



TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

EFFECTO DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA DE FOLÍOLOS DE *MEDICAGO SATIVA* SOBRE SU TASA DE DEGRADACIÓN RUMINAL.

Autores: Rio, Yanina Anyelen.

Martínez, Macarena Mailén.

Director: Pagella, José Horacio.

Ingeniería Agronómica
Facultad de Agronomía
Universidad Nacional de La Pampa

2015

ÍNDICE

Resumen.....	3
Introducción.....	4
Hipótesis.....	6
Objetivo.....	6
Materiales y métodos.....	6
Resultados y discusión.....	11
Conclusiones.....	19
Agradecimientos.....	20
Bibliografía.....	21

RESUMEN

La preparación de forrajes mediante tratamientos físicos que reducen su tamaño de partícula, permite modificar su utilización como alimentos para los rumiantes. Es posible hipotetizar que la mayor relación superficie/volumen del sustrato, asociada a partículas más pequeñas, facilitaría su colonización por los microorganismos ruminales y aumentaría su tasa de degradación. El objetivo de este trabajo fue evaluar la tasa de digestión ruminal (k_d) de folíolos de *Medicago sativa* L., en respuesta a distintos diámetros de partícula. Para ello se llevó a cabo un ensayo en laboratorio, utilizando un sistema de incubación ruminal *in vitro* en baño bajo control termostático. Los incubados se constituyeron de fluido ruminal tamponado y material foliar fresco como sustrato, preparado en la forma de discos de 3 diámetros distintos (media \pm d.e. en mm: D2=2,01 \pm 0,61; D5=4,82 \pm 0,89; D8=8,00 \pm 0,47) por medio de un juego de sacabocados. Los tiempos de incubación ensayados fueron 2, 4, 6, 9, 12, 18, 24, 60 y 96 h. Los tratamientos se aplicaron siguiendo un diseño completamente aleatorizado, utilizando cuatro réplicas por cada combinación de tamaño de disco foliar y tiempo de incubación. Luego de completado su correspondiente tiempo de incubación, el sustrato residual de cada tubo se recuperó por filtrado y sometió a lavado, utilizando crisoles con placa de vidrio cribada, para posteriormente secarse en estufa hasta peso constante. La desaparición de materia seca (MS) fue calculada por diferencia entre los pesos inicial del sustrato y final del residuo de incubación. Los datos de degradación de los sustratos se sometieron a análisis de regresión, por ajuste a la función asintótica $y = a + b (1 - e^{-c \cdot t})$, donde a es la fracción rápidamente soluble, b la fracción insoluble potencialmente degradable y c la tasa de degradación ruminal de la fracción b , como estimación de k_d . Se observó un buen ajuste de los datos de desaparición de MS al modelo de regresión. Al comparar los valores de k_d , para los distintos tamaños de discos de folíolos, se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$). Los discos del tamaño D8 exhibieron valores de k_d significativamente mayores a los de tamaño D2. La tendencia observada para k_d , de aumentar con tamaños mayores de partícula de folíolos de alfalfa, se contradice con la teoría de la superficie de exposición. Es probable que existan condiciones micro-ambientales diferenciales, alrededor de partículas de distinto tamaño, que tengan influencia sobre la actividad microbiana ruminal.

Palabras clave: material foliar, leguminosa, superficie expuesta, velocidad de digestión, *in vitro*.

INTRODUCCIÓN

En la ganadería de rumiantes, el recurso alimentario básico, más económico y de menor costo ambiental son los forrajes. El escenario actual de ganadería extensiva en Argentina está demandando mayores producciones de forraje por unidad de superficie, pero al mismo tiempo una calidad nutricional más elevada de las pasturas (Rearte, 2011). Con frecuencia, en los sistemas de producción se presentan situaciones en las que la calidad nutricional del forraje disponible para los animales presenta limitaciones, las cuales afectan la ingestibilidad y utilización digestiva de tal recurso alimentario. En estos casos, el tratamiento post-cosecha del forraje puede ser la única oportunidad para mejorar la respuesta productiva animal a dicho tipo de alimento, si no se dispusiera de suplementos dietarios (Chenost y Kayouli, 1997).

La dinámica ruminal de digestión de los forrajes es de gran importancia, afectando variables como la digestibilidad, el consumo dietario y el nivel de productividad. Los procesos de desaparición de la digesta por digestión y pasaje son parte de tal dinámica. La digestión implica que una partícula de alimento pierda constituyentes potencialmente digestibles y, en función del tiempo, es importante considerar la velocidad a la cual ocurre dicho proceso (Mertens, 2005). La tasa de digestión se puede definir como la proporción o porcentaje de sustrato dietario que se digiere por unidad de tiempo, en un compartimiento del tubo digestivo, por ejemplo el rumen (Van Soest, 1994). Para partículas de alimentos como los forrajes, su forma, tamaño, densidad, flotabilidad, humectabilidad y microestructura laberíntica, son factores que condicionan su tasa de digestión ruminal (k_d) y su tasa de pasaje ruminal, así como su digestibilidad y consumo (Ellis et al., 1994).

La preparación de forrajes mediante tratamientos físicos que reduzcan su tamaño de partícula, como la molienda o el picado, permite modificar su utilización como alimentos para los rumiantes. Las respuestas más frecuentemente encontradas a la molienda o picado de forrajes implican incrementos en el consumo dietario, la ganancia de peso y la eficiencia de conversión (Beardsley, 1964). Mientras tal preparación física de los forrajes para alimentar rumiantes se traduce, consistentemente, en un aumento de la tasa de pasaje de digesta, el efecto sobre la tasa de digestión ruminal (k_d) no resulta tan claro (Van Soest, 1994).

