# TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

# EVALUACIÓN DE LA TASA DE DEGRADACIÓN MICROBIANA DE HOJAS DE *PANICUM VIRGATUM* CON DIFERENTES DIÁMETROS DE PARTÍCULA.

Autores: Rainhart, Luciano y Wiggenhauser, Walter.

Director: Pagella Horacio

Carrera: Ingeniería Agronómica

Institución: Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de La Pampa

Año: 2013

# INDICE

| Resumen               | 2  |
|-----------------------|----|
| Introducción          | 3  |
| Objetivos             | 6  |
| Hipótesis             | 6  |
| Materiales y métodos  | 6  |
| Resultado y discusión | 9  |
| Conclusiones          | 21 |
| Agradecimientos       |    |
| Bibliografía          | 23 |

#### **RESUMEN**

El tamaño de partícula de forraje puede ser un factor que afecta la tasa de degradación ruminal. Una mayor superficie de exposición del sustrato, asociado a partículas de forraje de menor tamaño, facilitaría la acción microbiana y aumentaría la tasa de degradación. El objetivo de este trabajo fue evaluar la tasa de degradación ruminal de lámina foliar de Panicum virgatum con distintos tamaños de partícula. El ensayo se realizó en laboratorio, utilizando una técnica de incubación in vitro, con fluido ruminal tamponado, siendo el sustrato discos de lámina foliar de tres diámetros distintos, obtenidos con dispositivo de sacabocados. El ensayo duró 5 días consecutivos, ensayándose los tiempos de incubación 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48 y 72 h. Los tratamientos se aplicaron siguiendo un diseño completamente aleatorizado, utilizando tres réplicas por cada tamaño de partícula. El remanente de sustrato, luego de completado cada tiempo de incubación, fue recuperado por filtración y lavado a través de crisoles con placa de vidrio cribada conectados a una línea de vacío, para luego secarse en estufa hasta peso constante. La desaparición de materia seca de cada sustrato se calculó por diferencia entre el peso original y el residual. Los datos de degradación de los substratos se sometieron a análisis de regresión, por ajuste a la función asintótica y = a + b (1-e<sup>-c-t</sup>), donde a es la fracción rápidamente soluble, b la fracción insoluble potencialmente degradable y c la tasa de degradación ruminal de la fracción b. Los resultados mostraron que no hubo diferencias significativas en la tasa de degradación con los diferentes tamaños de partícula de lámina foliar ensayados.

*Palabras clave:* lámina foliar, gramínea megatérmica, perímetro de exposición, desaparición ruminal, *in vitro*.

#### INTRODUCCIÓN

Un objetivo importante de la mayoría de los sistemas de producción ganadera de rumiantes, es producir forraje de la mayor calidad nutritiva posible. Sin embargo, hay muchas situaciones de producción donde la calidad nutritiva del forraje presenta limitaciones. En estos casos, el tratamiento post-cosecha puede ser la única oportunidad para mejorar la respuesta animal a dicho tipo de alimentos.

El tratamiento físico de reducción del tamaño de partícula, como la molienda o el picado, ha sido ampliamente ensayado para mejorar la utilización de alimentos fibrosos por rumiantes (Berger *et al.*, 1994). La molienda reduce el tamaño de las partículas, aumenta la superficie de exposición e incrementa la densidad aparente de las fracciones hoja y tallo de los forrajes (Laredo y Minson, 1975). Incrementos en el consumo dietario, la ganancia de peso y la eficiencia de conversión, son las respuestas más consistentes a la molienda y picado de los forrajes (Beardsley, 1964). Con relación al material original, la tasa de fermentación ruminal puede incrementarse al disminuir el tamaño de partícula de los forrajes procesados físicamente (Moore, 1964). Sin embargo, según Berger *et al.* (1994), moler y peletear los forrajes no mejoran la utilización digestiva de carbohidratos estructurales en los rumiantes, pero al mismo tiempo determinan aumentos de productividad animal, que se explicarían por un incremento de su consumo voluntario.

La forma, el tamaño, la densidad, la flotabilidad, la humectabilidad y la microestructura laberíntica de la partícula de forraje, condicionan su tasa de digestión y pasaje ruminal, así como su digestibilidad y consumo (Ellis *et al.*, 1994). El tamaño de partícula y la densidad se interrelacionan (Evans *et al.*, 1973; Hooper y Welch, 1985); las partículas pequeñas presentan una

mayor densidad que las grandes. Allen y Mertens (1988), sugirieron que la tasa de digestión ruminal se relaciona con la matriz de la fibra vegetal, y que el área superficial que es accesible a las enzimas está relacionada positivamente con la velocidad de digestión.

