntos en las curvas en donde se aprecia un descenso en la curva, esto puede deberse a una adhesión microbial a las partículas de fibra.

Por lo tanto, los resultados obtenidos en el Laboratorio de Nutrición Animal de la Universidad Austral de Chile son más representativos y reales al momento de compararlos con la literatura. BURKE (2004), *in vitro* obtuvo resultados para gramíneas en donde a la hora 0 éstas presentaban un 27% de la materia seca degradada, para al final (24horas) llegar a un 69% de la materia seca degradada. Para el caso de la alfalfa los valores fueron de un 28% al momento de iniciada la incubación y un 66% al término de ésta. Estos valores difieren a los obtenidos en el filtrado realizado en Nueva Zelanda, además en ninguna de las dietas evaluadas por BURKE (2004) existió un aumento de materia seca como ocurrió en este caso.

En el Anexo 9 se entrega los valores promedios y la diferencia estadística entre los distintos tratamientos. Se puede ver que solamente existieron diferencias a las 0, 4, 12 y 24 horas de incubadas las dietas. Además la dieta con mayor degradación de la materia seca fue la de solo pradera para todos estos casos.

4.3 Variaciones en pH

El pH obtenido fue usado para monitorear el desarrollo de la incubación, y en especial para indicar el punto en el cual ésta deja de ser representativa en comparación a digestiones *in vivo*. En la mayoría de las situaciones de vacas a pastoreo sin suplementación el pH del rumen se mantiene sobre 5,8 (GEBAUER *et al.*, 2006) y cualquier valor de 5,6 o más bajo es considerado no representativo a una digestión normal.

Los resultados del pH en las incubaciones se muestran en las Figuras 3 y 4. Cuadro de valores promedios y desviaciones estándar son presentados en los anexos.

4.3.1 Resultado incubación realizada en Chile

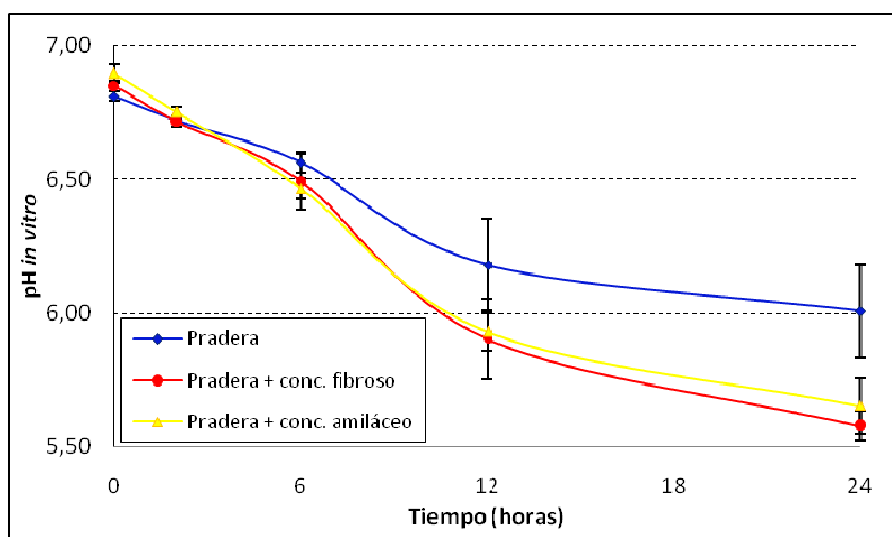


FIGURA 3 Variación promedio en pH de cada dieta, para cada hora de muestreo, cuando fueron incubadas por 24 horas (tres repeticiones para cada tratamiento). Barras representan desviación estándar.

En la Figura 3 se entregan los valores promedios de pH y su desviación estándar para las tres dietas incubadas en Chile. Se puede apreciar una disminución normal en el pH de las dietas, siendo ésta mayor para el caso de las dietas con concentrado, con lo que se demuestra que el procedimiento de incubado fue realizado de forma correcta, encontrándose los valores dentro de los rangos señalados con anterioridad.

4.3.2 Resultado incubación realizada en Nueva Zelanda

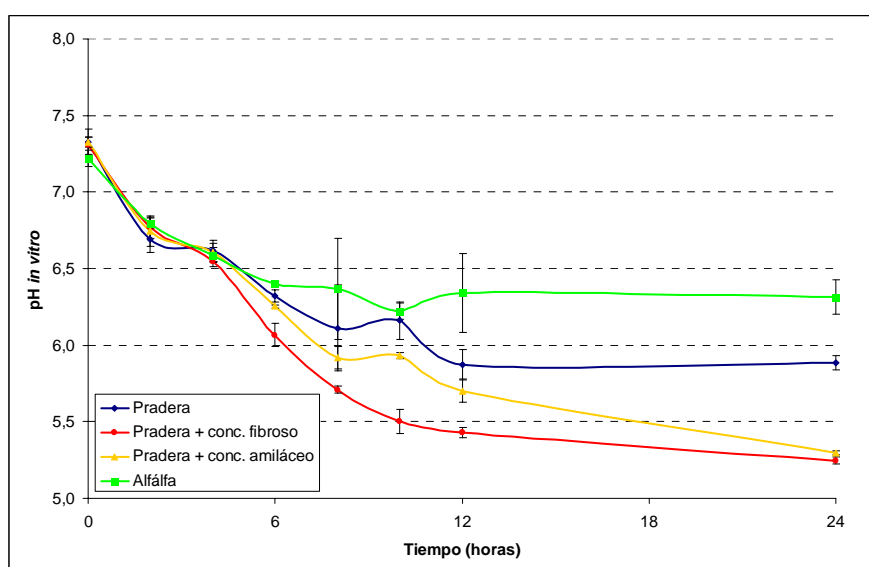


FIGURA 4 Variación promedio en pH de cada dieta, para cada hora de muestreo, cuando fueron incubadas por 24 horas (tres repeticiones para cada tratamiento). Barras representan desviación estándar.

En la Figura 4 se entregan las variaciones promedio, *in vitro*, de pH para las cuatro dietas incubadas en un periodo de 24 horas en Nueva Zelanda. Cuadro de valores promedios y desviaciones estándar son presentados en el anexo 11. El pH a la hora 0 o momento de iniciado el ensayo presenta un valor entre 7,0 y 7,4, similar para todas las dietas. Después de transcurridas 2 horas

de incubación, el pH de todas las dietas se encontró entre 6,6 y 6,9, valor que se mantiene sobre 6,0 hasta las 10 horas para el tratamiento de pradera y el tratamiento de alfalfa. Para el caso de pradera y alfalfa, los valores de pH al finalizar la incubación se mantienen por sobre 5,6, no así el caso de los tratamientos pradera + concentrado fibroso y pradera + concentrado amiláceo los cuales se encuentran entre 5,25 y 5,30 respectivamente, valores probables en condiciones de pastoreo con alta suplementación de concentrados, situación esperables bajo las condiciones del sur de Chile. Similar resultados obtuvo BURKE (2004) en incubaciones realizadas *in vitro* para dietas solo pradera y alfalfa.