Con relación al material original, la tasa de fermentación se incrementa al disminuir el tamaño de partícula de los forrajes procesados físicamente (Moore, 1964). Gerson *et al.* (1988) observaron que, en cultivos *in vitro* de forraje henificado con bacterias de fluido ruminal ovino, la tasa de producción de gas *in vitro* fue mayor para partículas más pequeñas

de material foliar de gramínea C3 que se utilizó como sustrato. En otro experimento, se encontró que la adhesión de los microorganismos fue mayor en partículas más chicas (Legay-Carmier y Bauchart 1989). El ataque de los polisacáridos estructurales por los microorganismos del 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).

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. Ésta se basa en la idea de que, al disminuir el tamaño de partícula del forraje, se genera un aumento de la superficie de contacto del sustrato con los microorganismos ruminales, lo que conduciría a un aumento de k_d (Stritzler *et al.*, 2011). Aunque el procesado físico de los alimentos aumentaría su área superficial por unidad de masa, 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 (Czerkawski, 1986). De acuerdo a Van Soest (1994), si por efecto de la molienda convencional del forraje se diera un aumento en k_d , 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.

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). Además, podría causar una caída severa de la tasa de digestión, que se relacionaría con una colonización restringida de las partículas por los microorganismos al destruirse las superficies internas del material vegetal (Uden, 1988). Las tasas de degradación ruminal no siempre incrementan con la molienda, tal vez porque la colonización microbiana es afectada por la destrucción de la matriz tridimensional del tejido vegetal (Czerkawski, 1986). En este sentido, Sequeira (1981) encontró que la molienda de forrajes (a tamaños de partícula entre 0,25 mm y 6 mm), a igualdad de composición química, retrasa la velocidad de colonización microbiana a tiempos tempranos de incubación, pero no afecta su tasa de digestión. 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

(Dehority, 1961; Robles *et al.*, 1980; Ford, 1983; Fadlallaa *et al.*, 1987; Emanuele y Staples, 1988; Bjordal *et al.*, 1990), negativo (Le Liboux y Peyraud, 1998; Singhal y Grant, 1998; Alamouti *et al.*, 2009), o neutro (Alwash y Thomas, 1974; Robles *et al.*, 1980; Ehle *et al.*, 1982; Emanuele y Staples, 1988) sobre la tasa de digestión de forrajes.

Considerando la ambigüedad de los resultados asociados al tratamiento convencional de molienda, Pagella *et al.* (2012) estudiaron el efecto del tamaño de partícula de láminas de *Panicum virgatum*, sobre su k_d , recurriendo a la preparación del material vegetal en la forma de discos de distintos diámetros, obtenidos con el uso de sacabocados. Basado en esta última metodología, y adoptando modificaciones de protocolo experimental utilizado por Rainhart y Wiggerhauser (2013), este trabajo estudió la relación entre tamaño de partícula y dinámica de degradación ruminal en leguminosas.

HIPÓTESIS

A mayor relación superficie/volumen del sustrato foliar, asociada a partículas de menor dimensión, se facilita su colonización por microorganismos ruminales y se estimula su tasa de degradación.

OBJETIVO

El objetivo de este estudio fue evaluar la degradabilidad de folíolos de alfalfa (*Medicago sativa* L.), preparados en forma de discos de distinto diámetro, en un sistema de incubación ruminal *in vitro*. La variable estudiada fue la tasa de digestión de la materia seca, como respuesta a los diferentes niveles de superficie de exposición al ataque microbiano.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se realizó en el campo experimental de la Facultad de Agronomía, UNLPam. La cosecha de material foliar se realizó en una pastura de alfalfa en estado vegetativo cercano al 10 % de floración, el día 14 de noviembre de 2013, recolectándose manualmente porciones apicales con folíolos relativamente grandes (Foto 1). Luego, dicho material vegetal se llevó a laboratorio, donde se seleccionaron los folíolos de mayor tamaño para, a partir de ellos, extraer partículas de forma discoidal de distintas dimensiones que no incluyeran la nervadura central, las cuales fueron utilizadas como sustrato en un ensayo de

incubación *in vitro* con fluido ruminal como fuente de inóculo. Tales discos foliares se obtuvieron por medio de un juego de sacabocados (Pagella *et al.*, 2012; Rainhart y Wiggerhauser, 2013), de 3 diámetros distintos, comprendidos en un rango de 2 a 8 mm (Foto 2). Para la determinación de los diámetros efectivos con que resultaron las partículas extraídas de folíolos, por medio de los sacabocados, sobre 30 discos de cada tamaño se efectuaron 2 mediciones en sentido perpendicular por cada uno de ellos. Ello se llevó a cabo utilizando una lupa marca Olympus SZ30, colocándose un reglilla sobre los discos y tomando como referencia una faja de papel milimetrado ubicada sobre la platina, recurriéndose a una equivalencia de 10 divisiones de la escala por cada milímetro en la faja de papel (Foto 3). Los discos foliares fueron conservados en heladera a 5°C por 48 h, hasta su inmediata utilización como sustrato de incubación. Con el objetivo de estimar la diferencia en perímetro total de exposición, para la masa de sustrato que se utilizó en las incubaciones, otra determinación llevada a cabo, fue el conteo de discos de cada uno de los diámetros ensayados contenidos en una masa de 0,3 g.

