

Artículo Invitado: Simulación de la digestión ruminal por el método de la producción de gas*

M. de los A. Bruni** y P. Chilibroste

Departamento de Producción Animal y Pasturas -EEMAC, Facultad de Agronomía,
Universidad de la República. Uruguay

Invited paper: Simulation of ruminal digestion by gas production method

ABSTRACT: Different systems have been proposed to measure the accumulated gas production in forages and concentrates digestion kinetics studies. In this paper, the development, applications and limitations of the gas production technique (GPT), are discussed. Additionally, practical applications of the GPT are showed, including evaluation of alfalfa (*Medicago sativa*) silage, supplemented with rapidly fermentable energy, which illustrates the GPT potential to evaluate fermentability of forage's soluble fractions.

Palabras clave: Ruminal digestion, gas production, rumen feeds

©2001 ALPA. Todos los derechos reservados

Arch. Latinoam. Prod. Anim. 2001. 9(1): 43-51

RESUMEN: Diferentes sistemas han sido propuestos para medir la producción acumulada de gas, en estudios de cinética de digestión de forrajes y concentrados. En este material se presenta el desarrollo de la técnica de producción de gas (TPG), así como sus principales aplicaciones y limitaciones. Adicionalmente se presenta aplicaciones prácticas de la técnica, incluyendo evaluaciones de ensilajes de alfalfa (*Medicago sativa*) y diferentes estrategias de suplementación con energía rápidamente fermentable, que ejemplifican como la TPG puede ser utilizada para la evaluación de las fracciones solubles de los forrajes.

Key words: Digestión ruminal, producción de gas, alimentación de rumiantes

Introducción

El valor nutritivo de los alimentos se encuentra determinado por la biodisponibilidad de nutrientes y dinámica de los procesos de solubilización e hidrólisis en el tracto gastrointestinal.

Los parámetros de la cinética de fermentación describen la digestión y caracterizan propiedades intrínsecas del alimento, que limitan su disponibilidad para el rumiante, determinan la proporción de los nutrientes consumidos que pueden ser absorbidos y utilizados por el animal y dependen de un activo crecimiento y desarrollo de la población microbiana del rumen. La degradación de un alimento resulta de fuerzas competitivas que actúan simultáneamente, tasa de pasaje y tasa de degradación (Ellis, 1978; Van Soest, 1994; Mertens, 1993).

La medición de las tasas de digestión resulta cada vez más importante, debido al avance ocurrido en los nuevos sistemas de alimentación, (Fox *et al.*, 1992; Russel *et al.* 1992; Sniffen *et al.* 1992; NRC,1996) en los que la disponibilidad de nutrientes a nivel ruminal, es calculada en base a la competencia entre tasa de digestión (K_d) y tasa de pasaje (K_p). El sistema de Cornell divide los carbohidratos en cuatro fracciones o pools (A, B₁, B₂ y C) y utiliza el tamaño y las tasas de digestión de esas fracciones con el objetivo de predecir la disponibilidad de nutrientes a nivel ruminal.

La mayoría de los procedimientos *in vitro* desarrollados hasta el momento miden la desaparición de sustrato en un punto final de medida. Con el objetivo de obtener sistemas reproducibles y repetibles, se han propuesto sistemas estáticos y estandarizados. Para el estudio de la digestión ruminal, la mayoría de los sistemas utilizan inóculo microbiano.

*Conferencia presentada en la XVI Reunión de ALPA en Montevideo, Uruguay Marzo de 2000

**E-mail: magela@eemac.edu.uy

Recibido Agosto 02, 2000.

Aceptado Marzo 15, 2001

Dado que la actividad microbiana, incluye la formación de biomasa microbiana con la consecuente captura de N, estos sistemas presentan limitaciones para medir la degradación de los componentes nitrogenados. Consecuentemente existe una tendencia a la sustitución de microbios por enzimas a pesar de que éstas pueden ser inactivadas por la presencia de sustancias antinutricionales, o la presencia de fibra (Boisen and Eggum, 1991). En algunos casos excepcionales puede ocurrir lo mismo con los inóculos microbianos, en situaciones de sustrato limitante, donde ocurre lisis microbiana seguida por una inactivación.

Las técnicas *in vitro* o *in situ* empleadas en estudios de cinética de digestión, basadas en análisis de residuos no digeridos o fermentados, a diferentes tiempos de incubación, presentan una serie de desventajas, entre las que se puede mencionar, alto costo, no es posible determinar el rol de los componentes solubles del forraje y es muy difícil el estudio de las fases tempranas de fermentación (Pell y Schofield, 1993).

De manera alternativa a la desaparición de sustrato, se ha propuesto la medición de la producción acumulada de gas, como indicador del metabolismo del carbono, centran-do su atención en la acumulación de los productos finales de la fermentación: CO₂, CH₄ y ácidos grasos volátiles (AGV). Este sistema presenta la ventaja de que el producto final que se mide (gas) es resultado directo del metabolismo microbiano, en lugar de registrar la desaparición de sustrato. Una segunda ventaja es que la formación de productos finales de la fermentación, pueden ser monitoreado a intervalos cortos de tiempo y por lo tanto la cinética de fermentación puede ser descrita con precisión.

Cuando se quiere simular un sistema continuo como lo es la degradación de los alimentos en el rumen, las determinaciones de las concentraciones de productos finales de la fermentación o del sustrato remanente, posteriores a un cierto período de incubación es inadecuado. La técnica de producción de gas aparece como un sistema *in-vitro* de alta capacidad operativa y bajo costo, en la cual los perfiles de producción de gas pueden ser generados utilizando sistemas semi o totalmente automatizados. La determinación de los productos finales de la fermentación y los residuos no fermentados, en conjunto con los perfiles de producción de gas, permite estimar la tasa, extensión y eficiencia de la fermentación.