La tasa de digestión es la proporción o porcentaje de material dietario que se digiere en un compartimiento del tubo digestivo, como puede ser el rumen, por unidad de tiempo. Aplicada a una partícula de forraje, la tasa de digestión ruminal queda determinada por la velocidad a la cual se degradan, por acción microbiana, los constituyentes potencialmente digestibles de la pared celular vegetal. El ataque a la lignocelulosa por los microorganismos anaerobios en el rumen se produce a un ritmo relativamente lento, limitado en última instancia por la morfología y composición química del tejido vegetal, como determinantes de la cantidad y disponibilidad de polímeros de la pared celular expuestos a la digestión microbiana (Kennedy, 1990). A medida que aumenta el grado de colonización bacteriana en las partículas vegetales, su tasa de digestión resulta más elevada (Latham et al., 1979). La tasa de producción de gas in vitro de partículas de heno incubadas con bacterias ruminales fue evaluada por Gerson et al. (1988); inmediatamente después de la adhesión a las partículas y, probablemente antes del agotamiento del substrato, fue mayor para partículas pequeñas que para partículas más grandes de heno. En otro experimento, se encontró que la adhesión de los microorganismos fue mayor en partículas más chicas (Legay-Carmier y Bauchart 1989).

Como tratamiento físico del forraje, la molienda podría causar una caída severa de la tasa de digestión, lo cual se relacionaría con una colonización restringida de las partículas por los microorganismos al destruirse las superficies internas del material vegetal (Uden, 1988). En este sentido, Sequeira (1981) encontró que la molienda (a tamaños de partícula entre 0,25 mm y 6

mm) de forrajes, a igualdad de composición química, retrasa la velocidad de colonización microbiana a tiempos tempranos de incubación, pero no afecta su tasa de digestión.

Van Soest (1994) menciona que las partículas más pequeñas de la dieta tienen una tasa de digestión más rápida. Sin embargo, este autor pone en duda la veracidad de la teoría de la superficie de exposición para explicar la relación entre el tamaño de partícula de los forrajes y su tasa de digestión. Aunque el procesado físico de los alimentos aumentaría su área superficial por unidad de peso, su tasa de digestión se vería disminuida debido a la reducción del tiempo de retención en el rumen (Thomson y Beever, 1980). Sin embargo, esa explicación no puede aplicarse en general, porque no siempre el tiempo de retención se reduce por la molienda, y además, las tasas de degradación no siempre pueden aumentar, tal vez porque la colonización se hace más difícil por la destrucción de la matriz tridimensional de la fibra de la planta (Czerkawski, 1986). Si por efecto de la molienda convencional del forraje se diera un aumento en su tasa de digestión, éste sería menor que el incremento en su tasa de pasaje, ya que dicho tratamiento siempre resulta en una caída de la digestibilidad de los forrajes (Van Soest, 1994).

Actualmente no está claro cuál es el efecto de la molienda, a tamaños promedio de partícula superiores a 100 μm, sobre la tasa de digestión de forrajes (Van Soest, 1994). Los resultados de distintos estudios indican que la molienda convencional puede tener un efecto positivo (Robles *et al.*, 1980), negativo (Le Liboux y Peyraud, 1998), o nulo (Robles *et al.*, 1980) sobre la tasa de digestión de forrajes.

En este trabajo, en particular, se realizará un estudio de degradabilidad ruminal utilizando, como sustrato, láminas foliares de *Panicum virgatum*. Esta gramínea megatérmica, nativa de los pastizales de Norteamérica, se encuentra en vías de difusión como forrajera en la Región

Pampeana semiárida. Se trata de una especie con aceptable resistencia al frío, que prefiere suelos de textura arenosa a franca. Asimismo, presenta buena calidad forrajera y alta palatabilidad en estado vegetativo. Éstas y otras características de *P. virgatum* son descriptas por Bandera et al., 2013.

#### **OBJETIVO**

El objetivo de este proyecto fue evaluar la degradabilidad de láminas foliares de *Panicum virgatum*, de distintos tamaños de partículas, sometidas a incubación ruminal *in vitro*. La variable estudiada fue la tasa de digestión de materia seca como respuesta a diferentes niveles de superficie de exposición por unidad de masa del sustrato.

#### HIPÓTESIS

A mayor nivel de superficie de exposición del sustrato, asociado a partículas de forraje de menor tamaño, se facilita la acción microbiana y aumenta su tasa de digestión ruminal.

#### **MATERIALES Y MÉTODOS**

El proyecto se realizó en el campo experimental de la Facultad de Agronomía UNLPam, basado en un estudio de degradabilidad ruminal *in vitro*. Para el mismo se cosecharon, manualmente láminas de *Panicum virgatum* (L.) cv. alamo (Pasto varilla) de una pastura en estado fenológico reproductivo avanzado, el día 14 de abril de 2011 (Foto 1). De estas láminas foliares se extrajeron, utilizando un juego de sacabocados (Foto 2), discos de material vegetal de los 3 diámetros siguientes: 4,24 mm (DC), 5,72 mm (DM) y 7,23 mm (DG). De cada una de las láminas foliares se obtuvieron discos de los tres tamaños, alternadamente, descartándose

porciones de 2-3 cm de largo de los extremos de la lámina (Foto 3). Las observaciones de diámetros se realizaron sobre 20 discos de cada tamaño, efectuándose 2 mediciones en sentido perpendicular por disco. Se utilizó una lupa marca Olympus SZ3060 colocando una reglilla en un ocular y tomando como referencia una faja de papel milimetrado adherida a la platina, obteniendo una equivalencia de 8,5 divisiones de la escala por cada milímetro en la faja de papel (Foto 4).