Para la evaluación de la tasa de digestión del sustrato preparado como se describió anteriormente, se recurrió a un protocolo de incubación *in vitro*, por períodos de tiempo diferentes: 2, 4, 6, 9, 12, 18, 24, 60 y 96 h. Por cada tamaño de partícula, y tiempo de incubación, se prepararon tubos de 100 ml de capacidad, en los que se colocaron 0,3 g de discos de material foliar fresco retirados de la heladera. Cada muestra se trabajó por cuadruplicado para reducir el error experimental, registrándose el peso exacto correspondiente de sustrato. Luego, a cada tubo, se le agregaron 30 ml de fluido ruminal tamponado. Este último consistió de una mezcla de los siguientes componentes: (1) fluido ruminal obtenido por filtración, a través de tela de muselina, de contenido de digesta ruminal colectado previamente de un novillo Hereford provisto de una cánula ruminal permanente, alimentado con heno de alfalfa durante la semana anterior a la extracción, y (2) una solución de saliva artificial preparada de acuerdo a Tilley y Terry (1963). La mezcla contenía 1 parte de fluido ruminal filtrado y 4 partes de saliva artificial, y fue preparada en una cuba mantenida a 39°C, y sometida a gasificación con dióxido de carbono. Para ello, en el laboratorio fue necesario generar condiciones similares a las del ambiente ruminal, teniendo un estricto control de la anaerobiosis, pH y temperatura en la preparación de los incubados, lo cual es imprescindible para la supervivencia y actividad normal de los microorganismos que aporta el fluido ruminal obtenido de un animal donante. Dicho fluido se obtuvo de un bovino fistulado, por lo que el animal no se constituyó en un factor de variación en el experimento, como sucede en la técnica *in situ*. Adicionalmente, en la utilización de esta última se debe tener control de otras

fuentes de variación como, por ejemplo, el tamaño de los poros de la tela de nylon, el número de poros por unidad de superficie, la cantidad de muestra a incubar, el número de bolsitas introducidas en cada animal y la posición de las bolsitas en el rumen (Romero, 1992).

Acompañando a los incubados de los sustratos objeto de estudio, se incluyeron tubos que contenían solamente el medio líquido de la mezcla, a modo de blanco, para ponderar el aporte de pequeñas partículas de digesta presentes aun en el fluido ruminal filtrado. Inmediatamente después de dosificarse, los tubos se cerraron con tapones provistos de válvula de Bunsen para permitir el escape de gases de fermentación (Foto 4), y se colocaron en baño con control termostático a 39°C, exponiéndose a sus correspondientes períodos experimentales de incubación. El tratamiento de 0 h correspondió a la pérdida de fracción inmediatamente soluble, de cada tipo preparado de sustrato. Para ello se procedió a colocar 0,3 g del mismo, junto con 30 ml de agua destilada a 39°C, en tubos cerrados con tapón de goma (Foto 5). Esta incubación se realizó por cuadruplicado, para cada tamaño de disco foliar, en baño termostático y con agitación manual suave por 15 minutos. Luego de cumplido su período correspondiente de incubación, todos los tubos fueron retirados para trasvasar su contenido a crisoles con placa de vidrio cribada, 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 sustrato ensayado (Foto 6). Durante esta filtración forzada, los residuos de incubación retenidos en el crisol se lavaron con agua destilada a temperatura ambiente, hasta que el líquido de filtrado se mostrara límpido. El volumen utilizado para cada lavado fue de 300 ml, fraccionándose en 10 aplicaciones. Finalmente, los crisoles fueron llevados a estufa para su secado a 105°C hasta peso constante. Tomando en cuenta los residuos secos de incubación de los sustratos, corregidos por el residuo seco de los tubos blanco, así como el peso seco original de los mismos en los incubados, se calcularon los correspondientes porcentajes de desaparición de materia seca.

Sobre muestras sin tratar, del mismo material de incubación, se realizaron determinaciones, de concentración de materia seca, proteína bruta (PB) según AOAC (1980) y de fibra en detergente neutro (FDN), esta última mediante el método de Goering y Van Soest (1970).

Los tratamientos experimentales, resultantes de la combinación de 3 tamaños distintos de partícula y 9 tiempos de incubación, se aplicaron siguiendo un diseño experimental completamente aleatorizado, utilizando cuatro repeticiones por cada tratamiento. Los datos de degradación de los sustratos se sometieron a análisis de regresión por ajuste a la función

asintótica $y = a + b (1 - e^{-c \cdot t})$, 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 (o sea la variable de estudio k_d). Los valores observados de degradación para los distintos tiempos de incubación, organizados en 4 grupos al azar por tamaño de disco foliar, se ajustaron al modelo de regresión monoexponencial que describe la función asintótica antes mencionada, a partir del cual se estimó k_d y otros parámetros de degradabilidad ruminal para cada uno. El contraste de tratamientos se realizó mediante análisis de varianza, asociado a un diseño completamente aleatorizado, y prueba de Tukey, recurriendo al uso del programa estadístico Infostat versión 2011 (Di Rienzo *et al.*, 2011).

Como un estudio complementario, luego del secado en estufa, se recuperaron residuos de sustrato correspondientes a incubaciones por 2, 24 y 96 h, tiempos lo suficientemente distanciados como para apreciar por microscopía la evolución de la degradación ruminal de los discos foliares, de los distintos tamaños ensayados. Dichos materiales residuales fueron luego acondicionados, para su observación a través de un microscopio marca Leica DM 500, provisto de una cámara fotográfica marca Leica ICC50 HD.



Foto 1. Pastura de *Medicago sativa*.

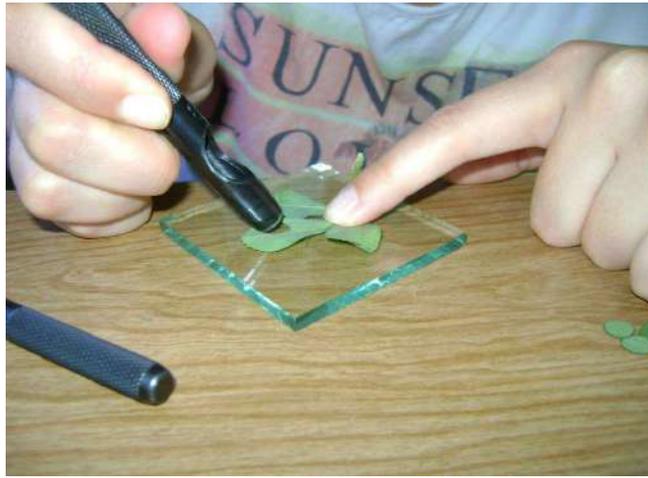


Foto 2. Obtención de discos de material fresco de folíolos de alfalfa, con sacabocados.