Desarrollo de la Técnica de Producción de Gas

La medición de la producción de gas como una aproximación a la fermentación ruminal no es nueva: McBee (1953) describió un método manométrico para medir la producción de gas generado por una mezcla de bacterias ruminales que posteriormente fue sufriendo diferentes modificaciones. Menke y colaboradores (1979, 1988) en Alemania describieron un sistema *in vitro* en el cual la producción de gas de un sustrato es usada para la predicción de la digesti-

bilidad y el contenido de energía metabolizable. El método utiliza una jeringa en la cual se incuba el sustrato en un medio buffereado e inóculo de fluido ruminal. La producción de gas es medida a diferentes intervalos de tiempos por la posición del pistón en la jeringa. Recientemente en diferentes países se ha trabajado en métodos para simplificar y computarizar la medición de gas (Pell and Schofield, 1993; Theodorou *et al.*, 1994; Cone *et al.*, 1994; Mauricio *et al.*, 1999).

Para medir la producción de gas se han usado diferentes aproximaciones: 1) a presión atmosférica constante 2) a volumen fijo y 3) una combinación de las anteriores mediante la medición del incremento de volumen necesario para causar un cambio definido de presión. Los métodos manométricos iniciales y sus modificaciones (Hungate, 1955; Beuvink *et al.*, 1992) son ejemplos de la primera aproximación, midiendo la cantidad de agua desplazada debido a la acumulación de gas. Otro ejemplo es el desarrollado en Alemania por Menke *et al.*, 1979 y sus modificaciones, (Menke and Steingass, 1988; Blummel and Ørskov, 1993). La sensibilidad de la jeringa utilizada para la medición en estas técnicas es baja. Los métodos manométricos fueron superados por el desarrollo de transductores de presión a pequeña escala con el cual es posible monitorear la producción de gas manualmente (Theodorou *et al.*, 1994) o en forma totalmente automatizado (Beuvink *et al.*, 1992; Pell and Schofield, 1993).

Los transductores de presión ofrecen una vía sencilla y precisa de medir la producción de gas. La diferencia más importante en las variantes reportadas (Pell and Schofield, 1993; Theodorou *et al.*, 1994; Cone *et al.*, 1996 y Mauricio *et al.*, 1999), radica en la evacuación o no, del gas generado durante la fermentación entre los intervalos de medición. Theodorou *et al.* (1994; 1995) reportaron perturbaciones en el crecimiento microbiano por no extraer el gas generado en los diferentes intervalos de tiempo, mientras que los investigadores de la Universidad de Cornell no (Schofield and Pell, 1995). Otra diferencia encontrada en los instrumentos es el principio básico de los sensores unos leen por diferencias con la presión atmosférica (tipo gauge) y otros son los sensores de vacío, los cuales dan lecturas independientes de la presión atmosférica. Todos los transductores miden, las diferencias de presión que se generan en el espacio que queda libre dentro de la botella de incubación, descontándole el espacio ocupado por el tapón y la muestra incubada en la fase líquida.

Es muy importante el ajuste del volumen de las botellas de incubación así como también del transductor debido a que si no se calibran bien, pueden generarse errores estándar altos afectando la calidad de las medidas a obtener. (Pell and Schofield, 1993; Schofield and Pell 1995a; Schofield and Pell, 1995b). El sistema *in vitro* puede verse afectado por el medio de cultivo utilizado. Particularmente importante es la elección del buffer, y ya que puede afectar la cantidad de gas que se mide, debido a que al CO₂ generado como producto de la fermentación e, se le puede agregar el

generado por la reacción de los productos finales de la fermentación con el bicarbonato del buffer. Beuvink *et al* (1992), encontraron que la relación entre producción de gas y desaparición de sustrato, puede ser no lineal cuando el pH se ubica por debajo de 6.2, por lo que aparece como imprescindible la modificación del buffer para asegurar que el pH permanezca por encima de 6.2 durante la fermentación.

Para la determinación de la producción de gas es necesario considerar todos los factores que afectan a los sistemas *in vitro* en general, ya que sus efectos alteran tanto la actividad microbiana en forma directa como al gas generado durante la fermentación. Recientemente se ha publicado una exhaustiva revisión de los principios químicos y físicos que están asociados con el uso de la técnica de producción de gas (Theodorou *et al.*, 1998)

Limitaciones de la Técnica de Producción de Gas

Son varios los factores que afectan la medida de la producción de gas entre los que podemos destacar: la solubilidad de los gases en los líquidos, tipo de fermentación, producción de gas indirecta a partir del buffer del medio de cultivo, contenido de N de la muestra, tamaño de partícula, y procesamiento de la muestra.

Producción de ácidos grasos volátiles y concentración de N en la muestra: Las reacciones más importantes que se dan en la fermentación de los carbohidratos fueron resumidas por Wolin (1960) y Hungate (1966) de las que se puede concluir que la cantidad de gas producido depende de la cantidad de hexosas fermentadas, y la proporción molar de los diferentes AGV producidos. Cambios en el patrón de fermentación que incrementen la proporción de ácido butírico y acético y disminuya la proporción de propiónico, pueden resultar en un incremento en el volumen de gas. Contrariamente cambios en la estequiometría de las reacciones que aumenten la proporción de propiónico a expensas del butírico y acético, resultarían en menos producción de gas a partir de la fermentación. Por lo que la proporción molar de AGV debe ser tomada en cuenta cuando se realizan comparaciones entre perfiles de producción de gas provenientes de diferentes sustratos (Theodorou *et al.*, 1998).

Una de las limitaciones de la TPG, es que el cambio en el perfil de AGV puede causar alteraciones en la relación entre la desaparición de sustrato y la producción de gas, debido a que la producción de CO₂ durante la fermentación de un sustrato proviene de dos fuentes: directo de los pasos metabólicos como la descarboxilación oxidativa del piruvato y de las reacciones de los productos finales de la fermentación (AGV) con el bicarbonato del buffer (producción de gas indirecta) (Beuvink and Spoeltra, 1992). La complejidad de la estequiometría de las diferentes reacciones bioquímicas, que ocurren durante la fermentación, hace que se requiera mayor investigación en este punto, lo que dificulta la interpretación en cuanto al aporte de nutrientes.