El descenso del pH por debajo de los rangos reales en bovinos, puede deberse a una deficiencia o falta de un aporte permanente de buffer al momento de realizada la incubación, siendo este incapaz de mantener niveles reales de pH o excesiva cantidad de ácidos grasos generados por la incubación (Comunicación personal WAGHORN, 2006).

Valores muy similares de pH fueron obtenidos por GEBAUER *et al.*, (2006), en donde dietas suplementadas con concentrados en distintos niveles presentaron pH más bajo que dietas en base a solo pradera. Además a mayor grado de suplementación mayor fue la disminución en el pH ruminal. El pH ruminal desciende progresivamente cuando la proporción de concentrado en la dieta aumenta. Esto ocurre debido al aumento de carbohidratos no estructurales mientras el contenido de fibra físicamente efectiva en la dieta desciende (GOZHO y COL, 2006).

En el Anexo 12 se entrega los valores promedios de pH y la diferencia estadística de los distintos tratamientos. Se puede ver que solamente existe diferencias a partir de las 6 horas de incubadas las dietas. La dieta que presentó una menor acidificación fue la de alfalfa a diferencia de la dieta

pradera más concentrado fibroso la cual presentó un mayor grado de acidificación.

4.4 Concentraciones de amonio.

La concentración de amonio *in vitro* es una consecuencia de la degradación de la proteína y la utilización de $\text{NH}_3\text{-N}$ por los microorganismos del rumen.

Forrajes con alta concentración de proteína cruda y baja concentración de fibra, por ejemplo alfalfa, tienen una rápida degradación de la materia seca, proteína cruda y fibra. El exceso de amonio producido no es utilizado por los microorganismos y tiene que ser excretado como urea originando un costo metabólico al animal (BEEVER, 1993).

Cambios en las concentraciones promedio de amonio se entregan en la Figura 5. Cuadro de valores promedios y diferencias estadísticamente significativas son presentadas en los anexos (Anexo 13).

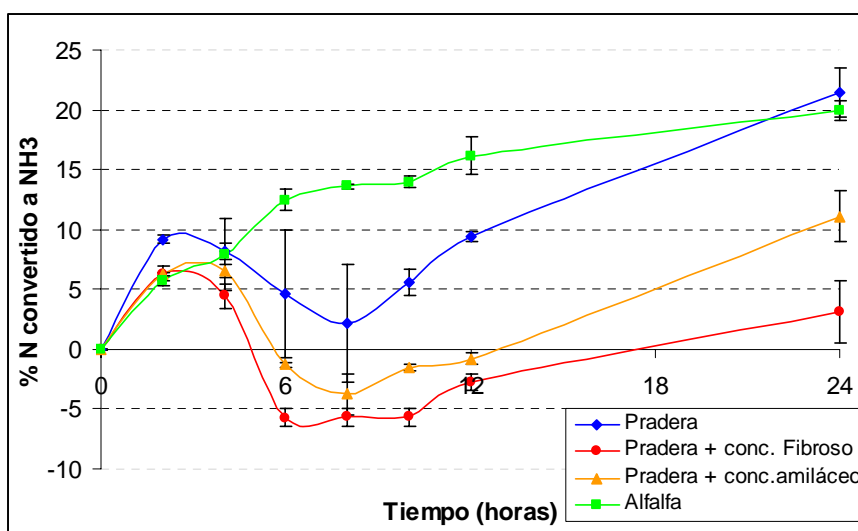


FIGURA 5 Producción neta de amonio para 4 dietas distintas evaluadas de forma *in vitro* (tres repeticiones por cada tratamiento). Barras representan desviación estándar.

Se puede apreciar que en todos los tratamientos a excepción del tratamiento alfalfa ocurre una disminución estadísticamente significativa, a partir de las 2 horas, llegando en el caso de la pradera + concentrado fibroso y pradera + concentrado amiláceo a presentar valores negativos. Similares resultados obtuvo Burke (2004), en donde dietas incubadas (amiláceas y fibrosas) presentaron valores negativos llegando incluso a valores cercanos a -20%. El caso de la alfalfa es el único que no presenta disminuciones ($P < 0,01$), lo mismo sucedió con la alfalfa incubada por Burke (2004). Diferencias existe con Burke (2004) en cuanto a valores máximos en donde a las 24 horas de transcurrido la incubación los valores máximos llegan a ser menores en hasta un 20% para alfalfa, esto a pesar de igual composición química y digestibilidad del forraje en cuestión.

Las disminuciones en las concentraciones de amonio que se aprecian en la Figura 5 se deben a que la disponibilidad de nitrógeno de la dieta es insuficiente o que el nitrógeno de la dieta es liberado de forma lenta, produciéndose una restricción para las bacterias y por ende una restricción a la producción de ácidos grasos volátiles (CHAVEZ *et al.*, 2002).

Las concentraciones de amonio para la dieta solo alfalfa no presenta disminución producto de que los microorganismos se ven sobrepasados debido al contenido de nitrógeno mayor en la dieta, no así las otras dietas las cuales presentan una menor cantidad BURKE (2004).

A partir de las 6 horas, en la dieta pradera la concentración de amonio fue significativamente mayor ($P < 0,01$) que las dietas pradera + concentrado fibroso y pradera + concentrado amiláceo, similar situación fue obtenida en vacas fistuladas en el trabajo realizado por GEBAUER *et al.*, 2006. De las 10 horas en adelante la dieta pradera + concentrado fibroso tuvo mayores concentraciones de amonio que la dieta pradera + concentrado amiláceo ($P < 0,01$), lo que evidenciaría una mejor capacidad de esta última para entregar energía y disminuir las concentraciones de amoniaco.

4.5 Producción de ácidos grasos volátiles

Los ácidos grasos volátiles representan entre un 65 – 75% de la energía absorbida por rumiantes y tanto la tasa de producción como la proporción de los ácidos grasos volátiles individuales afecta la síntesis de lactosa y producción de leche. Normalmente el ácido acético y butírico representan un 75% aproximadamente de la producción total de ácidos grasos volátiles, producto de la degradación de forraje por parte de las vacas (BERGMAN, 1990).

En el caso de los ácidos grasos volátiles se dispone de información correspondiente a muestreos realizados a las 0, 6, 12, 24 horas de transcurrida la incubación, sin embargo solo existen datos para el análisis estadístico a las 12 horas de transcurrida la incubación, en virtud de los costos involucrados en la medición de la concentración de los AGV en los otros tiempos.