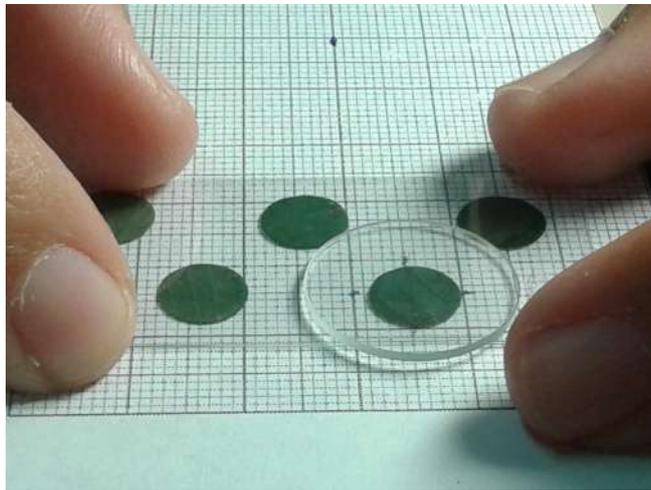


Foto 3. Reglilla sobre un disco foliar ubicado en una faja de papel milimetrado.



Foto 4. . Tubos preparados con válvula de Bunsen para la incubación de los sustratos foliares.



Foto 5. Tubos con sustrato correspondientes al tratamiento de 0 h.



Foto 6. Recuperación en crisoles de vidrio, mediante filtrado, de los residuos de incubación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El material foliar de *Medicago sativa* utilizado en este estudio como sustrato de incubación, se caracterizó por poseer concentraciones de MS de 57,14%, PB/MS de 37,56% y FDN/MS de 22,99%. Cuando se introdujeron estos dos últimos datos en una ecuación de regresión múltiple, obtenida por Pagella *et al.* (1996), se obtuvo un valor estimado de digestibilidad de MS, para dicho material foliar, de 75,67 %. Estos valores de variables de valor nutritivo se corresponden con un alimento de alta calidad, lo cual se presumía teniendo en cuenta el estado fenológico de la pastura al momento de la colección de material vegetal por corte. La concentración de PB del material foliar usado como sustrato de incubación,

parecería ser demasiado elevado pero, considerando que estuvo constituido por biomasa de folíolos del tercio superior de la planta en estado temprano de crecimiento, y que no se incluyó la nervadura central de los mismos, tal valor es factible de ser justificado.

En este trabajo, se hizo uso parcial de la técnica de determinación de digestibilidad *in vitro* de la materia seca, o de Tilley y Terry (1963), en cuanto a que se aplicó la etapa que trata de reproducir el proceso de digestión dentro del rumen. El hecho de tener controlado el pH del medio de incubación *in vitro*, permitió evitar efectos inhibitorios sobre la actividad degradativa microbiana, los cuales pueden manifestarse en estudios *in vivo* (Le Liboux y Peyraud, 1998; Alamouti *et al.*, 2009).

La molienda ha sido un tratamiento físico bastante estudiado para mejorar la utilización de forrajes (Berger *et al.*, 1994). En este trabajo, la preparación de sustrato consistió en la obtención de discos, mediante el uso de un dispositivo sacabocados, lo cual permitió mantener la estructura foliar intacta, a diferencia de lo que ocurre en el tratamiento de molienda. Esta condición de preparación del sustrato se acercaría, en cierto modo, a la forma en la cual las partículas de forraje ingerido se exponen al ataque microbiano en el ambiente ruminal (Czerkawski, 1986; Uden, 1988), al no modificarse la estructura tridimensional.

En el rango de tamaños de partículas ensayado en este trabajo, para el material foliar de alfalfa, puede observarse que el menor de ellos (diámetro aproximado de 2 mm) se correspondería con el tamaño crítico de partícula que abandona el retículo-rumen (Poppi *et al.*, 1981; Ulyatt *et al.*, 1986), a través del orificio retículo-omasal. Los otros dos tamaños de partícula (diámetros aproximados de 5 y 8 mm), se acercarán al de la digesta sólida que, estando retenida en el retículo-rumen, es capaz de ingresar en el circuito de rumia. La evaluación de diámetros efectivos de los discos foliares, obtenidos con el de sacabocados, arrojó valores de $2,01 \pm 0,61$ mm (D2), $4,82 \pm 0,89$ mm (D5) y $8,00 \pm 0,47$ mm (D8), resultados que se muestran en la Tabla 1. Como era de esperarse, la variabilidad en el diámetro de partícula fue disminuyendo a medida que se incrementó su tamaño (CV: D2=0.303; D5=0,184; D8=0,058). Por otro lado, en dicha tabla se presentan, para cada tamaño de partícula, valores de número de discos foliares que se incluyen en una masa de 0,3 g, la cual correspondió a la cantidad de sustrato incluido en las incubaciones. Además, los dos tipos de datos antes mencionados se emplearon para calcular, como valor total, el perímetro de exposición de los discos foliares incluidos en la cantidad de masa de referencia, para la incubación de los sustratos. Como se observa en la Tabla 1, el perímetro total de exposición calculado para D8 resultó 3 veces menor que en el caso de D2. Este hecho habría otorgado

una buena posibilidad de encontrar diferencias estadísticas entre los distintos tamaños de partícula, aun cuando el rango de diámetro de partícula ensayado en este trabajo parecería exiguo (brecha de 6 mm entre D2 y D8). El perímetro de los discos foliares, constituyó, probablemente, un micronicho excelente para la colonización y posterior degradación del material vegetal por microorganismos ruminales.

Tabla 1. Valores dimensionales de discos foliares ensayados como sustrato de incubación.