Menke and Steingass (1988) sugirieron que el CO₂ producido puede ser capturado por el NH₄ y formar NH₄HCO₃, conduciendo a una subestimación de la cantidad de gas producido. Bianco (1997) reporta el mismo efecto, cuando se utilizó caseína para suplementar un sistema que estaba compuesto por pared celular y extractos de diferentes tipos de ensilajes de alfalfa. Chamberlain (1994) presentaron las curvas de producción de gas de compuestos químicos purificados, entre los que se encuentra la caseína y también se observa este efecto. Por otro lado, Bianco (1997) y Fernandez-Rivera (1998) cuantificaron la depresión de la producción de gas por la adición de caseína. Estos resultados sustentan la hipótesis de que la pérdida de uniformidad entre la producción de gas y desaparición de sustrato para diferentes especies se deba al menos en parte, a la proporción de proteína en la materia orgánica fermentada. Lo que indicaría que para utilizar esta técnica con el objetivo de predecir parámetros de valor nutritivo se deberían de utilizar estándares que sean representativos de grupos de muestras a evaluar, y realizar las correcciones necesarias sobre el volumen de gas producido, por la proporción de proteína en la materia orgánica fermentada

Modelación de los Perfiles de Producción de Gas

Las funciones matemáticas han sido largamente utilizadas en la ciencia animal y vegetal para cuantificar la relación entre el desarrollo de un organismo, órgano o tejido y el tiempo. Un buen resumen de las funciones de crecimiento más comúnmente utilizadas en el campo agrícola se han sido publicado por France y Thornley (1987). Generalmente la selección de un modelo es empírico, escogiéndose la forma de la función que mejor ajuste los datos obtenidos. Sin embargo, una función matemática puede caracterizar o describir procesos fisiológicos o bioquímicos que estén en la base explicativa del fenómeno observado y el valor de los parámetros ser un indicador de la dirección y magnitud de los procesos fundamentales. Por ejemplo autocatálisis produce crecimiento exponencial mientras que la limitación de sustrato o nutrientes, da lugar a crecimiento asintótico (France and Thornley, 1984). Como fue explicado en la sección anterior la producción de gas depende de una secuencia de procesos. Inmediatamente posterior a la incubación, el sustrato es parcialmente solubilizado y los componentes solubles rápidamente fermentados. Los componentes insolubles en tanto, requieren ser hidratados y colonizados por los microorganismos del rumen previo a ser fermentados. Los diferentes sustratos o sus componentes varían en el grado de resistencia a los procesos mencionados, dando lugar al ser incubados a perfiles de producción de gas completamente diferentes. La descripción matemática de los perfiles de producción acumulada de gas es una herramienta fundamental, no sólo para comparar sustratos o condiciones de fermentación, sino para obtener información de diferen-

tes fracciones nutricionalmente relevantes (Groot *et al.*, 1996; Cone *et al.*, 1997).

El método de elección del modelo de análisis depende del objetivo para el cual son obtenidos los datos, ranking de valor nutritivo para forrajes, investigación básica sobre la ecología de los microbios ruminales y química de los forrajes entre otros objetivos.

Los modelos matemáticos propuestos para modelar la producción de gas han evolucionado desde modelos simples que siguen una cinética de primer orden (Ørskov and Mc Donald, 1979), a modelos más sofisticados, en los que diferentes procesos pueden ser identificados (Beuvink and Kogut, 1993, France *et al.*, 1993; Schofield *et al.*, 1994; Groot *et al.*, 1996). La evolución de los modelos ha estado pautada por la evolución de la técnica de producción de gas: las técnicas iniciales generaban perfiles simples de producción de gas con pocas observaciones, mientras que los últimos desarrollos tecnológicos, completamente automatizados (Cone *et al.*, 1994; Davies *et al.*, 1995; Mauricio *et al.*, 1999) generan perfiles de producción de gas de alta resolución y detalle, los que requieren (y permiten) la utilización de modelos más flexibles que den cuenta de la variabilidad observada.

Con la aparición de los modelos multifásicos (Beuvink and Kogut, 1993; Schofield *et al.*, 1994; Groot *et al.*, 1996) se da una descripción más detallada de las tasas de degradación de las diferentes fracciones. La elección del modelo apropiado debe tener en cuenta el ajuste del modelo, y la interpretación biológica de los parámetros que arrojen esos modelos.

Schofield *et al.* (1994) proponen el modelo no lineal logístico con múltiples fases asumiendo que la tasa de producción de gas de un pool es proporcional a la masa microbiana y al nivel de sustrato disponible, y da un valor cuanti-

tativo satisfactorio de las fracciones que tienen un comportamiento diferencial.

$$V_i = V_p / \{1 + \exp(2+4Sp(Lp - t_i))\}^n$$

donde: V_i = volumen de gas al tiempo t_i , V = máximo volumen de gas del pool correspondiente, S = tasa constante, llamada tasa específica de producción de gas, L = es una constante de integración equivalente al término Lag. p = es utilizado para identificar los diferentes pools. n = número de pools.

Este modelo ha sido utilizado por los investigadores de la Universidad de Cornell, con el objetivo de comparar cinéticas de fermentación de forrajes y de fracciones de estos como fibra detergente neutro, componentes solubles en detergente neutro y otros carbohidratos con comportamiento nutricional diferencial.

Bruni (1997), Bianco (1997), Pichard *et al.* (1997) y Bruni y Pichard (1998), utilizaron este modelo, para describir la producción de gas de diferentes tratamientos de pared celular aislada de diferentes especies como sustrato estándar.