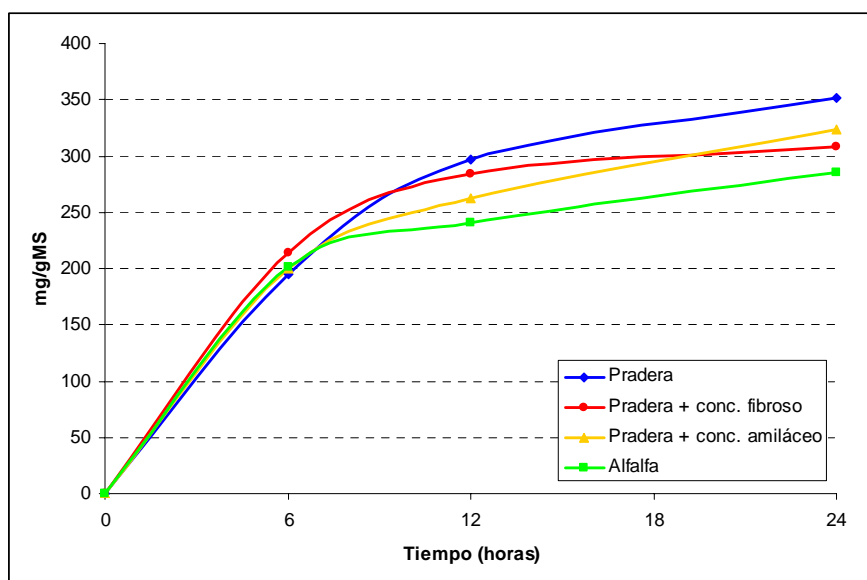


FIGURA 6 Producción neta total de ácidos grasos volátiles (mg/gMS) de cada dieta, para cada hora de muestreo, cuando fueron incubadas *in vitro* por 24 horas (tres repeticiones para cada tratamiento).

En la Figura 6 se muestran los valores obtenidos al analizar las muestras recolectadas a las 0, 6, 12 y 24 horas de iniciada la incubación. Cuadro de valores y diferencias estadísticamente significativas son presentados en el anexo 14. Se puede ver que a partir de las 0 horas y hasta las 12 horas la producción de ácidos grasos volátiles aumenta, y a partir de las 12 tiende a estabilizarse. Esta mayor velocidad de síntesis de AGV sería concordante con el descenso en el pH experimentado en estas mismas horas en todas las

dietas. Las dietas de alfalfa, pradera + concentrado fibroso y pradera + concentrado amiláceo tendrían una respuesta inicial más rápida, para después de las 8 horas ser alcanzada por pradera siendo esta última la cual produjo al término de la incubación una mayor producción.

Si bien no existe análisis estadístico previo a las 12 horas, parecería que las dietas evaluadas presentan un comportamiento similar entre ellas y que las dietas que incluyen pradera más concentrado el efecto de los concentrados se produciría durante las primeras 12 horas entregando energía para los microorganismos y que después de las 12 horas éste cesaría y predominaría la entrega de energía por parte del FDN de la pradera. A continuación se presenta en Cuadro 5 el desglose de los ácidos grasos volátiles en acético, propiónico, butírico y menores.

CUADRO 5 Producción neta de Ácidos Grasos Volátiles (mg/grMS), valores promedios para el muestreo realizado a las 12 horas de incubadas las dietas.

	Pradera		Pradera + conc. fibroso		Pradera + conc. amiláceo		Alfalfa		Sig
Total	300,32	a	285,53	b	267,37	c	249,79	d	**
Acético	157,22	a	152,84	a	140,06	b	140,34	b	**
Propiónico	75,33	a	71,68	a	59,40	b	60,62	b	**
Butírico	52,56	ab	48,96	b	55,70	a	31,78	c	**
Menores	15,21	a	12,05	b	12,22	b	17,04	a	**

Letras distintas en la fila indican diferencias estadísticamente significativas: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; n.s. $P > 0,05$; Sig.: significancia.

Del Cuadro 5, se puede observar que al comparar las dietas a las 12 horas de iniciada la incubación se observa que existen diferencias significativas

($P < 0,01$) entre todas las dietas para el caso de la producción neta total de AGV. Sin embargo, no existe diferencia significativa ($P < 0,01$) para el caso de la producción neta de ácido acético y propiónico en las dietas pradera y pradera más concentrado fibroso, pero fueron mayores ($P < 0,01$) que dietas pradera más concentrado amiláceo y alfalfa.

La dieta pradera produjo igual cantidad ($P < 0,05$) de ácido butírico que las dietas pradera más concentrado fibroso y que pradera más concentrado amiláceo, pero las anteriores, fueron mayores ($P < 0,01$) que la dieta alfalfa.

5 CONCLUSIONES

En esta tesis los resultados generados de las dietas evaluadas proveen información en términos de degradación de la materia seca, producción de amonio y ácidos grasos volátiles durante la fermentación *in vitro*.

La información aquí presentada podrá ser utilizada en conjunto con modelos de balance nutricional para desarrollar dietas forrajeras que tengan una alta eficiencia de utilización de los nutrientes por parte de los animales, haciendo que los márgenes productivos sean mayores.

- La inclusión de concentrados en las dietas incubadas en Chile produjo una disminución en la degradación de la materia seca con respecto a la dieta testigo. Las dietas con concentrados presentaron una menor producción de ácidos grasos volátiles que la dieta testigo o solo pradera. La concentración de amonio en el líquido ruminal, de la dieta solo pradera presentó una mayor concentración que las dietas con inclusión de concentrados.
- Para el ensayo realizado en Nueva Zelanda, la degradación de la materia seca de las dietas con inclusión de concentrados presentaron una menor tasa degradativa en comparación a la dieta solo pradera. La dieta solo alfalfa presentó una menor degradación de materia seca.
- La inclusión de concentrado en las dietas con pradera genera una disminución en la concentración de amonio y en el pH evaluado *in vitro*.

6 RESUMEN

El ensayo se realizó, en una primera etapa, en los laboratorios del Instituto de Producción Animal perteneciente a la Universidad Austral de Chile, Provincia de Valdivia, Chile y en una segunda etapa en los laboratorios de AgResearch, ciudad de Palmerston North, Nueva Zelanda.

La hipótesis planteada fue que “La inclusión de concentrados (fibroso o amiláceo) en dietas basadas en forraje para vacas lecheras, produciría un aumento en la degradabilidad de la materia seca de la dieta, en la producción de ácidos grasos volátiles y una reducción de las concentraciones de amonio en el líquido ruminal”. El objetivo propuesto fue “Evaluar *in vitro* la cinética de la degradación de la materia seca, la producción de ácidos grasos volátiles y de amonio, en dietas basadas en pradera, suplementadas con un concentrado fibroso o uno amiláceo”.

Se evaluó de forma *in vitro* cuatro dietas distintas: Solo pradera; Pradera más concentrado fibroso; Pradera más concentrado amiláceo; Solo alfalfa. La pradera correspondió a una pradera permanente sembrada cosechada en el mes de Octubre. La alfalfa fue cosechada durante el mes de Noviembre, ambas fueron conservadas mediante congelación. Las dietas fueron muestreadas cada 2 horas por un periodo de 12 horas y finalmente muestreadas a las 24 horas de transcurrida la incubación. Las dietas se muestrearon para estimar la degradación de la materia seca, el pH, la producción de ácidos grasos volátiles y la concentración de amonio.

De acuerdo a los resultados experimentales se concluyó que la hipótesis se acepta en cuanto a la concentración de amonio ya que las dietas con suplementación de concentrados presentaron una menor concentración de amonio. En cuanto a la degradación de la materia seca y la producción de

ácidos grasos volátiles ésta se rechaza ya que se produjo una disminución y no un aumento como lo señala la hipótesis.