Tamaño de partícula	Diámetro (mm)	Nº de discos / 0,3 g (*)	Perímetro (m/0,3 g)
D2	2,01 (0,61)	444	2,80
D5	4,82 (0,89)	102	1,55
D8	8,00 (0,47)	35	0,88

Valores entre paréntesis refieren al desvío estándar.

(*) Valores obtenidos por conteo y pesada de discos de material foliar.

Aplicando un protocolo de incubación *in vitro* con fluido ruminal tamponado, similar al utilizado en otro trabajo en el que se estudió la degradación de láminas foliares de una gramínea megatérmica (Pagella *et al.*, 2012; Rainhart y Wiggerhauser, 2013), en esta investigación se estudió el efecto del tamaño de partícula sobre la tasa de digestión de material foliar de alfalfa. Los resultados de tal prueba de degradabilidad ruminal *in vitro*, se presentan en la Tabla 2 y Figura 1.

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

Tamaño de partícula	Horas de incubación									
	0	2	4	6	9	12	18	24	60	96
D2	31,98 (1,92)	56,17 (2,01)	59,36 (0,92)	60,86 (0,29)	65,33 (1,15)	66,36 (1,82)	69,34 (2,53)	76,3 (1,37)	86,91 (0,92)	89,09 (1,61)
D5	43,13 (4,88)	57,29 (0,54)	59,72 (1,96)	62,4 (0,55)	69,16 (0,72)	70,18 (1,06)	71,71 (1,21)	76,84 (1,09)	88,37 (0,66)	90,34 (0,99)
D8	35,08 (0,58)	51 (3,69)	56,23 (1,88)	58,93 (2,72)	67,56 (3,70)	67,61 (1,13)	71,68 (2,21)	75,58 (2,09)	86,78 (1,26)	86,78 (0,88)

Valores entre paréntesis refieren al desvío estándar.

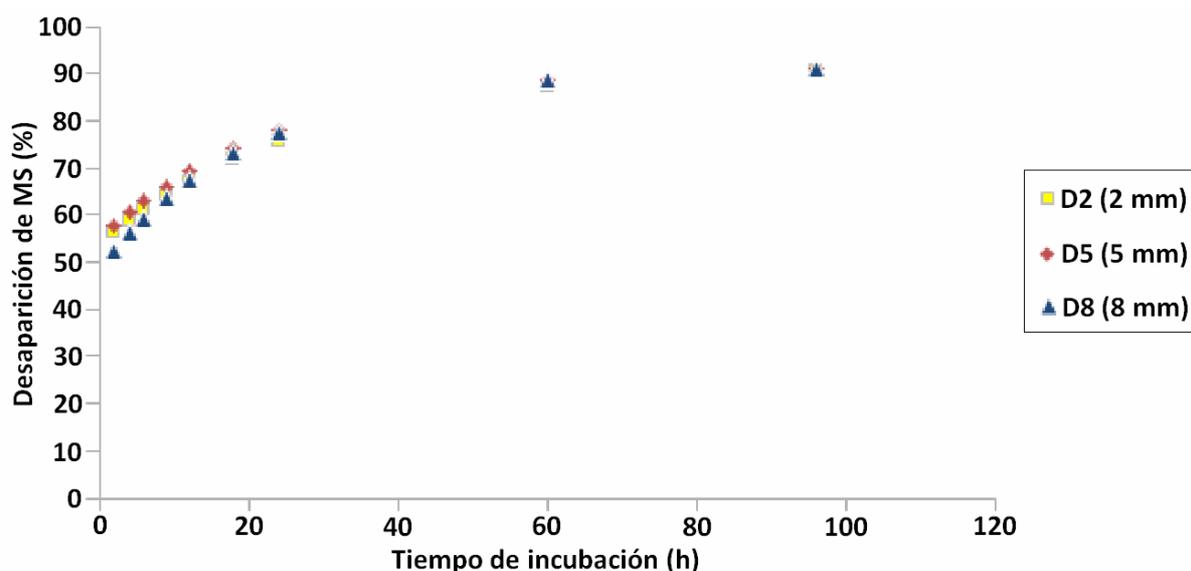


Figura 1. Desaparición de materia seca en función del tiempo de incubación, para los distintos tratamientos.

Se puede observar que los valores de desaparición de MS tuvieron un buen ajuste al modelo de regresión de respuesta asintótica y, que además, en todos los tiempos de incubación se verifica una franja muy estrecha de solapamiento en ellos. Del análisis de regresión aplicado a las observaciones de degradabilidad, utilizando el modelo monoexponencial de Ørskov y Mc Donald (1979), se obtuvieron valores de ajuste correspondientes a las variables de dinámica de digestión del sustrato (Tabla 3), como son la fracción rápidamente soluble (*a*), la fracción insoluble potencialmente degradable (*b*) y la tasa de digestión (*c*) de la fracción *b*, para cada tamaño de partícula.

Tabla 3. Valores de las variables de la dinámica de digestión, para los distintos tamaños de partícula.

Variable	Tamaños de partícula		
	D2	D5	D8
Fracción rápidamente soluble (<i>a</i>)	53,7 (1,2)	54,9 (0,5)	48,8 (2,3)
Fracción insoluble potencialmente degradable (<i>b</i>)	37,9 (3,1)	37,2 (0,9)	42,6 (2,6)
Tasa de digestión (<i>c</i>) de la fracción <i>b</i>	0,036 (0,003)	0,040 (0,004)	0,047 (0,005)

Valores entre paréntesis refieren al desvío estándar.

El resultado del análisis de varianza, para los distintos tamaños de partículas, aplicado a la tasa de degradación ruminal (c) de la fracción b , como estimación de k_d , se observa en la Tabla 4. Al comparar los valores de c , se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$). Aplicado el test de Tukey, se verificó que los discos del tamaño D8 exhibieron valores significativamente mayores a los de tamaño D2, mientras que los de tamaño D5 no se diferenciaron de los anteriores (Tabla 5).