En el Cuadro 1 se presenta los valores de los parámetros de producción de gas de pared celular aislada de alfalfa y dactylis con o sin agregado de glucosa (Pichard *et al.*, 1997).

En este caso se optó por el ajuste con dos pools cuando el sustrato era pared celular aislada y tres pools cuando la glucosa fue adicionada para tomar en cuenta su contribución en los estadios tempranos de la digestión. La aparición del pool A en los tratamientos que incluyeron glucosa muestra que la energía rápidamente fermentable (glucosa) logró ser identificada como un pool independiente con un comportamiento diferencial a los demás pools. El modelo logístico multifásico permitiría representar diferente comportamiento nutricional de diferentes fracciones (Pichard *et al.*,

Cuadro 1. Parámetros de la cinética de producción de gas *in vitro* estimados a partir del modelo multifásico logístico (Pichard *et al.*, 1997).

	Pared celular de Alfalfa	Pared celular de Alfalfa + glucosa	Pared celular de Dactylis	Pared celular de Dactylis + glucosa
Volumen de gas (mL/g Materia fermentada)				
Pool A	-	88	-	72
Pool B1	212	203	182	141
Pool B2	183	173	169	156
L (Tiempo lag) (h)				
Pool A	-	0	-	0
Pool B1	5.5	3.6	6.6	4.7
Pool B2	10.5	10.9	18.6	14.2
Tasa específica				
Pool A	-	0.145	-	0.138

Cuadro 2. Valores estimados de los parámetros del modelo multifásico propuesto por Groot *et al.*, 1996.

Substrato	Fase	A (mL g ⁻¹ MO)	C Horas	B	T _{tasa M} Horas	Tasa M h ⁻¹
Raigrás	1	313	14	3.52	18	0.140
FDN	2	118	48	3.25	61.6	0.037
Sorgo	1	126	12	2.29	13.5	0.095
	2	151	52	3.73	71.7	0.038
Raigrás	1	44	1	2.40	0.1	1.949
	2	152	9	5.26	10.2	0.137
Trébol	1	90	2	1.10	0.2	0.557
Rojo	2	120	9	3.09	11.1	0.188

T_{tasa M} = tiempo en horas al cual ocurre la tasa máxima de fermentación, Tasa M = valor estimado de la tasa máxima de fermentación. Otros parámetros, ver texto.

1997); azúcares solubles que normalmente están en el contenido celular, considerados como de muy rápida digestión (pool A), pectinas, almidón, fructosanos, gluco y galacto mananos y la hemicelulosa o celulosa lábiles considerados como insolubles pero rápidamente fermentados (pool B1), los polisacáridos más refractarios de la matriz de la pared celular los cuales son lentamente fermentados (pool B2) y un pool de componentes no disponibles, como pared celular lignificada y artefactos refractarios (pool C) el cual debe ser sustraído de la materia fermentable para el análisis de la cinética (Waldo and Smith, 1971).

Groot *et al.* (1996), postularon un modelo flexible para parametrizar las curvas de producción de gas y cuantificar el número de fases emergentes del perfil observado:

$$G = \sum_{i=1}^n \frac{A_i}{1 + \frac{C_i^{B_i}}{t^{B_i}}}$$

donde: i indica el número de fases en el perfil (i = 1, n), G (mL g⁻¹ MO) es la producción acumulada de gas al tiempo t por gramo de materia orgánica (MO) incubada, A_i (mL g⁻¹ MO) representa la producción de gas asintótica, C_i es el tiempo de incubación (horas) al cual la mitad de A es producida (tiempo medio), y B_i es una constante que da cuenta de la pendiente de la curva. La tasa fraccional de digestión y el tiempo al cual la tasa máxima de digestión ocurre pueden ser estimados a partir de los parámetros B y C. Este modelo ha sido ampliamente utilizado tanto para comparar substratos (Williams *et al.*, 1996), para determinar cambios en la microflora intestinal de cerdos como resultado de la utilización de diferentes fuentes alimenticias (Houdijk, 1998), así como para evaluar cambios en la fermentabilidad del contenido ruminal debido al efecto de diferentes tiempos de pastoreo y ayuno en vacas lecheras (Chilibroste *et al.*, 1999). Groot *et al.* (1996) trabajando con diferentes forrajes encontraron diferencias en el número de fases identificadas y en el valor de los parámetros para cada fase (Cuadro 2). Las muestras analizadas fueron: fibra detergente neutro (FDN) aislada de muestras de raigrás (raigrasNDF), tallos de sorgo

maduro (sorgo), rebrote joven de raigrás (raigrás) y plantas de trébol rojo (trébol rojo).

Las muestras de Raigrás y trébol rojo exhibieron una primer fase con una alta tasa de fermentación (Tasa M, Cuadro 2), lograda a pocos minutos de iniciada la incubación (T_{tasa M}, Cuadro 2), probablemente reflejando una alta concentración de carbohidratos solubles. Es interesante observar que la primer fase de las muestras de sorgo y raigrás FDN presentaron valores de producción de gas (A) y tiempo medio (C), similares a la segunda fase estimada para Raigrás y trébol rojo (Cuadro 2). Es probable que ambas fases estén asociadas a la fracción insoluble potencialmente degradable de la pared celular.

Los ejemplos mencionados ponen de relieve, el potencial de la utilización de modelos multifásicos para describir e investigar la asociación entre los perfiles de producción de gas con fracciones química o más importante aún nutricionalmente relevantes.

Aplicaciones de la Técnica de Producción de Gas

La técnica de medición de la producción de gas ha sido propuesta para evaluar el ranking del valor nutritivo en los planes de mejoramiento genético y la comprensión de las interacciones genotipo- ambiente de especies empleadas en los sistemas de producción animal.