Para el estudio de degradabilidad in vitro se prepararon tubos de ensayo de 100 ml de capacidad, provistos de un tapón de goma con válvula de Bunsen para liberación de gases. En cada uno de los tubos, se colocó 0,5 g de sustrato, el cual consistió de discos de láminas foliar fresca, sin incluir la nervadura central. Por cada diámetro de disco foliar y tiempo de incubación se prepararon tres tubos, a los efectos de minimizar el error experimental, registrándose el peso exacto correspondiente. Dichos tubos se cerraron con su correspondiente tapón y se conservaron en un freezer hasta la preparación de los incubados. Pocos minutos antes de iniciarse la incubación in vitro, los tubos se retiraron del freezer y se llevaron a estufa a 39°C. Para la conformación de los incubados cada tubo se fue retirando de la estufa y se le adicionaron 50 ml de fluido ruminal tamponado. Este último consistió de una mezcla de los siguientes componentes: (1) fluido obtenido por filtración, a través de tela de muselina, del contenido ruminal recientemente colectado de un novillo fistulado Hereford alimentado con heno de alfalfa, y (2) una solución de saliva artificial de McDougall (1948). En términos de volumen, la mezcla comprendió 1 parte de fluido ruminal filtrado y 4 partes de saliva artificial. Dicha mezcla se preparó en una cuba mantenida a 39°C, y con gasificación de dióxido de carbono. Acompañando a los incubados de los sustratos objeto de estudio, se incluyeron tubos conteniendo solamente el medio líquido de la mezcla (blancos), a los efectos de ponderar el aporte de partículas del fluido ruminal. Inmediatamente después de dosificarse, los tubos se cerraron con sus respectivos tapones (Foto 5), y se colocaron en un baño termostatizado a 39°C, para ser sometidos a su correspondiente período de incubación. Los tiempos de incubación ensayados fueron 0, 2, 4, 8, 12, 24, 48 y 72 h. El tratamiento de 0 h correspondió a la pérdida de la fracción soluble del material vegetal, mediante la agitación manual continua de tubos contenido 0,5 g de sustrato y 50 ml de agua destilada, por 15 minutos a 39°C (Foto 6). Inmediatamente luego de cumplido su período correspondiente de incubación, todos los tubos se fueron retirando, para trasvasar cuantitativamente su contenido, a crisoles con placa de vidrio sinterizado de porosidad N°1, cuyo peso seco vacío se registró previamente. Estos crisoles, conectados por medio de un embudo a una línea de vacío, se utilizaron para recuperar los residuos de incubación de cada substrato ensayado. Durante dicha filtración forzada, los residuos de incubación retenidos en el crisol se lavaron con agua destilada a temperatura ambiente, hasta que el líquido de filtrado resultó limpio (Foto 7). El volumen utilizado de agua destilada para cada lavado fue de 500 ml, fraccionándose esta cantidad en 10 aplicaciones. Finalmente, estos crisoles se llevaron a estufa para su secado a 60°C, hasta peso constante. Tomando en cuenta el peso de los residuos secos de incubación de los sustratos, corregidos por el de los blancos, así como el peso seco original de los mismos en los incubados, se procedió a calcular sus correspondientes porcentajes de desaparición de materia seca. Paralelamente, sobre muestras sin tratar de los substratos que se sometieron a incubación, se determinaron también sus concentraciones de materia seca (MS) a 60°C y 105°C, de proteína bruta (PB) mediante el método de Kjeldahl (AOAC, 1980), y fibra en detergente neutro (FDN) por el método de Goering y Van Soest (1970).

Los tratamientos experimentales, resultantes de la combinación de 3 tamaños de discos foliares y 7 tiempos de incubación, se aplicaron siguiendo un diseño completamente aleatorizado, utilizándose tres réplicas por tratamiento. Los datos de degradación de los substratos se sometieron a análisis de regresión por ajuste a la función asintótica y = a + b (1-e<sup>-c-t</sup>), propuesta por Ørskov y Mc Donald (1979), donde a es la fracción rápidamente soluble, b la fracción insoluble potencialmente degradable y c la tasa de degradación ruminal de la fracción b. La información obtenida de c, para los distintos tratamientos, se sometió a análisis de varianza utilizando el programa de análisis estadístico Infostat (versión 2011p).