SUMMARY

The experiment was conducted in a first stage in the Animal Production Laboratories, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile. The second Stage was conducted in the Ag Research Laboratories, Palmerston North, New Zealand. Both separately took one week to develop.

The hypothesis was “The inclusion of concentrates (fiber and starch) in diets based in forage for dairy cows, will produce a higher degradation of the dry matter, production of volatile fatty acid and a reduction in the concentration of ammonia”. The objective was to evaluate in vitro the dry matter kinetics degradation, the volatile fatty acids production and the concentration of ammonia in diets based in forage with the supplementation of concentrates (fiber and starch).

In vitro were evaluated four different diets: Only forage; Forage plus concentrate of fiber; Forage plus concentrate of starch; Only Lucerne. The forage was a natural prairie permanent harvested in the month of October. Lucerne was harvested in the month of November. Both were freeze to preserve. The diets were evaluated every two hours during a twelve hours period and a final evaluation was made twenty four hours after the start of the experiment. They were evaluated with the propose to determinate dry matter degradation, pH, volatile fatty acids production and ammonia concentration.

According to the results obtained the conclusions are that the hypothesis was accepted for the concentration of ammonia because the inclusion of concentrates generate a lower ammonia concentration. In the case of the volatile fatty acids and the degradation of the dry matter there was a reduction in production so this one was rejected.

7 BIBLIOGRAFIA

ALOMAR, D.; FUCHSLOCHER, R. 1996. Aplicación de la espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS o ERIC) al análisis de ensilajes de pradera. Libro de Resúmenes, XXI Reunión Anual SOCHIPA, Coihaique, Pp: 147-148.

ANRIQUE, R.; VALDERRAMA, X.; FUCHSLOCHER, R. 1995. Composición de alimentos para el ganado en la zona sur. Fundación Fondo de Investigación Agropecuaria, Ministerio de Agricultura, 57 p.

ANRIQUE, R. 1999. Descripción del Chile lechero. Competitividad de la producción lechera nacional. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias, Valdivia, Chile.

AKIN, D. 1989. Histological and Physical factors affecting digestibility of forage. *Agronomy Journal*. 81: 17-25.

ATTWOOD, G. T.; KLIEVE, A. V.; OUWERKERK, D.; PATEL, B. K. C. 1998. Ammonia-hyperproducing bacteria from New Zealand ruminants. *Applied and environmental microbiology*. 54: 5. 1796 – 1804.

BAILEY, R. 1973. Structural carbohydrates. *Chemistry and Biochemistry of Herbage*, vol. 1. Academic Press, London.

BALDWIN, R. 1995. Modeling ruminant digestion and metabolism. Chapman and Hall, London.

- BALOCCHI, O. 1999.** Recursos forrajeros utilizados en producción de leche. Valdivia. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias.
- BARRELL, L. G.; BURKE, J. L.; ATTWOOD, G. T.; BROOKES, I. M.; WAGHORN, G. C. 2000.** Preparation of fresh forages for incubation and prediction of nutritive value. Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production. 60: 9 - 14.
- BEEVER, D. 1993.** Ruminant animal production from forages: present position and future opportunities. Proceedings of the XVII International Grassland Congress. 535-542.
- BERNDT, S. 2005.** Estimación de la síntesis de proteína microbiana en vacas lecheras en pastoreo primaveral, con y sin suplementación con concentrado. Instituto de Producción Animal, Universidad Austral de Chile.
- BERGMAN, E. 1990.** Energy contribution of VFA from the gastrointestinal tract in various species. Physiological Reviews. 70: 567-590.
- BONILLA, W. 2002.** Perspectivas de la Producción de Leche Bovina en la Décima Región del Bio Bio. Aspectos generales e investigación de INIA Quilamapu.
- BUXTON, D.; MERTENS, D.; FISHER, D. 1996.** Forage quality and Ruminant Utilization. American Society of Agronomy, Madison Wisconsin.

- BURKE, J. L.; WAGHORN, G. C.; BROOKES, I. M.; ATTWOOD, G. T.; KOLVER, E. S. 2000.** Formulating total mixed rations from forages – defining the digestion kinetics of contrasting species. Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production. 60: 9 – 14.
- BURKE, J. L. 2004.** Determination of digestion parameters to develop and evaluate forage mixture for pasture-fed ruminants. Ph.D. Thesis in Animal Science, Massey University, Palmerstone North, New Zealand. 465p.
- CHAVES, A.; WAGHORN, G.; TAVENDALE, M. 2002.** Digestion kinetics of ryegrass. Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production. 62: 157-162.
- CHENG, K.; FORSBERG, C.; MINTO, H.; COSTERTON, J. 1991.** Microbial ecology and physiology of feed degradation within the rumen. Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants. Academic Press, Toronto, Canada.
- CHURCH, D. C.; POND, W. G.; POND, K. R. 2002.** Fundamentos de nutrición y alimentación de animales. Limusa, S. A. Balderas, México. 635p.
- CLARK, J.; BEARD, J. 1977.** Prediction of the digestibility of ruminant feeds from their solubility in enzyme solutions. Animal Feed Science and Technology. 19: 247-260.
- DE VETH, M.; KOLVER, E. 2001.** Digestion of ryegrass pasture in response to change in pH in continuous culture. Journal of Dairy Science. 84-6: 1449-1457.

- DRACKLEY, J. 2000.** Lipid metabolism. Farm animal metabolism and nutrition. Pp. 97-119.
- FURCHTENICHT, J.; BRODERICK, G. 1987.** Effect of inoculums preparation and dietary energy on microbial numbers and rumen protein degradation activity. *Journal of Dairy Science*. 70: 1404-1410.
- GOERING, H.; VAN SOEST, P. 1972.** Forage fiber Analysis. U.S.D.A. Agric. Handbook N°379. Agricultural Research Service 41 p.
- GRANT, R.; MERTENS, D. 1992.** Impact of in vitro fermentation techniques upon kinetics of fiber digestion. *Journal of Dairy Science*. 75: 1263-1272.
- HOFFMAN, P.; SIEVERT, S.; SHAVER, R.; WELCH, D.; COMBS, D. 1993.** In situ dry matter, protein, and fiber degradation of perennial forages. *Journal of Dairy Science*. 76: 2632-2643.
- HOLMES, C.; BROOKES, I.; GARRICK, D.; MACKENZIE, D.; PARKINSON, T.; WILSON, G. 2002.** Milk production from pasture. Massey University, Palmerston North, New Zealand.
- HUNTINGTON, J.; GIVENS, D. 1995.** The in situ technique for studying the rumen degradation of feeds: a review of the procedure. *Nutrition Abstracts and reviews*. 65-2: 63-93.
- INE.** Instituto Nacional de Estadística. CHILE 1997. VI Censo Nacional Agropecuario.
- JOHN, A.; ULYATT, M.; 1987.** Importance of dry matter content to voluntary intake of fresh grass forages. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*. 47: 13-16.

