

EFECTO DE LA RACIÓN DE LOS ANIMALES DONANTES DE LÍQUIDO RUMINAL SOBRE LA DEGRADABILIDAD *IN VITRO* DE PAJAS Y SUBPRODUCTO DE LIMÓN

Effect of diet of the donor animals of ruminal fluid on the *in vitro* degradation of straws and lemon by-product

J. Cid[†], F. Hernández, J. Madrid*, M.D. Megías, J. Orengo

Departamento de Producción Animal. Universidad de Murcia. Campus de Espinardo, 30071, Murcia.

*correspondencia a: alimen@um.es

RESUMEN

En el experimento se utilizaron cinco tipos de subproductos: paja, paja suplementada con urea, paja tratada con urea, paja tratada con urea+NaOH y un subproducto cítrico. La degradabilidad de cada subproducto fue determinada usando un método de fermentación *in vitro* con líquido ruminal de cabra. Se obtuvieron dos tipos de líquido ruminal dependiendo de la alimentación de las cabras (paja o heno de alfalfa). Los alimentos fueron incubados a 39°C durante 12, 24, 36, 48 y 72 h con cada uno de los tipos de líquido ruminal. Para cada tiempo, se determinó la degradación de la materia seca. El origen del inóculo afectó significativamente ($P<0.001$) la fermentación *in vitro*. Los niveles menores de degradación de la materia seca fueron observados en las incubaciones con el líquido ruminal procedente de las cabras alimentadas con paja. La interacción, tipo de inóculo x tiempo de incubación fue significativa ($P<0.001$), así el incremento de la degradación entre las 12 y 24 h fue marcadamente superior en las incubaciones con el líquido ruminal de cabras alimentadas con heno de alfalfa. Así mismo, se determinó la concentración total de ácidos grasos volátiles y la proporción molar de cada ácido en el rumen a las 48 h. Los mayores niveles de ácidos grasos volátiles se observaron con el líquido ruminal procedente de las cabras alimentadas con heno de alfalfa. Estos datos confirman que la calidad de la dieta de los animales donantes de líquido ruminal afecta a la degradación y a la producción de productos finales de fermentación.

Palabras clave: fermentación *in vitro*, animales donantes de líquido ruminal, subproductos

[†] En memoria del Dr. José Manuel Cid Díaz, Catedrático de Nutrición y Alimentación Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia.

ABSTRACT

The samples used in the experiment were five types of by-products: straw, straw supplemented with urea, straw treated with urea, straw treated with urea+NaOH, and citrus by-product. The dry matter degradability of each by-product was determined by *in vitro* fermentation with ruminal fluid of goat. Rumen fluids from goats fed with two different diets: straw or alfalfa hay. The materials were incubated at 39°C for 12, 24, 36, 48 y 72 h with each rumen fluid type. At each time, the dry matter disappearance was measured. The inoculum source significantly ($P<0.001$) influenced *in vitro* fermentation. The lowest values of dry matter degradation were observed with the ruminal fluid from goats fed with straw. The inoculum type x incubation time interaction was significant ($P<0.001$), thus an increased level of average dry matter degradation between 12 and 24 h of incubation was the marker for values observed with the ruminal fluid from goats fed with alfalfa hay. In addition, the total concentrations of volatile fatty acids and the molar proportions of each individual acid in the rumen liquor at 48 h of incubation were measured. The highest values of concentrations of volatile fatty acids were observed with the ruminal fluid from goats fed alfalfa hay. In conclusion, the quality of diet of donor animals of ruminal fluid influenced dry matter degradation and fermentation end-products.