Tabla 4. Resultados del análisis de varianza para la variable tasa de digestión.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,000230	2	0,000120	5,63	0,026
Tamaños	0,000230	2	0,000120	5,63	0,026
Error	0,000190	9	0,000021		
Total	0,000420	11			

Tabla 5. Resultados del test de Tukey para la evaluación de diferencia de medias entre distintos tamaños de discos foliares.

Tamaños	Medias	n	E.E.		
D2	0,036	4	0,00230	A	
D5	0,040	4	0,00230	A	B
D8	0,047	4	0,00230		B

Resultados similares al de este trabajo se observaron, en un caso por incubación ruminal *in situ* de paja de trigo (Singhal y Grant, 1998), como sustrato preparado en partículas de dimensiones comprendidas entre 0,17 mm y 9,5 mm, y en otros dos, por ensayos de alimentación con forraje de alfalfa (Le Liboux y Peyraud, 1998; Alamouti *et al.*, 2009). Aunque el procesamiento de los forrajes por molienda y peleteado les provee un aumento considerable del área superficial de exposición, la utilización digestiva aloenzimática de los polisacáridos estructurales, de tales sustratos vegetales, no resulta en general incrementada (Varga y Kolver, 1997). Otros investigadores, como Kennedy y Murphy (1988), sostuvieron que la reducción del tamaño de partícula de los forrajes afecta de manera variable su tasa de digestión ruminal, lo cual puede depender de factores intrínsecos de cada tipo de recurso lignocelulósico. Por ejemplo, Varga y Kolver (1997) consideraron que la tasa de digestión ruminal de los componentes estructurales de la fibra vegetal está determinada, en gran medida, por factores tales como la accesibilidad física al sustrato y la naturaleza físico-química del forraje. De ello, resulta aparente que los atributos asociados al material dietario

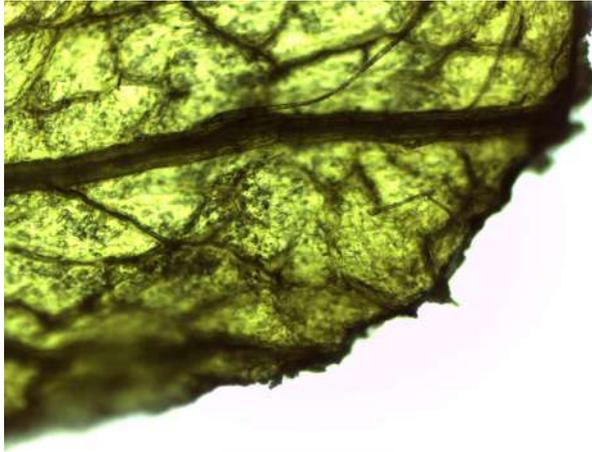
imponen un límite superior a la expresión de la tasa de digestión (Mertens y Ely, 1982). La accesibilidad de las partículas dietarias de forraje a los microorganismos del rumen, y sus enzimas hidrolíticas, parecería ser óptima si se mantiene la estructura tridimensional del tejido vegetal (Czerkawski, 1986). Dicha estructura natural facilita la colonización del sustrato por microorganismos para lo cual, previamente, debe producirse la humectación del mismo. Esto da lugar a una propiedad del sustrato conocida como capacidad de humectación, la que a su vez depende de otras variables como grupos químicos hidrofílicos de superficie y el tamaño de partícula (Allen y Mertens, 1988). En consecuencia, desde el punto de vista de la colonización microbiana del sustrato, se produce una demora en tal proceso que recibe el nombre de “fase lag”.

De no haberse alterado la estructura tridimensional natural del material foliar utilizado como sustrato, en la forma en que fue preparado de acuerdo al protocolo del presente trabajo, se puede especular que ello no habría conducido a la ocurrencia de diferencias entre los distintos tamaños de discos, en cuanto a la duración de la fase lag. Sin embargo, una vez que los microorganismos han completado su adhesión a las partículas de sustrato, cabe la posibilidad de que cambien las condiciones del micronicho donde realizan su actividad degradativa. En el caso particular de los discos foliares usados como sustrato de incubación en este trabajo, su banda perimetral producida por el dispositivo sacabocados, como elemento de corte, se constituyó en el principal micronicho de ataque microbiano, ya que tanto las caras adaxial como abaxial de la hoja poseen cubiertas hidrofóbicas de ceras y cutinas, las cuales limitan su invasión por microorganismos ruminales (Allen y Mertens, 1988). En tal sentido, si eventualmente hubiera ocurrido que la intensidad inicial de la actividad microbiana fuese mayor sobre la masa de sustrato con menor tamaño de partícula (D2) que, a su vez, se asociara a un perímetro total de exposición más dilatado, podría esperarse un microambiente de la superficie de ataque que se diferencie del correspondiente al sustrato preparado en las dimensiones D5 y D8. Una explicación posible para la menor tasa de digestión observada en incubados de partículas D2, podría relacionarse con un probable valor de pH más bajo en el microambiente circundante a las mismas (Cheng *et al.*, 1984). Ello tendría un efecto negativo sobre la actividad de la microbiota fibrolítica, además de estimular el reemplazo de cationes (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+}) por iones H^+ en la partícula de forraje, siendo esto último un impedimento para la adhesión microbiana al sustrato, en la cual intervienen Ca^{2+} y Mg^{2+} como puentes (Roger *et al.*, 1990).