- JOHNSON, R. 1963.** Symposium on microbial digestion in ruminants: in vitro fermentation techniques. *Journal of Animal Science*. 22: 792-800.
- KLEIN, F. 1998.** Sistema intensivo de producción de leche para la Décima Región de Chile. *Boletín Técnico N° 250*, Centro Regional de Investigación Remehue, Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), 8 p.
- KOLVER, E.; MULLER, L. 1998.** Performance and nutrient intake of high producing Holstein cows consuming pasture or a total mixed ration. *Journal of Dairy Science*. 81: 1403-1411.
- KUDO, H.; JAKOBER, K.; PHILLIPPE, R.; CHENG, K.; BAAR, D.; COSTERTON, J. 1990.** Isolation and characterization of cellulolytic anaerobic fungi and associated mycoplasmas from the rumen of a steer fed a roughage diet. *Canadian Journal of Microbiology*. 3-7: 513-517.
- LASSITER, J.; EDWARDS, H. 1982.** *Animal Nutrition*. Reston Publishing Company, INC, Reston, Virginia, USA.
- LEAN, I.; PARKER, W.; KELLAWAY, R. 1996.** Improving the efficiency of pasture based dairy production. *Proceeding of the New Zealand Society of Animal Production*. 56: 270-275.
- LENG, R.; NOLAN, J. 1984.** Symposium: Protein nutrition of the lactating dairy cow. Nitrogen metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science*. 67: 1072-1089.

- MALIK, B.; NICOL, A.; VAN HOUTERT, M. 1990.** Sources of excess nitrogen affects portioning in lactating ewes. Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production. 59: 158-161.
- MCDONALD, P.; EDWARDS, R. A.; GREENHALGH, J. F. D.; MORGAN, C. A. 1995.** Nutrición animal. Acribia, S. A. Zaragoza, España. 575p.
- MCDUGALL, E. 1948.** Studies on ruminant saliva. The composition and output of sheep's saliva. Biochemistry Journal. 43: 99-109.
- MCLLROY, R. 1967.** Carbohydrates of grassland herbage. Herbage Abstracts. 37: 79-87.
- MINSON, D. 1990.** Forage in Ruminant Nutrition. Academic Press, New York.
- MOLLER, S.; PARKER, W.; EDWARDS, N. 1996.** Within-year variation in pasture quality has implications for dairy cow nutrition. Proceedings of the New Zealand Grassland Association. 57: 173-177.
- MONSON, W.; BURTON, G. 1972.** Effects of length of cut and leaf surface treatments on digestibility of fresh forage. Agronomy Journal. 64-3: 405-406.
- MOORE, K.; HATFIELD, R. 1994.** Carbohydrates and forage quality. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA. Pp.229-280.
- MULLER, L. 1999.** Programa de suplementación de vacas lecheras de alto potencial genético en pastoreo. En: Producción Animal. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Austral de Chile. Chile, pp 1-19.

- NOCEK, J. 1997.** Bovine acidosis: implications on lameness. *Journal of Dairy Science*. 80: 1005-1028.
- ORPIN, C.; HO, Y. 1991.** Ecology and function of the anaerobic rumen fungi. *Recent Advances on the Nutrition of Herbivores*. Malaysian Society of Animal Production, Kuala Lumpur.
- OWENS, F.; ZINN, R.; KIM, Y. 1986.** Limits to starch digestion in the ruminant small intestine. *Journal of Animal Science*. 63: 1634-1648.
- PALMQUIST, D. 1988.** The feeding value of fats. *World Animal Science*. Pp. 293-312.
- PULIDO, G. 1997.** Interaction of pasture conditions, concentrate supplementation and milk yield level in relation to dairy cow performance and behavior. Ph D. Thesis, Wye College, University of London.
- PULIDO, R.; CERDA, M.; STEHR, W. 1999.** Effect of level and type of concentrate supplementation on the performance of spring grazing dairy cows. *Arch Med Vet* 31, 177-187.
- PULIDO, R.; FELMER, E.; HINOSTROZA, A. 2006.** Efecto del tipo de carbohidratos en el concentrado sobre el consumo de alimento de vacas lecheras en pastoreo. *Instituto Ciencia Animal y Tecnología de Carnes, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile*.
- RUIZ, I. 1997.** Conceptos generales del rol de la pradera en la producción de leche. En: *Serie de Simposio y Compendios*. Sociedad Chilena de Producción Animal. 5: 13-37.

- SMITH, D. 1973.** The non-structural carbohydrates. Chemistry and Biochemistry of Herbage, vol. 1. Academic Press, London. Pp. 106-156.
- STEVENSON, M. ; WILLIAMSON, N. ; RUSSELL, D. 1993.** Nutrient balance in the diet of spring-calving, pasture-fed dairy cows. New Zealand Veterinary Journal. 51-2 : 81-88.
- STEWART, C. 1977.** Factors affecting the cellulolytic activity of rumen contents. Applied and Environmental Microbiology. 33 : 497-502.
- SUTTON, J. 1972.** In vivo measurements of energy supply and protein synthesis in the rumen. Tracer studies on non-protein nitrogen for ruminants.
- TERRY, D. 2003.** Improving animal agriculture through biotechnology. <<http://usinfo.state.gov/journals/ites/0903/ijee/etherton.htm>>.
- ULYATT, M. 1983.** Plant fibre and regulation of digestion in the ruminant. Fibre in human and animal nutrition. The Royal Society of New Zealand. Wellington, New Zealand.
- ULYATT, M. ; WAGHORN, G. 1993.** Limitations to high levels of dairy production from New Zealand pastures. Department of Agricultural and Horticultural Systems Management, Massey University.
- VAN SOEST, P. ; ROBERTSON, J. ; LEWIS, B. 1991.** Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. Journal of Dairy Science. 74 : 3358-3597.

- VAN SOEST, P. 1994.** Nutritional ecology of the ruminant, 2nd edition. Cornell University Press, Ithaca, New York.
- VAN VUUREN, A. ; TAMMINGA, S. ; KETELAAR, R. 1990.** Ruminal availability of nitrogen and carbohydrates from fresh and preserved herbage in dairy cows. Netherlands Journal of Agricultural Science. 38 : 499-512.
- VARGA, G. ; KOLVER, E. 1997.** Microbial and animal limitations to fibre digestion and utilization. Journal of Nutrition. 5 : 819-823.
- VERITE, R. ; Journet, M. 1970.** Influence de la teneur en eau et de la déshydratation de l'herbe sur sa valeur alimentaire pour les vaches laitières. Annales de Zootechnie. 19 : 255-268.
- WAGHORN, G, 1987.** Changes in rumen digesta of cows during a restricted eating period when fed fresh red clover, lucerne or lucerne hay. New Zealand Journal of Agricultural Research. 29 : 233-241.
- WAGHORN, G.; SHELTON, I.; THOMAS, V. 1989.** Particle breakdown and rumen digestion of fresh ryegrass and lucerne fed to cows during a restricted feeding period. British Journal of Nutrition. 61 : 409-423.
- WAGHORN, G. ; CARADUS, J. 1994.** Screening white clover cultivars for improved nutritive value – development of a method. Proceedings of the New Zealand Grassland Association. 56 : 49-53.
- WAGHORN, G, 1996.** Condensed tannins and nutrient absorption from the small intestine. Animal Science Research and Development. Proceedings of Canadian Society of animal Science meeting. Lethbridge, Canada.