Chamberlain (1994), utiliza la técnica de producción de gas como un indicador de la actividad microbiana, debido a que ésta es posible gracias a la energía disponible en rumen contenida en los alimentos. En este sentido la información que se puede obtener a partir de los datos de producción de gas resulta de gran utilidad dado el potencial de conocimiento del ecosistema ruminal

Una aproximación alternativa y poco explorada, constituye el empleo de sistemas de producción de gas *in vitro* como indicadores del status interno del rumen, reflejando por ejemplo cambios en el nivel de llenado y potencial fer-

Cuadro 3. Relación entre producción de gas y cantidad de FDN desaparecida (Bruni, 1997).

Pared celular con extractos de ensilaje	Coeficientes ₁				
	A	b	R ²	Sy.x	n
Láctico	65.82	451.44	0.94	7.89	47
Heteroláctico	29.63	470.27	0.95	8.00	43
Acético	40.77	473.97	0.95	6.85	49
Butírico	22.97	470.17	0.95	7.43	56

Referencias: 1 Modelo $y = a + bx$; y = Producción de gas (mL), x = g de FDN desaparecida; a = intercepto; b = coeficiente de regresión; R² = Coeficiente de determinación, Sy.x = error standard de estimación; n = número de observaciones.

mentativo producto de diferentes estrategias de alimentación (Chilibröste *et al.*, 1999), lo que podrían ser empleados para describir cambios en la capacidad digestiva *in vivo* o dilucidar limitaciones digestivas de un sustrato.

Existen numerosos trabajos en los que se ha presentado la comparación de datos obtenidos *in vitro* con los provenientes de experimentos *in situ*, *in vivo*, y composición química (Menke, 1979; Fernandez-Rivera, 1998; Blümmel y Orskov, 1993; Chilibröste *et al.*, 1998; Bruni, 1997; Pichard *et al.*, 1995; Pichard *et al.*, 1997).

Se encontró una alta correlación entre la producción de gas a las 24 h y la digestibilidad de la MO determinada *in vivo*. Sin embargo los alimentos de baja tasa de producción de gas presentan mayores valores de digestibilidad *in vivo* que los que sugieren los datos de producción de gas (Menke *et al.*, 1979).

Chilibröste *et al.* (1997), encontró estrechas correlaciones entre el tamaño de los pooles identificados mediante los datos de producción de gas y las fracciones nutricionalmente importantes determinadas mediante la técnica de la bolsa de nylon (fracción indegradable y soluble). Blümmel y Ørskov (1993) no encontraron buena correlación entre la tasa de producción de gas y de pérdida de materia seca obtenida por la técnica de la bolsa de nylon, no obstante se encontró alta correlación entre el total de producción de gas y consumo de materia seca, materia seca digestible y tasa de crecimiento de ovinos.

Cuando se comparan datos de producción de gas con datos *in vivo* también hay que hacer algunas puntualizaciones en primer lugar es muy difícil extraer el material soluble *in vivo* para ver como se comporta en el animal, así como también simular la reducción del tamaño de partícula y el pasaje *in vitro* sería un poco problemático. Más allá de estas consideraciones los datos de producción de gas pueden contribuir al entendimiento de la digestión ruminal, describir los alimentos y predecir a partir de estos datos la performance animal de forma más exacta.

Bruni (1995; 1997), trabajando con pared celular aislada y Pell and Schofield (1993) trabajando con alimentos completos, encontraron un ajuste lineal entre la producción de gas (PG) y la desaparición FDN. Sin embargo los valores de PG por gramo de FDN desaparecida no son coincidentes. Los valores reportados por Bruni, fueron superiores a los

reportados en otros estudios (Schofield *et al.*, 1994; Pell and Schofield, 1993; y Theodorou *et al.* 1994). No obstante, en experimentos donde se trabaja con sustratos purificados (Schofield *et al.*; 1994), los valores se aproximan y por otro lado los valores coinciden con cálculos teóricos reportados por Schofield and Pell (1995).

En el Cuadro 3 se presenta la relación encontrada entre producción de gas y FDN desaparecida en incubaciones de pared celular aislada con extractos de diferentes ensilajes.

Hay que considerar que cuando se comparan datos de desaparición de sustrato y de producción de gas se están comparando dos cosas diferentes, en el caso de los datos de desaparición sólo se plantea la desaparición de material insoluble, mientras que la producción de gas incluye la contribución del material insoluble y de la fracción soluble.

Blumel and Becker (1997), encuentran que la producción de gas de 200 mg de NDF es mayor que 200 mg de todo el forraje y sugieren que la eficiencia con la que el material fermentable es incorporado a las células microbianas es una explicación del mayor volumen de gas de la NDF.

La contribución de las fracciones solubles de los forrajes de alta calidad a la producción de gas, a la formación de la masa microbiana y al animal puede llegar ser mayor que la aportada por la fibra durante las primeras horas de fermentación. Los datos de producción de gas podrían dar una estimación del aporte de estos componentes usando la técnica de la sustracción. Para obtener estos resultados se fermenta todo el forraje y las fracciones por separado, (Residuos de la extracción con etanol, o residuos de extracción con detergente neutro -FDN-) el registro de la producción de gas y la posterior normalización de las curvas, representan la fermentación de las cantidades equivalentes de cada fracción. Sustrayendo punto a punto de la producción de gas de todo el forraje, la producción de gas generada por las fracciones separadas, daría las tasas de fermentación de pooles con diferentes comportamientos nutricionales. (Schofield *et al.*, 1994; Schofield and Pell, 1995 a; Bianco, 1997; Bruni, 1997; Doane, *et al.*, 1997; Groot *et al.*, 1996). En alguno de éstos se ha demostrado que los patrones de fermentación de los contenidos celulares aislados, presentan un perfil de producción de gas que se ajusta a un modelo de degradación de dos fases, sin embargo normalmente se asume que se de-

gradan rápida y completamente,. Una posible explicación es que las proteínas y los carbohidratos solubles difieren en su comportamiento de degradación y en la producción de gas potencial.