Finalmente, algunos de los discos foliares residuales, correspondientes a tratamientos de incubación ruminal in vitro por 2 y 72 h, se tomaron para su observación en un microscopio óptico marca Leica modelo DM500 conteniendo una cámara fotográfica como dispositivo integrado.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se recurrió a la utilización de una técnica *in vitro* para la determinación de degradabilidad ruminal, en lugar de la convencional *in situ*, en la cual el sustrato se incuba, contenido en una bolsita de tela sintética, en el rumen de animales fistulados (Ørskov *et al.*, 1980). Por lo tanto, esto condicionó que se dependiera de un solo animal fistulado, como donante de fluido ruminal, y que el animal individual no fuera un componente de variabilidad en el experimento, como en la técnica *in situ*. Bajo el enfoque de los estudios de degradabilidad ruminal *in vitro*, como fue el del presente trabajo, se tuvo un control importante sobre el pH del medio de incubación, al incorporarse a éste una solución de saliva artificial. Por ejemplo, en los estudios *in vivo* de Le Liboux y Peyraud (1998) con vacas lecheras y de Alamouti *et al.* (2009)

con ovinos, el efecto negativo que tuvo la reducción del tamaño de partícula del forraje de alfalfa suministrado, sobre su tasa de digestión ruminal, fue consecuencia de una depresión en la actividad microbiana celulolítica, al establecerse niveles de pH por debajo de 6 en el contenido ruminal. Por otro lado, en la preparación del sustrato para las incubaciones de este trabajo, se recurrió al uso de material foliar fresco en la forma de partículas discoidales. Esto, a diferencia de otros trabajos, permitió que se obtuvieran distintos tamaños de partícula sin disrupción de la estructura foliar, y con un buen control de la variable valor nutritivo, ya que los distintos tamaños de partícula no tuvieron origen en la molienda y separación de partículas por tamices, como ocurriera en otros trabajos que abordaran el problema nutricional objetivo del presente estudio. Analizando, a priori, el rango de tamaños de partícula ensayado en este trabajo (entre 4,24 y 7,23 mm de diámetro), el mismo aparenta ser demasiado estrecho como para encontrar diferencias entre tratamientos. Sin embargo, como se muestra en la Tabla 1, el perímetro expuesto por unidad de masa foliar, del tratamiento de menor diámetro duplica en magnitud al de mayor diámetro. Hay que tener en cuenta que, dicho perímetro de la partícula de lámina foliar, se constituyó en un borde de corte con una función esperada importante, como micronicho de colonización por microorganismos ruminales. La observación microscópica de discos foliares, luego de haber sido sometidos a incubación in vitro con fluido ruminal tamponado (Fotos 8 a y b), mostró un frente de ataque del tejido vegetal, desde la periferia hacia el centro de la partícula, que se extendió a lo largo de los espacios paralelos internervadura. Esto demuestra que el borde de corte fue efectivo como sitio de colonización microbiana, y que las nervaduras concentran las estructuras tisulares más resistentes a la degradación microbiana. Hay que tener en cuenta que dicho perímetro de la partícula de lámina foliar es un borde de corte que se constituye en un frente de ataque para la acción degradativa de los microorganismos ruminales.

Tabla 1. Diferencia en los valores dimensionales entre los tamaños de partícula ensayados.

| Tamaño de<br>partícula | Diámetro<br>(mm) (*) | Superficie<br>(cm²/0,5 g) | N° de discos<br>/0,5 g(**) | Perímetro<br>(m/0,5 g) |  |
|------------------------|----------------------|---------------------------|----------------------------|------------------------|--|
| DC                     | 4,24 (0,75)          | 31,5                      | 124                        | 1,65                   |  |
| DM                     | 5,72 (1.39)          | 32,8                      | 69                         | 1,24                   |  |
| DG                     | 7,23 (1,15)          | 29,7                      | 38                         | 0,86                   |  |

<sup>\*</sup> Entre paréntesis se detallan los desvíos estándares para cada media (±).

El material foliar de *Panicum virgatum*, utilizado como sustrato de incubación en esta investigación, se caracterizó por poseer concentraciones de MS de 50,87%, PB/MS de 6,3% y FDN/MS de 72,26%. Introduciendo estos dos últimos valores en la ecuación de Pagella *et al.* (1996), se obtiene una digestibilidad estimada de la MS para dicho material vegetal de 49,95%, valor que denuncia una calidad nutricional baja del mismo, acorde con el estado fenológico muy avanzado de la pastura de la cual se obtuvo. Los resultados de la prueba de degradabilidad *in vitro*, de esta investigación, se muestran en la Tabla 2 y la Fig.1.

Tabla 2. Valores promedios porcentuales de desaparición de materia seca para cada tratamiento.

|              | Horas de incubación |        |        |         |        |        |        |        |
|--------------|---------------------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|
| Tratamientos | 0                   | 2      | 4      | 8       | 12     | 24     | 48     | 72     |
| Chico        | 0,02                | 11,98  | 15,10  | 16,32   | 20,92  | 20,26  | 32,66  | 40,04  |
|              | (0,04)              | (2,00) | (1,26) | (1,91)  | (2,52) | (1,38) | (2,28) | (2,59) |
| Mediano      | 0,22                | 9,87   | 16,94  | 19,91   | 18,90  | 20,72  | 30,28  | 39,98  |
|              | (0,01)              | (2,11) | (6,62) | (7,28)  | (3,40) | (1,17) | (2,52) | (2,66) |
| Grande       | 0,16                | 18,00  | 19,36  | 24,04 ( | 26,55  | 28,20  | 34,86  | 42,24  |
|              | (0,04)              | (3,30) | (0,70) | 2,37)   | (2,51) | (2,37) | (3,13) | (7,00) |

<sup>\*</sup>Entre paréntesis aparecen los desvíos estándares de cada tratamiento (±).