WAGHORN, G, 2002. Can forages match concentrate diets for dairy production? Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production. 62 : 261-266.

WAGHORN, G.; BURKE, J.; KOLVER, E. 2006. Principles of feeding value. 60p.

WATTIAUX, M. A.; ARMENTANO, L. E. 2003. Metabolismo de carbohidratos en vacas lecheras. Instituto Babcock para la Investigación y Desarrollo Internacional de la Industria Lechera. Universidad de Wisconsin-Madison.

WEISS, W. 1994. Estimation of digestibility of forages by laboratory methods. Forage Quality, Evaluation and Utilization. American Society of Agronomy. Madison, Wisconsin, USA.

WILSON, J.; HATTERSLEY, P. 1989. Anatomical characteristics and digestibility of leaves of Panicum and other grass genera of C4 photosynthetic pathway. Australian Journal of Agricultural Research 40: 125-136.

WILSON, J. 1993. Organization of forage plant tissues. Forage cell wall structure and digestibility. Pp. 1-32.

WILSON, J.; MOLLER, S. 1993. Imbalances in New Zealand pastures for dairy cows. Improving the quality and intake of pasture-based diets for lactating dairy cows. Department of agricultural and Horticultural Systems management, Massey University.

WILSON, J. 1994. Cell wall characteristics in relation to forage digestion by ruminants. Journal of Agricultural Science, Cambridge 122: 173-182.

WILSON, J.; KENNEDY, P. 1996. Plant and animal constraints to voluntary feed intake associated with fiber characteristics and particle breakdown and passage in ruminants. *Australian Journal of Agricultural Research* 47: 199-225.

ANEXOS

ANEXO 1 Frasco de 50 ml usado en la incubación.



ANEXO 2 Máquina para moler marca Kenwood.



ANEXO 3 Frascos al interior de la incubadora.



ANEXO 4 Sobrenadante obtenido después de centrifugar.



ANEXO 5 Filtrado para determinar degradación de la MS.



ANEXO 6 Medición de pH.



ANEXO 7 Cinética degradativa de la materia seca (promedio y desviación estándar) de tres dietas distintas incubadas de forma *in vitro* en el tiempo (% MS degradada). Incubaciones realizadas en Chile.

Hora	Tratamiento	Incubación 1	Incubación 2	Incubación 3	Media	Desviación Estándar
0	1	25,93	25,67	26,89	26,16	± 0,65
	2	24,62	33,48	20,21	26,10	± 6,76
	3	41,36	38,03	21,90	33,76	± 10,4
2	1	28,62	20,74	31,71	27,02	± 5,66
	2	31,52	30,12	27,92	29,85	± 1,82
	3	47,18	34,74	35,03	38,98	± 7,10
6	1	45,95	53,21	44,47	47,88	± 4,67
	2	48,06	54,22	41,51	47,93	± 6,36
	3	56,13	61,63	51,11	56,29	± 5,26
12	1	76,67	78,05	77,81	77,51	± 0,74
	2	74,75	75,82	62,93	71,17	± 7,15
	3	78,74	72,55	63,21	71,50	± 7,82
24	1	85,82	88,12	84,03	85,99	± 2,05
	2	83,27	86,89	73,72	81,29	± 6,80
	3	87,92	85,84	78,08	83,95	± 5,18

Tratamiento 1: Solo pradera; **Tratamiento 2:** Pradera + concentrado fibroso; **Tratamiento 3:** Pradera + concentrado amiláceo.

ANEXO 8 Cinética degradativa de la materia seca (promedio y desviación estándar) de cuatro dietas distintas incubadas de forma *in vitro* en el tiempo (% MS degradada). Incubaciones realizadas en Nueva Zelanda.

Hora	Tratamiento	Incubación 1	Incubación 2	Incubación 3	Media	Desviación Estándar
0	1	24,96	20,95	22,18	22,69	± 2,058
	2	13,03	14,65	12,22	13,30	± 1,237
	3	17,12	16,71	17,53	17,12	± 0,406
	4	31,00	24,85	22,72	26,19	± 4,300
2	1	21,42	29,97	23,13	24,84	± 4,523
	2	18,04	ND	19,01	22,87	± 7,555
	3	16,38	13,25	15,10	14,91	± 1,576
	4	25,20	24,69	24,07	24,65	± 0,570
4	1	30,17	28,11	29,42	29,23	± 1,043
	2	19,21	22,04	21,27	20,84	± 1,466
	3	22,88	23,68	22,47	23,01	± 0,615
	4	27,82	33,42	31,60	30,94	± 2,856
6	1	36,81	26,33	38,41	33,85	± 6,562
	2	29,87	35,76	31,68	32,43	± 3,017
	3	30,18	33,22	28,38	30,59	± 2,446
	4	38,95	36,60	36,53	37,36	± 1,376
8	1	42,84	42,75	36,29	40,63	± 3,753
	2	39,35	38,99	36,45	38,27	± 1,581
	3	33,71	40,34	33,84	35,96	± 3,793
	4	42,26	35,71	41,71	39,90	± 3,635
10	1	58,96	50,96	42,66	50,86	± 8,149
	2	43,08	43,20	41,22	42,50	± 1,112
	3	40,79	41,28	45,40	42,49	± 2,528
	4	42,94	43,17	44,63	43,58	± 0,920
12	1	50,10	51,41	52,45	51,32	± 1,181
	2	44,31	39,08	42,64	42,01	± 2,670
	3	37,93	36,69	39,40	38,01	± 1,353
	4	44,71	41,25	45,07	43,67	± 2,111
24	1	55,90	52,67	52,56	53,71	± 1,900
	2	52,95	49,51	45,95	49,47	± 3,496
	3	50,98	50,83	51,38	51,06	± 0,284
	4	44,91	48,94	41,63	45,16	± 3,665

Tratamiento 1: Solo pradera; **Tratamiento 2:** Pradera + concentrado fibroso;

Tratamiento 3: Pradera + concentrado amiláceo; **Tratamiento 4:** Solo alfalfa.

ND: No determinado.

ANEXO 9 Cinética degradativa de la materia seca, valores promedios para 4 dietas distintas incubadas de forma *in vitro*. Nueva Zelandia.

Hora	Pradera		Pradera + conc. fibroso		Pradera + conc. amiláceo		Alfalfa		Sig
0	22,70	a	13,30	b	17,12	b	26,19	a	**
2	24,84		22,88		14,91		24,65		n.s
4	29,23	a	20,84	b	23,01	b	30,94	a	**
6	33,85		32,43		30,59		37,36		n.s
8	40,63		38,27		35,96		39,90		n.s
10	50,86		42,50		42,49		43,58		n.s
12	51,32	a	42,01	b	38,01	c	43,68	b	**
24	53,71	a	49,47	a b	51,06	a	45,16	b	*

Letras distintas en la fila indican diferencias estadísticamente significativas: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; n.s. $P > 0,05$; Sig.: significancia.