La aproximación de la sustracción de curvas para estimar la contribución de las diferentes fracciones, se basa en la asunción de que la digestibilidad de la fibra no se ve afectada por la presencia de compuestos inhibitorios que pueden estar presentes en el forraje completo. Si esta asunción no se cumple, la contribución a la producción de gas de la fracción fibrosa puede ser sobre estimada. Como consecuencia esta aproximación, no podría ser utilizada para alimentos que contienen compuestos inhibitorios tales como taninos alcaloides y saponinas los cuales están presentes en forrajes de origen tropical, (Van Soest, 1994). Por otro lado mediante el estudio y comparación de las digestibilidades de la fibra con y sin extracción provee de un mecanismo sencillo –mediante el uso de la TPG *in vitro* – para evaluar el efecto de tales compuestos sobre la digestión de la fibra.

Bruni (1997), evaluando cuatro tipos de ensilajes reconstituidos (pared celular estándar con extractos obtenidos de ensilajes) con características de fermentación láctica, heteroláctica, acética y butírica, encontró que la fracción líquida extraída de los diferentes tipos de ensilaje, afectaron las características de producción de gas. La producción total de gas y su tasa de producción, en los diferentes pooles fueron mayores en los casos en los que el extracto incubado presentaba mayor contenido de nutrientes, debido a una mejor fermentación en el ensilaje. El tratamiento con extracto de ensilaje láctico se comportó mejor que el resto, mientras que la pared celular incubada con extracto de ensilaje butírico fue el de peor comportamiento. En la Figura 1 se presenta los perfiles de producción de gas de los diferentes ensilajes.

El sistema de producción de gas permitió detectar diferentes calidades de ensilajes que no hubieran sido detectadas por, las determinaciones tradicionales de calidad de ensilajes, ya que en general la EN de los alimentos se estima en función del contenido de FDA.

En otro experimento (Bruni, 1997), que tenía por objetivo, evaluar el efecto de diferentes estrategias de suplementación con energía rápidamente fermentable, sobre los parámetros de la cinética de producción de gas de ensilajes de alfalfa, se registró la producción de gas de los ensilajes de alfalfa, con la adición de glucosa en diferentes estrategias y también se registró la curva de producción de gas de glucosa sola. Utilizando la técnica de sustracción de curvas se pudo obtener los efectos de las diferentes estrategias de suplementación sobre la cinética de fermentación de los ensilajes. En el Cuadro 4 se presenta los valores de los parámetros que surgen del ajuste de los datos al modelo logístico.

La suplementación afectó significativamente la tasa específica de producción de gas del pool rápido (S_A) y el tiempo Lag (L), mientras que la adición de glucosa promovió una mayor utilización del sustrato, debido a un aumento de la tasa específica de producción de gas (Contraste = Control

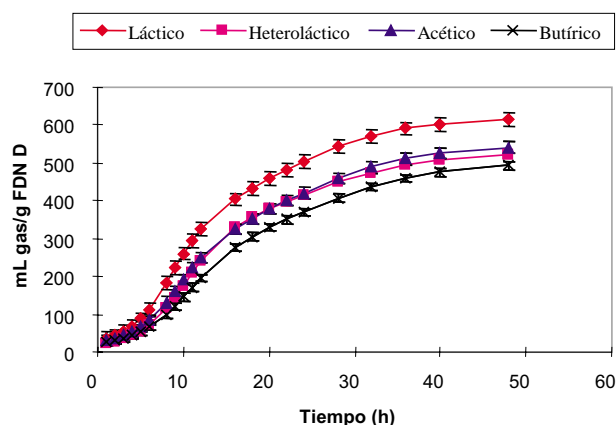


Figura 1. Producción de gas acumulada de diferentes ensilajes reconstituidos.

vs tratamientos suplementados). Los resultados demuestran que la energía es limitante para la utilización del sustrato bajo estudio. La mejora observada puede ser explicada por las características de los componentes no fibrosos del ensilaje: los carbohidratos rápidamente fermentables presentes en el forraje original han sido consumidos durante la fermentación en el proceso de ensilado, con lo que el ensilaje se convierte en un alimento deficitario en fuentes de energía rápidamente fermentable para los microorganismos ruminales. Cuando se adicionó glucosa en forma tardía se obtuvieron mayores tasas específicas de producción de gas del pool que se fermenta más rápidamente (S_A), comparado con los tratamientos de suplementación temprana. Esta situación podría ser explicada por el agotamiento de las escasas fuentes de energía rápidamente disponibles que contiene el ensilaje. Otra posible explicación es que la falta de energía se haga evidente tardíamente debido a que el sistema presentara condiciones de enzima limitante. El hecho de que en los sistemas *in vitro* se observen lag que son explicados por esta misma razón sustentan la hipótesis planteada anteriormente.

En este trabajo la técnica de producción de gas permitió evaluar el efecto de diferentes estrategias de suplementación sobre la cinética de producción de gas de ensilajes de alfalfa

Conclusiones

El objetivo principal de la evaluación de alimentos es predecir el aporte de nutrientes para el animal.

La mayor desventaja de las técnicas *in vitro* con respecto a las *in vivo* es la pérdida de la complejidad del animal en términos de las interacciones entre las subpoblaciones microbianas, causadas por la compartimentalización y estratificación. El rol de los métodos *in vitro* para la predicción del aporte de nutrientes contribuye al entendimiento de los me-

Cuadro 4. Media de mínimos cuadrados de parámetros de cinética de producción de gas de ensilajes de alfalfa.