Keywords: *in vitro* fermentation, donor animals of ruminal fluid, by-products

INTRODUCCIÓN

El valor nutritivo de los alimentos destinados a la alimentación de los rumiantes depende del grado y extensión de su degradación a nivel ruminal. Así, la degradabilidad constituye un parámetro altamente indicativo de las características fermentativas de los alimentos y sus nutrientes. La determinación de la degradabilidad se puede realizar por métodos *in vivo*, *in situ* (Ørskov *et al.* 1980) o *in vitro* (Wilman *et al.* 1996). Las técnicas *in vivo* son muy costosas y están altamente tecnificadas, por lo que los métodos *in situ*, o también denominados *in sacco*, son las técnicas de elección más utilizadas. Estos métodos consisten en la incubación del alimento a diferentes tiempos, en el rumen y dentro de bolsas de nylon, con el fin de modelizar la cinética de degradación del alimento. Sin embargo, esta técnica no permite monitorizar los productos finales de fermentación como los ácidos grasos volátiles que constituyen un parámetro también esencial para caracterizar el valor nutritivo de los alimentos para rumiantes.

Actualmente, se están desarrollando técnicas *in vitro* con líquido ruminal que son capaces

de determinar las características fermentativas como la degradabilidad y la producción de ácidos grasos volátiles simultáneamente (Madrid *et al.* 2002). El tipo y la actividad de los microorganismos ruminales presentes en el líquido ruminal son los responsables de la digestión *in vitro* de los alimentos. Cabe destacar que la población microbiana ruminal se ve afectada por numerosos factores, así la procedencia del inóculo ruminal se considera la mayor fuente de variación en la determinación de la digestibilidad, degradabilidad y producción de gas *in vitro* (Marten y Barnes 1980; Nagadi *et al.* 2000). En este sentido, la ración ingerida por los animales empleados como donantes en las técnicas *in vitro* ha sido señalada como uno de los principales factores que afectan al número y actividad de los microorganismos ruminales y que consecuentemente pueden afectar a los valores de la digestibilidad *in vitro* de los alimentos (Weis 1994). El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la calidad de la ración de animales empleados como donantes de líquido ruminal en técnicas *in vitro*, sobre la degradabilidad y productos de fermentación de distintos tipos de pajas y un subproducto de limón.

MATERIAL Y MÉTODOS

Colección de líquido ruminal y muestras

Para la realización de este estudio se dispuso de cuatro cabras adultas de raza Murciano-Granadina. Los animales se dividieron en dos grupos que consumieron dos tipos de dietas diferentes, heno de alfalfa (*Medicago sativa L.*) o paja de cebada (*Hordeum vulgare L.*) *ad libitum*. Transcurridos 14 días de adaptación a la dieta se recogió el líquido ruminal de cada animal. El fluido ruminal fue inmediatamente transportado en termos hasta el laboratorio y filtrado a través de cuatro capas de gasa, procediéndose a la mezcla (a partes iguales) del líquido ruminal procedente de los dos animales que recibían la misma ración. Cada una de las mezclas de líquido ruminal permanecieron en condiciones anaerobias gaseándose continuamente con CO₂, siendo utilizadas como inóculo para determinar la degradabilidad *in vitro* de cinco muestras de alimentos: subproducto de limón (*Citrus limon L.*), paja de cebada (*Hordeum vulgare L.*) no suplementada, suplementada con urea, tratada con urea y tratada con urea+NaOH. Todas las muestras fueron desecadas a 60°C durante 48 h y molidas a 1 mm de luz de malla. La composición química de los alimentos incubados figura en el Cuadro 1 habiendo sido determinada previamente (Madrid *et al.* 1999 a).

Procedimiento *in vitro*

Para determinar la degradabilidad *in vitro*, cada muestra (0.5 g) fue depositada en un tubo de centrífuga (capacidad de 50 ml) y se le adicionó 10 ml de inóculo ruminal y 40 ml de solución buffer McDougall, como se describe en el primer paso del método de Tilley y Terry (1963) para determinar la digestibilidad *in vitro* de forrajes (Marten y Barnes 1980). Los tubos fueron saturados con CO₂, se cerraron con tapo-