ANEXO 10 Variación de pH (promedio y desviación estándar) de tres dietas distintas incubadas de forma *in vitro* en el tiempo. Incubación realizada en Chile.

Hora	Tratamiento	Incubación 1	Incubación 2	Incubación 3	Media	Desviación Estándar
0	1	6,79	6,82	6,82	6,81	± 0,017
	2	6,83	6,87	6,85	6,85	± 0,020
	3	6,86	6,93	6,90	6,90	± 0,035
2	1	6,72	6,72	6,72	6,72	± 0,000
	2	6,74	6,71	6,70	6,72	± 0,021
	3	6,77	6,73	6,75	6,75	± 0,020
6	1	6,59	6,52	6,58	6,56	± 0,038
	2	6,46	6,41	6,61	6,49	± 0,104
	3	6,51	6,45	6,44	6,47	± 0,038
12	1	6,00	6,20	6,34	6,18	± 0,171
	2	5,76	6,06	5,89	5,90	± 0,150
	3	5,89	5,89	6,01	5,93	± 0,069
24	1	5,90	6,21	5,91	6,01	± 0,176
	2	5,54	5,55	5,64	5,58	± 0,055
	3	5,61	5,58	5,77	5,65	± 0,102

Tratamiento 1: Solo pradera; **Tratamiento 2:** Pradera + concentrado fibroso; **Tratamiento 3:** Pradera + concentrado amiláceo.

ANEXO 11 Variación de pH (promedio y desviación estándar) de cuatro dietas distintas incubadas de forma *in vitro* en el tiempo. Incubación realizada en Nueva Zelanda.

Hora	Tratamiento	Incubación 1	Incubación 2	Incubación 3	Media	Desviación Estándar
0	1	7,34	7,40	7,23	7,323	± 0,086
	2	7,36	7,30	7,25	7,303	± 0,055
	3	7,29	7,33	7,36	7,327	± 0,035
	4	7,24	7,16	7,26	7,220	± 0,053
2	1	6,60	6,71	6,76	6,690	± 0,082
	2	6,74	6,72	6,85	6,770	± 0,070
	3	6,68	6,69	6,86	6,743	± 0,101
	4	6,80	6,83	6,76	6,797	± 0,035
4	1	6,68	6,63	6,54	6,617	± 0,071
	2	6,56	6,56	6,51	6,543	± 0,029
	3	6,64	6,54	6,64	6,607	± 0,058
	4	6,54	6,58	6,64	6,587	± 0,050
6	1	6,36	6,32	6,28	6,320	± 0,040
	2	5,98	6,13	6,09	6,067	± 0,078
	3	6,24	6,26	6,26	6,253	± 0,012
	4	6,41	6,39	6,41	6,403	± 0,012
8	1	5,88	6,03	6,43	6,113	± 0,284
	2	5,69	5,70	5,74	5,710	± 0,026
	3	5,86	5,90	6,00	5,920	± 0,072
	4	6,12	6,74	6,24	6,367	± 0,329
10	1	6,30	6,09	6,09	6,160	± 0,121
	2	5,56	5,53	5,41	5,500	± 0,079
	3	5,95	5,94	5,91	5,933	± 0,021
	4	6,18	6,28	6,21	6,223	± 0,051
12	1	5,89	5,77	5,96	5,873	± 0,096
	2	5,47	5,41	5,41	5,430	± 0,035
	3	5,72	5,76	5,62	5,700	± 0,072
	4	6,64	6,19	6,20	6,343	± 0,257
24	1	5,89	5,93	5,84	5,887	± 0,045
	2	5,23	5,27	5,24	5,247	± 0,021
	3	5,30	5,31	5,28	5,297	± 0,015
	4	6,30	6,43	6,21	6,313	± 0,111

Tratamiento 1: Solo pradera; **Tratamiento 2:** Pradera + concentrado fibroso;

Tratamiento 3: Pradera + concentrado amiláceo; **Tratamiento 4:** Solo alfalfa.

ANEXO 12 Variación de pH promedio para 4 dietas distintas incubadas de forma *in vitro*.

Hora	Pradera		Pradera + conc. fibroso		Pradera + conc. amiláceo		Alfalfa		Sig
0	7,32		7,30		7,33		7,22		n.s
2	6,69		6,77		6,74		6,80		n.s
4	6,62		6,54		6,61		6,59		n.s
6	6,63	ab	6,07	c	6,25	b	6,40	a	**
8	6,11	ab	5,71	b	5,92	b	6,37	a	*
10	6,16	a	5,50	c	5,93	b	6,22	a	**
12	5,87	b	5,43	c	5,70	b c	6,34	a	**
24	5,89	b	5,25	c	5,30	c	6,31	a	**

Letras distintas en la fila indican diferencias estadísticamente significativas: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; n.s. $P > 0,05$; Sig.: significancia.

ANEXO 13 Producción neta de Amonio, valores promedios para 4 dietas distintas incubadas de forma *in vitro*.

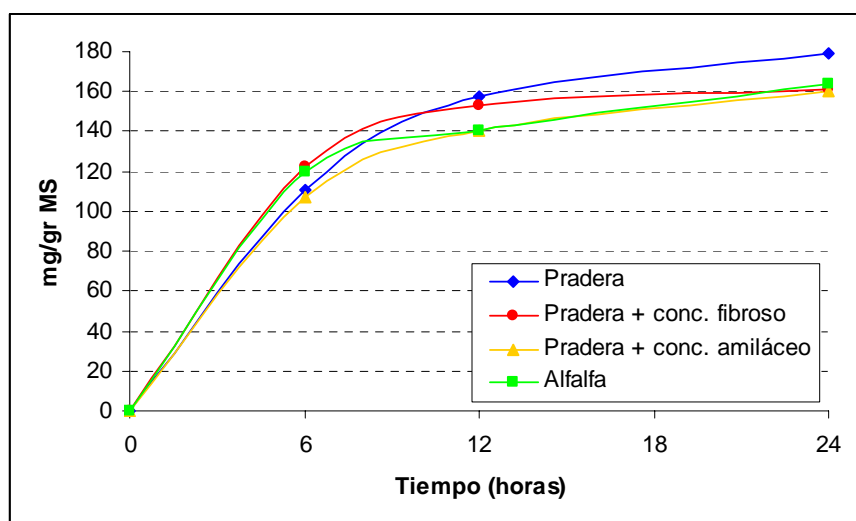
Hora	Pradera		Pradera + conc. fibroso		Pradera + conc. amiláceo		Alfalfa		Sig
0	5,93	a	6,41	a	6,41	a	3,96	b	**
2	15,13	a	12,69	b	12,70	b	9,64	c	**
4	14,07		10,88		12,95		11,87		n.s
6	10,57	b	0,71	c	5,13	c	16,44	a	**
8	8,12	b	0,72	c	2,64	c	17,55	a	**
10	11,55	b	0,73	d	4,87	c	17,95	a	**
12	15,35	b	3,64	d	5,61	c	20,13	a	**
24	27,37	a	9,56	d	17,51	c	23,84	b	**

Letras distintas en la fila indican diferencias estadísticamente significativas: * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; n.s. $P > 0,05$; Sig.: significancia.