<sup>\*\*</sup>Valores obtenidos por conteo y pesada de discos.

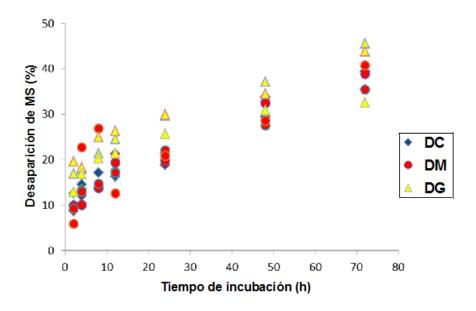


Figura 1. Desaparición de materia seca en función del tiempo de incubación *in vitro* confluido ruminal para los distintos tratamientos.

A todos los tiempos de incubación, se verifica una franja de solapamiento en los valores de desaparición de MS. Si bien la degradación del sustrato, muestra una tendencia a evolucionar a tasas decrecientes, el comportamiento asintótico esperado no se manifiesta netamente. El análisis de regresión de los datos de desaparición de MS de los sustratos, aplicando el modelo monoexponecial de Ørskov y McDonald (1979), en varios casos dio origen a valores de fracción insoluble potencialmente degradable de la MS (b), y estimaciones de degradabilidad potencial, que superaban el valor de 100%, lo cual es biológicamente imposible. Con respecto a las demás variables de la dinámica de degradación de los sustratos, en la Tabla 3 se detallan los valores estimados de la fracción rápidamente soluble (a), la tasa de digestión (c) de la fracción b y la degradabilidad efectiva estimada, considerando una tasa fraccional de pasaje de 0,02/h. El análisis de varianza aplicado a la respuesta de la variable tasa de digestión, a los distintos tamaños de partícula de lámina foliar, se resume en la Tabla 4. Dicho análisis mostró que no

existieron diferencias significativas (p>0.05), en tasa de digestión, para los distintos tamaños de partícula del sustrato, siendo su valor medio de 0,0157/h. Un resultado similar fue observado por Robles et al. (1980), en un estudio in vitro con forraje de pasto ovillo (Dactylis glomerata) a distintos tamaños de partícula, preparado por molienda y separación con tamices entre 1 y 12 mm. Estos resultados son indicativos de que la degradación microbiana de la fracción lignocelulósica del sustrato no parece estar afectada por el tamaño de partícula. Kennedy y Murphy (1988) enfatizaron que el efecto de la reducción en el tamaño de partícula del material dietario, sobre su tasa de digestión ruminal, es variable, lo que en parte puede estar explicado por la respuesta diferencial que tienen distintos recursos lignocelulósicos a dicho tratamiento. Además, estos investigadores, al referirse al tratamiento de molienda convencional, mencionaron que pueden haber diferencias entre distintos tipos de forrajes en la facilidad con la que las estructuras de su cutícula y lignificadas se pueden alterar afectando su degradación ruminal microbiana. La reducción del tamaño de partícula de sustratos lignocelulósicos, también podría facilitar la adhesión microbiana al incrementarse su área superficial por unidad de peso (Alamouti et al., 2009). Durante el proceso de incubación existe un período donde no hay degradación ninguna o ésta es reducida, que es conocido como tiempo de colonización (fase lag). De igual manera, con la reducción del tamaño de partícula del sustrato, en el ambiente ruminal puede afectarse la longitud del tiempo de demora en la colonización microbiana del mismo, período en el cual se producen cambios físico-químicos en la matriz fibra vegetal que facilitarán la invasión microbiana y la posterior digestión del sustrato (Allen y Mertens, 1988). Aparentemente, estas variables no resultaron afectadas en el rango de dimensiones de partícula que se ensayaron en el presente estudio.

Tabla 3. Resumen de variables de dinámica de degradación ruminal de los sustratos.

| Variable                                      | DC       | DM       | DG       |
|---|----------|----------|----------|
| Tasa fraccional de digestión ruminal de la MS | 0,0110   | 0,0105   | 0,0257   |
|   | (0,0115) | (0,0081) | (0,0202) |
| Fracción rápidamente soluble (%) de la MS     | 10,40    | 10,93    | 14,25    |
|   | (1,66)   | (2,87)   | (2,62)   |
| Degradabilidad efectiva de la MS (%) a tasa   | 29,37    | 30,50    | 32,00    |
| de pasaje de 0,02/h                           | (1,69)   | (1,81)   | (4,42)   |