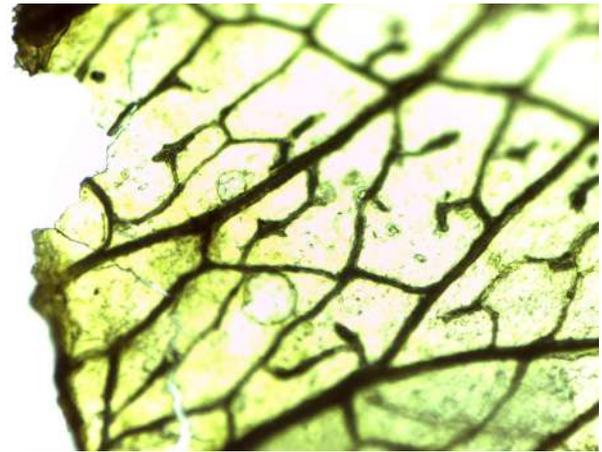
La digestión de una partícula sólida de sustrato es, fenomenológicamente, un proceso localizado a nivel de su área superficial. Cuanto menor sea el tamaño de la partícula, su área

superficial de exposición se magnifica con relación al volumen de la misma, y se esperaría que su digestión ocurra a una velocidad mayor, en comparación con aquellas de tamaño más grande. Sin embargo, la tasa de digestión podría no ser proporcional al área superficial de la partícula, si ésta se aglutina con otras similares, u otros materiales sólidos de la digesta se unen a ella (Lentle y Janssen, 2011). Durante la ejecución del protocolo experimental *in vitro*, de este trabajo, en los incubados que incluyeron partículas de sustrato del tamaño D2 se observó, al momento de proceder a la agitación de los tubos, una tendencia a la agregación entre ellas. Además, el residuo de partículas pequeñas de digesta aportadas por el fluido ruminal filtrado, que fuera utilizado como fuente de inóculo en los incubados, también tendió a aglutinarse con los discos foliares en el fondo de los tubos. Como la agitación de dichos tubos no se realizó de manera continua, sino a tiempos regulares y discretos, podría haber la posibilidad de algún efecto diferencial sobre la tasa de digestión asociado a la aglutinación de las partículas del sustrato. En consideración de tal aspecto, los estudios que se realicen en esta línea de trabajo, utilizando un protocolo experimental similar, en el futuro deberían recurrir a un sistema automatizado de agitación continua de los incubados.

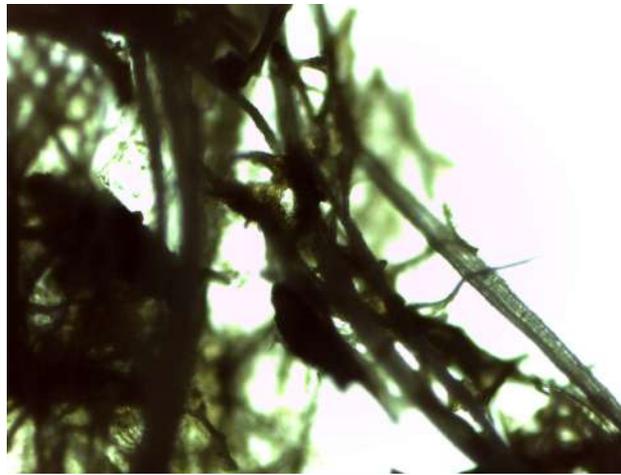
Como registro de la evolución del proceso degradativo aloenzimático del sustrato, en la Foto 7 se muestran imágenes de observaciones microscópicas de discos de folíolos de alfalfa que fueron sometidos a incubación, por 2, 24 y 96 h, en la ejecución de este trabajo experimental. En la imagen 7(a), correspondiente al tratamiento de 2 h de incubación, se evidencia que el borde de corte del disco foliar presentó irregularidades, lo cual pudo haberse constituido en una fuente de variación, afectando el perímetro expuesto de las partículas al ataque microbiano. Comparando las imágenes 7(a), 7(b) y 7(c), se puede apreciar el grado de avance de la degradación del material vegetal, sobre todo en los espacios entre nervaduras, evidenciando que estas últimas concentran las estructuras tisulares más resistentes al ataque microbiano. Dichas imágenes, mostrando la evolución en la degradación ruminal del material vegetal, representan un testimonio gráfico de lo que Van Soest (1975) ha postulado como la “teoría del hotel”, la cual explica que el volumen estructural de las partículas de digesta se mantiene con el progreso de la digestión, aun cuando éstas hayan ido perdiendo masa con el tiempo.



(a)



(b)



(c)

Foto 7. Vistas microscópicas con lente 10X, de discos foliares de alfalfa después de haberse incubado con fluido ruminal tamponado, por distintos tiempos de incubación: (a) 2 h; (b) 24 h; (c) 96 h.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos no confirmaron la hipótesis planteada de que, a menores tamaños de partícula de un sustrato constituido por material foliar, su tasa de digestión ruminal resulta de mayor magnitud, como sería de esperarse de acuerdo a la teoría del área superficial de exposición. Por el contrario, se observó que la tasa de digestión aloenzimática ruminal, de folíolos de *Medicago sativa*, resultó estadísticamente de menor valor para el tamaño de partícula más pequeño, comparado con el mayor en el rango ensayado de dimensiones. En función de los resultados del presente trabajo, se plantea la necesidad de avanzar en el conocimiento de fenómenos del ambiente ruminal relacionados con la interfaz microorganismos-sustrato.

AGRADECIMIENTO

A nuestro director de tesis Dr. Horacio Pagella por sus consejos, ayuda, dedicación y predisposición.

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

A los ayudantes de laboratorio Sergio Lardone y Néstor Balzer, por su colaboración.

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

A la 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.
- Alwash, A.H. and Thomas, P.C. (1974). Effect of the size of hay particles on digestion in the sheep. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **25**, 139–147.
- AOAC [Association of Official Analytical Chemists] (1980). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, 13rd Edition [W. Horwits, Editor], p. 15. Washington, USA: AOAC Publishers.
- 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.
- Bjorndal, K.A, Bolten, A.B. and Moore, J.E. (1990). Digestive fermentation in herbivores: effect of food particle size. *Physiological Zoology* **63**, 710-721.
- Cheng, K.-J., Stewart, C.S., Dinsdale, D. and Costerton, J.W. (1984). Electron microscopy of bacteria involved in the digestion of plant cell walls. *Animal Feed Science and Technology* **10**, 93-120.
- Chenost, M. and Kayouli, C. (1997). *Roughage Utilization in Warm Climates*, FAO Animal Production and Health Paper 135. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations. 226 p.
- Czerkawski, J.W. (1986). *Introduction to Rumen Studies*. Oxford, UK: Pergamon Press.
- Dehority, B.A. and Johnson, R.R. (1961). Effect of particle size upon the *in vitro* cellulose digestibility of forages by rumen bacteria. *Journal of Dairy Science* **44**, 2242-2249.

- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.W. (2011). InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Ehle, F.R., Murphy, M.R. and Clark, J.H. (1982). *In situ* particle size reduction and the effect of particle size on degradation of crude protein and dry matter in the rumen of dairy steers. *Journal of Dairy Science* **65**, 963-971.
- 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, USA: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America and Soil Science Society of America.
- Emanuele, S.M. y Staples, C.R. (1988). Effect of forage particle size on *in situ* digestion kinetics. *Journal of Dairy Science* **71**, 1947-1954.
- Fadlallaa, B., Kay, R.N.B and Goodall, E.D. (1987). Effects of particle size on digestion of hay by sheep. *Journal of Agricultural Science* **109**, 551-561
- Ford, C.W. (1983). Effect of particle size and delignification on the rate of digestion of hemicellulose and cellulose by cellulase in mature Pangola grass stems. *Australian Journal of Agricultural Research* **34**, 241-248.
- Gerson, T., King, A.S.D., Kelly K. E. 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, USA: Agricultural Research Service.
- 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**, 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.
- 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.
- 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.
- Lentle, R.G. and Janssen, P.W.M (2011). *The Physical Processes of Digestion*. New York, USA: Springer Science-Business Media.
- Mertens, D.R. and Ely, L.O. (1982). Relationship of rate and extent of digestion to forage utilization - A dynamic model evaluation. *Journal of Animal Science* **54**, 895-905.
- 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 dairy 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.
- 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.
- Pagella, J.H., Wiggenhauser, W., Rainhart, L., Rabotnikof, C.M., Stritzler, N.P. y Fuentes, M.E. (2012). Tasa de digestión de hojas de *Panicum virgatum* de distintos tamaños de partícula. *Revista Argentina de Producción Animal* **32**, Suplemento 1, 152.
- Poppi, D.P., Minson, D.J. and Ternouth, J.H. (1981). Studies of cattle and sheep eating leaf and stem fractions of grasses. II. Factors controlling the retention of feed in the reticulo-rumen. *Australian Journal of Agricultural Research* **32**, 109-121.
- Rainhart, L. y Wiggenhauser, W. (2013). Evaluación de la tasa de degradación microbiana de hojas de *Panicum virgatum* con diferentes diámetros de partícula. Trabajo Final de Graduación, Carrera de Ingeniería Agronómica, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de La Pampa, Santa Rosa, La Pampa, Argentina, 27 p.

- Rearte, D.H. (2011). Los forrajes en la alimentación de rumiantes. En *Producción Animal en Pastoreo*, Segunda Edición, pp. 13-29 [C.A. Cangiano y M.A. Brizuela, Editores]. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina: Ediciones INTA.
- 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* **51**, 783-790.
- Roger, V., Fonty, G., Komisarczuk-Bony, S. and Gouet, P. (1990). Effects of Physicochemical Factors on the Adhesion to Cellulose Avicel of the Ruminal Bacteria *Ruminococcus flavefaciens* and *Fibrobacter succinogenes* subsp. *Succinogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* **56**, 3081-3087.
- Romero, F. (1992). Utilization of the *in situ* digestion technique for forage characterization. In: *Ruminant Nutrition Research, Methodological Guidelines*, pp.121-129 [M.E. Ruiz and S.E. Ruiz, editors]. Costa Rica, San José: Inter-American Institute for Cooperation on Agriculture.
- Sequeira, C.A. (1981). Effect of grinding on the *in vitro* digestibility of forages. Master of Science thesis, Cornell University, Ithaca, New York, USA.
- Singhal K.K. and Grant, R. (1998). Effect of Particle Size Reduction on Fibre Digestion Kinetics of Wheat Straw. *Indian Journal of Animal Nutrition* **15**, 1-5.
- Stritzler, N.P., Rabotnikof, C.M., Ferri, C.M. y Pagella, J.H. (2011). Los forrajes en la alimentación de rumiantes. En *Producción Animal en Pastoreo*, Segunda Edición, pp. 155-180 [C.A. Cangiano y M.A. Brizuela, Editores]. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina: Ediciones INTA.
- Thomson, D.J. and Beaver, 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.
- Tilley, J.M.A. and Terry, R.A. (1963). A two stage technique for *in vitro* digestion of forage crops. *Journal of the British Grassland Society* **18**, 104-111.
- Uden, P. (1988). The effect 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.
- Ulliyat, M.J., Dellow, D.W., Reid, C.S.W. and Waghorn, G.C. (1986). Contribution of chewing during eating and rumination to the clearance of digesta from the ruminoreticulum. In *Control of Digestion and Metabolism in Ruminants*, pp. 498-515

[L.P. Milligan, W.L. Grovum and A. Dobson, editors]. Englewood Cliffs, New Jersey, USA: Prentice-Hall.

Van Soest, P.J. 1975. Physico-chemical aspects of fibre digestion. In *Digestion and Metabolism in the Ruminant*, pp. 351-365 [I.W. McDonald and A.C.I. Warner, editors]. Armidale, Australia: University of New England Publishing Unit.

Van Soest, P. (1994). *Nutritional Ecology of the Ruminant*, Second Edition. Ithaca, New York, USA: Cornell University Press.

Varga, G.A. and Kolver, E.S. (1997). Microbial and Animal Limitations to Fiber Digestion and Utilization. *Journal of Nutrition* **127**, 819S-823S.