	Parámetros ₁				
	V _A mL/gFDND	S _A (h ⁻¹)	V _B mL/gFDND	S _B (h ⁻¹)	L (h)
Tiempos de infusión de glucosa (h)					
Control s/ glucosa	241.19	0.104	318.11	0.031	5.03
0	259.17	0.104	308.26	0.030	4.80
3	245.56	0.110	321.38	0.032	4.90
6	253.94	0.113	330.44	0.031	5.26
0,3,6	249.97	0.109	316.77	0.031	4.58
0,1,2,3,4,5,6	248.58	0.112	318.11	0.031	4.65
4,5,6	220.61	0.119	339.03	0.033	4.91
P>F	0.29	0.05	0.29	0.23	0.10
Contrastes ₂					
C1	-	*	-	-	Ns
C2	-	**	-	-	Ns
C3	-	Ns	-	-	**
CME ₃	699.04	7.43*10 ⁻⁵	453.18	3.48*10 ⁻⁶	0.15

1 Parámetros obtenidos a partir del modelo logístico con dos pools: V = volumen de gas. S = tasa constante, llamada tasa específica de producción de gas. L = constante de integración equivalente al término Lag. A y B, son utilizados para denotar diferentes pools.

2 Contrastes: C1= Control vs tratamientos suplementados. C2= Suplementación tardía 6y 4,5, 6 vs suplementación temprana 0, 3. C3= Suplementación continua T6 vs suplementación a tiempo fijo, 0, 3, 6 T2 T3 T4

3 CME= cuadrado medio del error

P<0.1;**P<0.05; ns=no significativo.

canismos de los procesos digestivos más que dar una estrecha predicción del aporte de nutrientes.

Los datos obtenidos hasta el momento por diferentes investigadores, muestran que las medidas de producción de gas pueden ser usados para la evaluación de la calidad de los forrajes, especialmente de los componentes solubles, sin embargo se debe indicar que se necesita mayor investigación en las siguientes áreas 1) contribución de la proteína a la producción de gas, 2) efecto de la interacción de diferentes componentes de los alimentos sobre la cinética de producción de gas 3) vías por las cuales los modelos de producción de gas pueden ser usados para predecir la disponibilidad de nutrientes para los animales.

Literatura citada

- Beuvink, J.M. W. and Spoeltra, S.F. 1992. Interactions between substrate, fermentation end-products, buffering system and gas production upon fermentation of different carbohydrates by mixed rumen microorganisms *in vitro*. Applied Microbiology and Biotechnology 37:505-509.
- Beuvink, J.M. W. and Spoeltra, S.F. and Hogendorp, R.J., 1992. An automated method for measuring time-course of gas production of feedstuffs incubated with buffered rumen fluid. Netherland Journal of Agricultural Science 40:401-407.
- Beuvink, J.M.W. and Kogut, J. 1993. Modelling gas production kinetics of grass silage incubated with buffered ruminal fluid. J.Anim. Sci. 71: 1041-1046.
- Bianco A. 1997. Efecto del perfil nitrogenado de ensilaje de alfalfa, sobre la cinética de fermentación ruminal. Tesis presentada como requisito para la obtención del título de Magister en Producción Animal. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago. Chile
- Blümel, M. and Becker, K. 1997. The degradability characteristics of fifty-four roughages neutral detergent fibres as described by *in vitro* gas production and their relationships to voluntary feed intake. British Journal of nutrition 77: 757-768
- Blümmel, M.; and Ørskov E.R. 1993; Comparison of *in vitro* gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. Animal Feed Science and Technology, 40:109-119.
- Boisen, S. and Eggum, B. 1991. Critical evaluation of *in vitro* methods for estimating digestibility in symple-stomach animals. Nutrition Research Reviews 4:141-162.
- Bruni, M. 1995. Estudio de la Cinética de fermentación de los forrajes. Seminario I. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago Chile.
- Bruni M. 1997. Utilización de dietas basadas en ensilajes. Tesis presentada como requisito para la obtención del título de Magister en Producción Animal. Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago. Chile.
- Bruni, M. y Pichard, G. 1998. Cinética de fermentación ruminal *in vitro* de pared celular incubada con diferentes extractos de ensilajes de alfalfa. In Revista argentina de Producción Animal. 22 Congreso Argentino de Producción Animal. Rio cuarto Cordoba. (p 68)
- Chamberlain, A.T. 1994. The gas production capacity of purified chemicals and feedstuffs when incubated *in vitro* with rumen microbes as a possible indicator of energy availability in the rumen. In: British Society of Animal Production. Jubilee Winter Meeting. Paper N° 91.
- Chilibroste, P., Williams, B.A. Tamminga, S. and Calabro, S. 1999. The use of cumulative gas production technique to characterize changes in the fermentation characteristics of rumen contents following variable periods of starvation and grazing in dairy cows. Animal Science, 69: 647-655.