Tabla 4. Análisis de la varianza

| Variable | n | n   R <sup>2</sup> |        | CV      |
|----------|---|--------------------|--------|---------|
| c (*)    | 9 | 0,2690             | 0,0253 | 90,3122 |

<sup>\*</sup>Tasa de digestión de la fracción insoluble potencialmente degradable

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

| F.V.    | SC     | gl | CM     | F      | p-valor |
|---------|--------|----|--------|--------|---------|
| Modelo  | 0,0004 | 2  | 0,0002 | 1,1038 | 0,3907  |
| Tamaños | 0,0004 | 2  | 0,0002 | 1,1038 | 0,3907  |
| Error   | 0,0012 | 6  | 0,0002 |        |         |
| Total   | 0,0017 | 8  |        |        |         |

Con relación al problema de ajuste de los datos de degradabilidad ruminal de este trabajo, al modelo de regresión monoexponencial propuesto por Ørskov y McDonald (1979), surge la necesidad de explorar el uso de otros modelos no lineales de regresión en trabajos futuros. En principio, el modelo utilizado se desarrolló para el tratamiento de datos de degradación ruminal de suplementos proteicos, mucho de los cuales alcanzan su degradación potencial alrededor de las 24 h de incubación, mientras que el ajuste para alimentos como forrajes de concentración elevada de constituyentes de pared celular no es tan satisfactorio (Dhanoa *et al.*, 1995). Otro aspecto a tenerse en cuenta son los tiempos de incubación para alcanzar la degradabilidad potencial, ya que para sustratos lignocelulósicos, como el utilizado en este trabajo, tienden a ser

más prolongados. Por lo tanto, en futuros protocolos para estudios de degradabilidad ruminal sobre dicho tipo de recursos forrajeros, podrían incluirse tiempos de incubación más prolongados. Finalmente, otro aspecto metodológico a abordar en próximos trabajos, es el de la obtención de discos de material foliar. Al observarse bajo lupa los discos de lámina foliar obtenidos en este trabajo (Foto 9), con el uso de dispositivo sacabocados, el borde de corte no resultó regular. Esto se constituye en una fuente de variación que afecta el perímetro de los discos. Probablemente, las distorsiones de la forma circular de los discos, se produjeron como resultado de la manera de realizar la extracción de los mismos, con giros del instrumento sacabocados. Esto da lugar a que se sugiera, en próximos trabajos que utilicen el mismo protocolo experimental, que la obtención de discos de material foliar con el instrumento sacabocados se realice con un suave golpe, en lugar de girarlo sobre la pieza vegetal. Además podrían probarse otro tipo de dispositivos sacabocados, que difieran en su diseño.



Foto1. Pastura de *Panicum virgatum* en la Facultad de Agronomía UNLPam.



Foto 2. Obtención de círculos de láminas de *Panicum virgatum* con sacabocado.

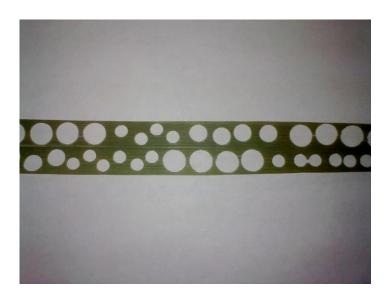


Foto 3. Muestra de una lamina foliar de la cual se obtuvieron discos de distintos diámetros en forma alternada.

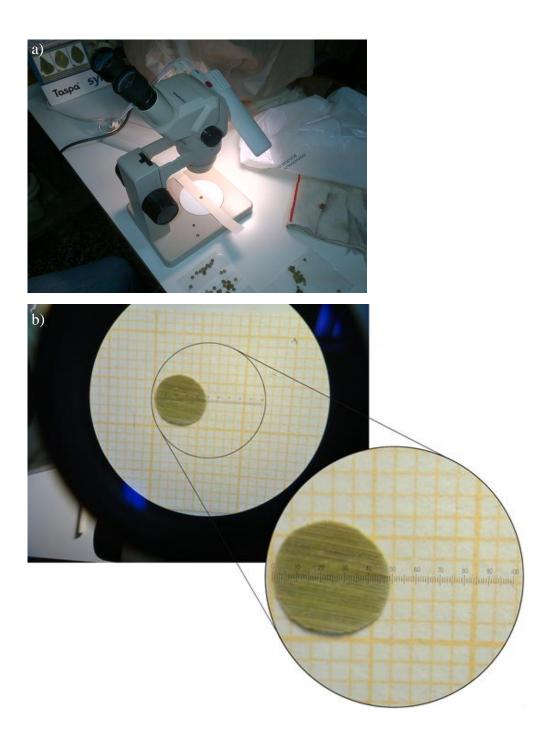


Foto 4. Determinación del diámetro exacto de discos foliares utilizando instrumental óptico: a) disco foliar colocado sobre faja de papel milimetrado atravesando la platina de una lupa; b) campo del ocular con reglilla mostrando un disco foliar sobre papel milimetrado.



Foto 5. Tubos con inóculo ruminal y sustrato listos para incubación.