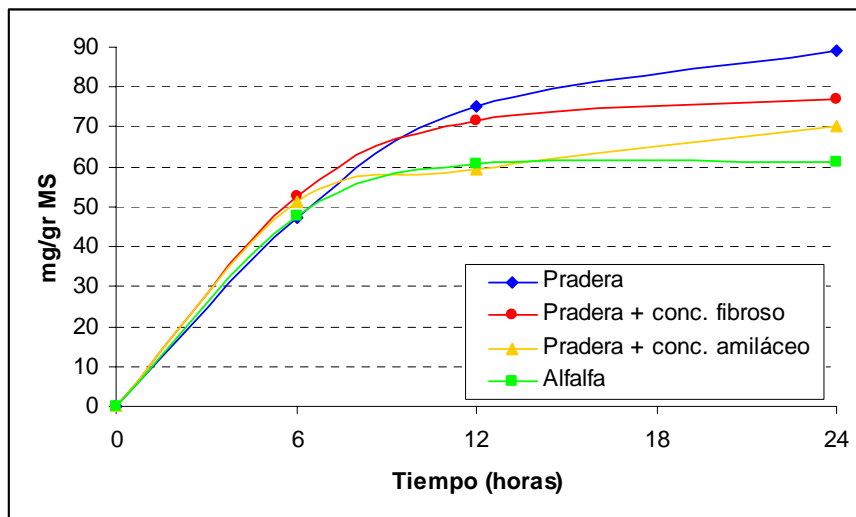
ANEXO 14 Producción de ácidos grasos volátiles (mg/gMS). Valores promedio para las 12 horas de incubación.

		AGV (mg/gMS)			
		0 h	6 h	12 h	24 h
Pradera	Acético	0	110	157	179
	Propiónico	0	47	75	89
	Butírico	0	30	53	61
	Menores	0	8	15	23
Pradera + concentrado fibroso	Acético	0	122	153	160
	Propiónico	0	52	72	77
	Butírico	0	32	49	58
	Menores	0	6	12	13
Pradera + concentrado amiláceo	Acético	0	107	140	159
	Propiónico	0	51	59	70
	Butírico	0	34	56	74
	Menores	0	7	12	19
Alfalfa	Acético	0	120	140	163
	Propiónico	0	47	61	61
	Butírico	0	21	32	36
	Menores	0	12	17	24

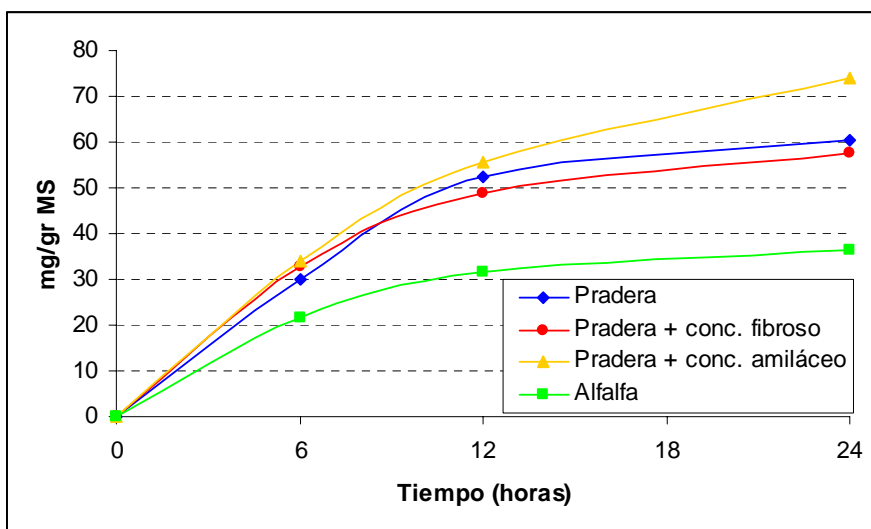
ANEXO 15 Producción neta total de ácido acético (mg/gMS) producida cuando 4 dietas distintas fueron evaluadas de forma *in vitro*.



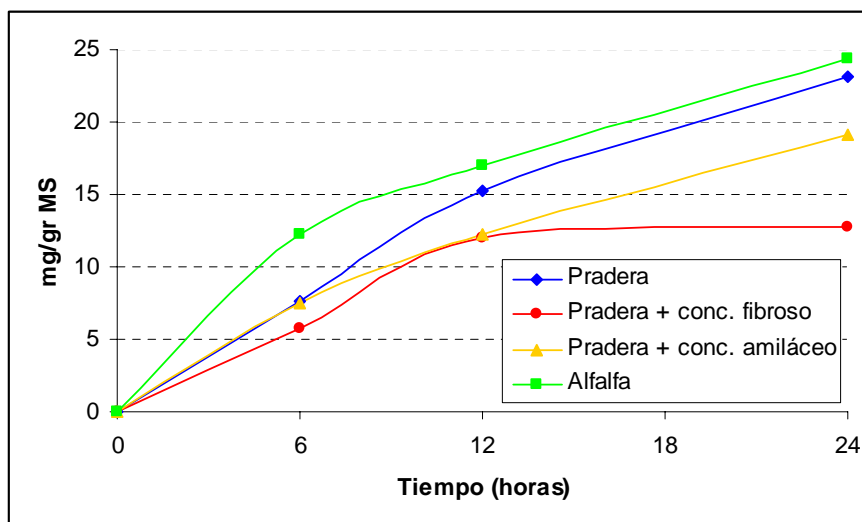
ANEXO 16 Producción neta total de ácido propiónico (mg/gMS) producida cuando 4 dietas distintas fueron evaluadas de forma *in vitro*.



ANEXO 17 Producción neta total de ácido butírico (mg/gMS) producida cuando 4 dietas distintas fueron evaluadas de forma *in vitro*.



ANEXO 18 Producción neta total de ácidos grasos menores (mg/gMS) producida cuando 4 dietas distintas fueron evaluadas de forma *in vitro*.



ANEXO 19 Producción neta total de ácidos grasos volátiles (mg/gMS) después de 6, 12 y 24 horas (h) y tasas de producción (mg/gMS/h) entre 0 – 6 h, 6 – 12 h, 12 – 24 h y 0 – 24 h.

Dieta	AGVNeto total (mg/gMS)			Tasas de producción (mg/gMS/h)			
	6 h	12 h	24 h	0 - 6	6 - 12	12 - 24	0 - 24
Pradera	195	297	352	32,5	17	4,6	14,7
Pradera + conc. fibroso	214	284	308	35,7	11,7	2	12,8
Pradera + conc. amiláceo	200	262	323	33,3	10,3	5	13,5
Alfalfa	201	241	285	33,5	6,7	3,7	11,9