- Chilibroste, P., Tamminga, S. and Williams, B.A. 1998. Effect of days of regrowth of ryegrass (*Lolium perenne*) on fermentation characteristics. Comparison of the nylon bag and gas production techniques. pp 40-43 in *In vitro* Techniques for measuring nutrient supply to ruminants. E.R.
- Cone, J. W., Gelder, A. H., van Visscher, G. J. W., 1996. Influence of rumen fluid and substrate concentration on fermentation kinetics measured with a fully automated time released gas production apparatus. *Animal Feed Science and Technology* 61: 113-128
- Cone, W.J., Beuving, J.M.W and Rodrigue, M. 1994. Use and applications of an automated time related gas production test for the in-vitro study of fermentation kinetics in the rumen. *Revista Portuguesa de Zootecia*. 1: 25-37.
- Cone, W.J., Gelder, A.H.v and Driehuis, F. 1997. Description of gas production profiles with a three-phasic model. *Animal Feed Science and Technology*, 66: 31-45.
- Davies D.R., Theodorou M.K., Baughan J., Brooks A.E. and Newbold J.R. 1995. An automated pressure evaluation system (APES) for determining the fermentation characteristics of ruminant feeds. *Annales de Zootechnie* 44 (Suppl 1), 36.
- Doane, P.H., Pell A.N., and Schofield, P. 1997. The effect of preservation method on the neutral detergent soluble fraction of forages. *Journal of Animal Science*. 75: 1140-1148.
- Ellis, W.C. 1978. Determinants of grazed forage intake and digestibility. *Journal of Dairy Science* 61:1828.
- Fernandez-Rivera, S. 1998. Relationships between gas release in vitro and in vivo quality measures of tropical forages. In: *British Society of Animal Science. Occasional Publication N° 22*.
- Fox, D.G. Sniffen, C.J., O'Connor, J.D., Russell, J.B., and Van Soest, P.J., 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. III. 1992. Cattle diets and diets adequacy. *Journal of Animal Science* 70: 3578-3596.
- France, J., Dhanoa M.S., Theodorou, M.K., Lister, S.J., Davies, D.R. and Isaac, D. 1993. A model to interpret gas accumulation profiles associated with *in vitro* degradation of ruminant feeds. *J.Theor. Biol.* 163:99
- France, J., and Thornley J.H.M.. 1987. Growth functions. In: J. France, and J.H.M. Thornley (Ed.). *Mathematical Models in Agriculture*. pp75-94. Butterworth, London.
- Groot, J.C.J., Cone J.W., Williams, B. A. Debersaques, F: M: A. And Latinga, E. A. 1996. Multiphasic analysis of gas production kinetics for in vitro fermentation of ruminant feeds. *Animal feed Science and technology* 64:77-89
- Houdijk, J. 1998. Effects of non-digestible oligosaccharides in young pigs diets. PhD dissertation. Wageningen Agricultural University.
- Hungate 1966. *The rumen and its microbes*. Academic Press, New York.
- Hungate, R. E. Fletcher, D.W., Dougherty, R. W., and Barrentine, B.F. 1955. Microbial activity in the bovine rumen: its measurement and relation to bloat. *Applied Microbiology*. 1:106-110.
- Mauricio, M. R., Mould, F.L., Dhanoa, M.S., Owen, E., Channa, K.S., and Theodorou M.K., 1999. A Semi-automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Animal feed Science and Technology* 79:321-330.
- McBee, R.H. 1953. Manometric method for evaluation of microbial activity in the rumen with application to utilization of cellulose and hemicelluloses. *Applied microbiology*. 1: 106-110.
- Menke K. H. and Steingass, H. 1988. Estimation of the energetics feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Animal Research and development* 28: 7- 55.
- Menke, K.H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D. and Schneider. 1979. Estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuff from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. *J. Agric. Science* 93:217-222.
- Mertens, D. R. 1993. Rate And Extent Of Digestion. In *Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism*. Ed. Forbes J.M. and France J. CAB International. University Press. Cambridge.
- National Research Council, 1996. *Nutrient requirements for beef cattle*, seventh edition. National Academy Press.
- Orskov, E.R. and McDonald, I. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rates of passage. *J. Agric. Sci.*, 92:499-503.
- Pell A. N. and Schofield P. 1993. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion in vitro. *J. Dairy Sci.* 76:1063-1073
- Pichard G., Troncoso D. y Bruni, M.A.. 1995. Estudio de la cinética de fermentación de los forrajes a través de la producción de gas. In *Resúmenes Congreso Sociedad Chilena de Producción Animal*. Coquimbo Chile.
- Pichard, G. Jaurena, G. and Bruni, M. 1997. Monitoring kinetic of readily Fermentable Components By means of In vitro Gas Production. In *Proceeding of the XVIII International Congress, Canada, June, 1997*.
- Russel. J.B., O'Connor, J.D., Fox, D.G. Van Soest, P.J., and Sniffen, C.J. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. I. Ruminant fermentation. *Journal of Animal Science* 70:3551-3561.
- Schofield, P. and Pell, A.N. 1995^a Validity of using accumulated gas pressure readings to measure forage digestion in vitro: a comparison involving three forages. *Journal of Dairy Science*. 78: 1496-1498
- Schofield, P. and Pell, A.N., 1995^b. Measurement and Kinetic Analysis of Neutral Detergent-Soluble Carbohydrate Fraction of legumes and grasses. *J. Anim.Sci.* 73:3455-3463.
- Schofield, P. Pitt, R.E. and Pell, A.N., 1994. Kinetics of fiber digestion from in vitro gas production. *J. Anim. Sci.* 1994. 72: 2980-2991.
- Sniffen, C.J., O'Connor, J.D., Van Soest, P.J., Fox, D.G. and Russell, J.B.; 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. II. Carbohydrate and Protein availability. *Journal of Animal Science* 70:3562-3577
- Theodorou M., Williams B., Dhanoa M., McAllan A., France J. 1994 A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, (48):185-197
- Theodorou M.K., Lowman, R. S., Davies, Z.S., Cuddeford, D., and Owen, E. 1998. Principles of techniques that rely on gas measurement in ruminant nutrition. In *British Society of Animal Science. Occasional Publication N° 22*
- Theodorou, M.K., Davies, D.R., Nielsen, B. B. Lawrance, M. I. G. and Trinci, A.P.J., 1995. Determination of growth of anaerobic fungi on soluble and cellulose substrate using a pressure transducer. *Journal of general microbiology*. 141: 671-678.
- Van Soest, P.J. 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. Second Edition. Cornell University Press. Ithaca, N.Y.
- Waldo, D., L.W. Smith and L. Cox. 1971. Model of cellulose disappearance from the rumen. *Journal of Dairy Science*. 55:125
- Williams, B. A., Chuzaemi, S., Soebarinoto, Bruchem van J., Boer, H. y Tamminga, S. 1996. A comparison of ten rice-straw varieties grown at two different altitudes during a wet and dry season, using the in-vitro cumulative gas production technique. *Animal Feed Science and Technology*, 57: 183-194.
- Wolin, M. J. 1960. A theoretical rumen fermentation balance. *Journal of Dairy Science* 43: 1452-1459.