Foto 6. Tubos preparados para el tratamiento correspondiente a 0 h de incubación.



Foto 7. Lavado y recuperación del sustrato incubado.

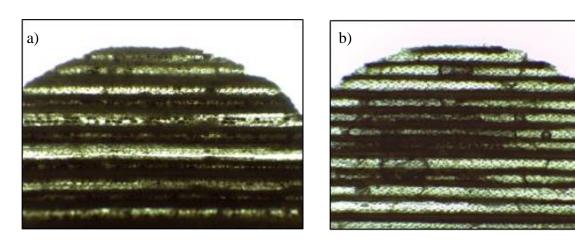


Foto 8. Fotografías de vista microscópica con lente 4X, de partículas de lámina foliar de *Panicum* virgatum luego de someterse a incubación in vitro con fluido ruminal tamponado: a) incubación por 2 h; b) incubación por 72 h.

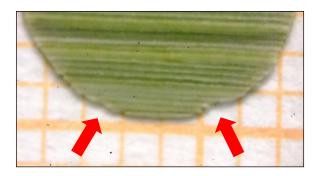


Foto 9. Partícula sin tratar en la cual se observa en la lupa el corte irregular producido por el sacabocado.

## **CONCLUSIÓN**

Como resultado de la aplicación del protocolo experimental de este trabajo, no se pudo confirmar la hipótesis de que, a menores tamaños de partícula de un material lignocelulósico, su tasa de digestión ruminal resulta de mayor magnitud. Los datos del presente estudio mostraron que, la tasa de digestión microbiana de lámina foliar de *Panicum virgatum*, no fue afectada el tamaño de partícula en los rangos a los que se sometió, como sustrato, a incubaciones *in vitro* con fluido ruminal tamponado. En la ejecución de futuros experimentos, bajo esta misma línea de investigación, deberá abordarse una serie de restricciones metodológicas que se presentaron en este trabajo.

#### **AGRADECIMIENTOS**

A nuestro director de tesis Dr. Horacio Pagella por su ayuda, consejos y dedicación hacia nosotros, responsable de nuestra formación como profesionales y personas.

A los evaluadores Mg. Celia Rabotnikof, Dr. Néstor Stritzler por sus correcciones, valiosas críticas, comentarios y acertados aportes.

A los ayudantes de laboratorio Sergio Lardone y Néstor Balzer.

A Ing. Agr. María Elena Fuentes y Mg. Valeria Belmonte, por su asesoramiento en temas de estadística.

A Ing. Agr. Ana Clara Gonzalez por sus valiosos consejos en el armado del trabajo.

A B. Celeste Lentz, Mg. Carlos Zoratti e Ing. RRNN Natalia Sawczuk por su apoyo en la realización de trabajos de laboratorio.

#### **BIBLIOGRAFÍA**

- Alamouti, A.A., Ghorbani, G.R., Alikhani, M., Rahmani, H.R., Teimouri Yansari, A. and K.H. Südekum, K.H. (2009). Effects of lucerne particle size and source of dietary carbohydrates on in situ degradation and ruminal variables in sheep. *Czech Journal of Animal Science* **54**, 277–285.
- Allen M.S. and Mertens D.R. (1988). Evaluating constraints on fiber digestion by rumen microbes. *Journal of Nutrition* **118**, 261-270.
- A.O.A.C. (1980). Official Methods *of Analysis of the Association of Official Agricultural Chemists*, 13<sup>rd</sup> Edition [W. Horwits, editors], p. 15. Washington, U.S.A.: AOAC Publishers.
- Bandera, R., Bertram, N., Bolleta, A., Chiacchiera, S., Ferri, J.M., Galíndez, G., Lauric, A.,
  Malagrina, G., Otondo, J., Petruzzi, H., Stritzler, N. y Torres Carbonell, C. (2013). En:
  Las Gramíneas Forrajeras Megatérmicas en la Región Templada de Argentina [ O. Bertín,
  editor], 46 p. Pergamino, Argentina: EEA INTA Pergamino.
- Beardsley, D.W. (1964). Symposium on forage utilization: Nutritive value of forage as affected by physical form. Part II. Beef cattle and sheep studies. *Journal of Animal Science* **23**, 239-245.
- Berger, L.L., Fahey Jr., G.C., Bourquin, L.D and Titgemeyer, E.C. (1994). Modification of forage quality after harvest. In *Forage Quality, Evaluation, and Utilization*, pp. 922-966 [G.C. Fahey Jr., M. Collins, D.R. Mertens and L.E. Moser, editors]. Madison, Wisconsin, USA:

- American Society of Agronomy, Crop Science Society of American and Soil Science Society of America.
- Czerkawski, J.W. (1986). Introduction to Rumen Studies. Oxford, UK: Pergamon Press.
- Dhanoa, M.S., France, J., Siddons, J., Lopez, S. and Buchanan-Smith, J.G. (1995). A non-linear compartmental model to describe forage degradation kinetics during incubation in polyester bags in the rumen. *British Journal of Nutrition* **51**, 173-179.
- Ellis, W.C., Matts, J.H., Hill, T.M and Murphy, M.R. (1994). Methodology for estimating digestion and passage kinetics of forage. In *Forage Quality, Evaluation, and Utilization*, pp. 682-756 [G.C. Fahey Jr., M. Collins, D.R. Mertens and L.E. Moser, editors]. Madison, Wisconsin, U.S.A.: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America and Soil Science Society of America.
- Evans, E.W., Pearce, G.R., Burnett, J. and Pillinger, S.L. (1973). Changes in some physical characteristics of the digesta in the reticulorumen of cows fed once daily. *British Journal of Nutrition* **29**, 357-376.
- Gerson, T., King, A.S.D., Kelly E.K. and Kelly W.J. (1988). Influence of particle size and surface area on *in vitro* rates of gas production, lipolysis of triacylglycerol and hydrogenation of linoleic acid by sheep rumen digests or *Ruminococcus flavefaciens*. *Journal of Agricultural Science* (Cambridge) **110**, 31-37.

- Goering, H.K. and Van Soest, P.T. (1970). Forage Fiber Analyses (Apparatus, Reagents, Procedures and Some Applications). Agricultural Handbook 379. Washington, U.S.A.: Agricultural Research Service.
- Hooper, A.P and Welch, J.G. (1985). Effect of particle size and forage composition on functional specific gravity. *Journal of Dairy Science* **68**, 1181-1188.
- Kennedy, P.M. (1990). Constraints of rumen dynamics on lignocellulose digestion. In *Microbial and Plant Opportunities to Improve Lignocellulose Utilization by Ruminants*, pp. 3-15 [D.E. Akin, L.G. Ljungdahl, J.R. Wilson and P.J. Harris, editors]. New York, USA: Elsevier Science Publishing.
- Kennedy, P.M. and Murphy, M.R. (1988). The Nutritional Implications of Differential Passage of Particles Through the Ruminant Alimentary Tract. *Nutrition Research Reviews*, **1**, pp. 189-208.
- Latham, M.J., Hobbs, D.G. and Harris, P.J. (1979). Adhesion of rumen bacteria to alkali-treated plant stems. *Annales de Recherches Vétérinaires* **10**, 244-245.
- Laredo, M.A and Minson; D.J. (1975). The effect of pelleting on the voluntary intake and digestibility of leaf and stem fractions of three grasses. *British Journal of Nutrition* **33**, 159-170.
- Le Liboux, S. and Peyraud, J.L. (1998). Effect of forage particle size and intake level on fermentation patterns and sites and extent of digestion in dairy cows fed mixed diets.

  Animal Feed Science and Technology 73, 131-150.

- Legay-Carmier, F. and Bauchart, D. (1989). Distribution of bacteria in rumen contents of dairy cows given a diet supplemented with soya-bean oil. *British Journal of Nutrition* **61**, 725-740.
- McDougall, E.I. (1948). Studies on ruminant saliva. I. the composition and output of sheep's saliva. *Biochemical Journal* **43**, 99-109.
- Moore, L.A. (1964). Symposium on forage utilization: Nutritive value of forage as affected by physical form. Part I. general principles involved with ruminants and effect of feeding pelleted or wafered forage to diary cattle. *Journal of Animal Science* **23**, 230-238.
- Ørskov E.R. and Mc Donald, I. (1979). The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal of Agriculture Science* (Cambridge) **92**, 499-503.
- Ørskov, E.R., De B. Hovell, F.D. and Mould, F. (1980). The use of the nylon bag technique for the evaluation of feedstuffs. *Tropical Animal Production* **5**, 195-213.
- Pagella J.H., Jouve V.V., Stritzler N.P. y Viglizzo E.F. (1996). Estimación de la digestibilidad *in vitro* de especies forrajeras utilizando parámetros de composición química. *Revista Argentina de Producción Animal* **16,** 25-34.
- Robles, A.Y., Belyea, R.L., Martz, F.A. and Weiss, M.F. (1980). Effect of particle size upon digestible cell wall and rate of *in vitro* digestion of alfalfa and orchardgrass forages.

  \*\*Journal of Animal Science 51, 783-790.

- Sequeira, C.A. (1981). Effect of grinding on the *in vitro* digestibility of forages. Master of Science Thesis, Cornell University, Ithaca, New York, USA.
- Thomson, D.J. and Beever, D.E. (1980). The effect of conservation and processing on the digestion of forages by ruminants. In *Digestive Physiology and Metabolism in Ruminants*, pp. 291-308 [Y. Ruckebusch and P. Thivend, editors]. Lancaster, UK: MTP Press.
- Uden, P. (1988). The efect of grinding and pelleting hay on digestibility, fermentation rate, digesta passage and rumen and faecal particle size in cows. *Animal Feed Science and Technology* **19**, 145-157.
- Van Soest, P. (1994). *Nutritional Ecology of the Ruminant*, Second Edition. Ithaca, New York, USA: Cornell University Press.