nes provistos de válvulas de gas e inmediatamente fueron incubados a 39°C durante 12, 24, 36, 48 y 72 horas. Cada muestra fue incubada por duplicado para cada tipo de inóculo y tiempo de incubación. Después de cada tiempo de incubación el contenido de los tubos fue filtrado en papel Whatman® 541, recuperándose el residuo no degradado. Estos residuos no degradados fueron desecados y pesados para determinar la degradación *in vitro*. Así, la materia seca desaparecida se calculó con la siguiente ecuación: $(1 - ((MS_{\text{residuo}} - MS_{\text{blanco}}) / MS_{\text{original}})) \times 100$, donde MS_{residuo} es la materia seca recuperada después de 12, 24, 36, 48 y 72 h de fermentación, MS_{blanco} es la materia seca recuperada correspondiente al blanco después de cada tiempo de incubación y la MS_{original} es la materia seca depositada en el tubo al inicio del protocolo.

Las incubaciones a 48 h, antes de ser filtradas, fueron centrifugadas a 3000 g durante 20 minutos, para determinar la concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) en el sobrenadante. Los AGV fueron analizados por cromatografía de gases en columna capilar siguiendo el método de Madrid *et al.* (1999 b) y usando como estándar interno ácido 4-metil-n-valérico.

Análisis estadístico

La degradación de la MS y la producción de AGV fueron analizadas estadísticamente realizando análisis de varianza multifactoriales (Steel y Torrie 1980). El modelo utilizado para la MS fue:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + C_k + AB_{ij} + AC_{ik} + BC_{jk} + ABC_{ijk} + \epsilon$$

donde A, B y C son los efectos del tipo de inóculo, tiempo de incubación y tipo de alimento, respectivamente. Para la producción de AGV a 48 h se utilizó un modelo bifactorial donde A es el tipo de inóculo y B el tipo de alimento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Degradación de la materia seca

La degradabilidad *in vitro* de la MS según el tipo de inóculo, tiempo de incubación y tipo de alimento se expone en el Cuadro 2. El tipo de inóculo afectó significativamente ($P < 0.001$) a la degradación de la MS. Los valores obtenidos utilizando el líquido ruminal procedente de las cabras alimentadas con paja de cebada fueron inferiores a los obtenidos con el inóculo procedente de las alimentadas con heno de alfalfa. Este efecto se debe a que las dietas de los animales pueden afectar al crecimiento y/o actividad de los microorganismos ruminales (Mould 1988), lo que puede influir en la cantidad y tipo de fermentaciones que se producen en el medio de incubación. Bochi-Brum *et al.* (1999) observaron como la relación forraje:concentrado de la dieta de los animales donantes de líquido ruminal, puede afectar negativamente la digestibilidad *in vitro* de forrajes, relacionando estos efectos con posibles cambios en la flora celulolítica como consecuencia de la administración de altas proporciones de concentrado en la ración. Numerosos autores han señalado que la inclusión de suplementos ricos en almidón reducen el pH del líquido ruminal, pudiendo disminuir la actividad de la flora celulolítica (Archimède *et al.* 1996).

En nuestro trabajo, las dietas de los animales donantes eran dos tipos de forrajes, por lo que los inóculos no tenían valores críticos de pH para el desarrollo de los microorganismos celulolíticos. Hoover (1986) indica que un pH ruminal por debajo de 6.0 inhibe la eficiencia del desarrollo microbiano y la fermentación de la fibra, nivel que no se alcanza con raciones a base de forrajes. Sin embargo, las características de calidad nutritiva de los forrajes de las raciones de los animales donantes fueron muy diferentes, ya que una dieta a base de paja es muy pobre energética y nitrogenadamente, mientras que la dieta de alfalfa proporciona nutrientes

que pueden potenciar la actividad microbiana. Menke y Steingass (1988) observaron bajos niveles de actividad microbiológica en el fluido ruminal de animales donantes alimentados con paja, estimando una actividad microbiológica de 4 a 5 veces inferior a la encontrada en el líquido ruminal de los animales que recibieron una dieta de heno y concentrados.

En cuanto al efecto del tiempo de incubación, se observa que independientemente del tipo de inóculo o del tipo de alimento, la degradación se incrementa ($P < 0.001$) al aumentar el tiempo de fermentación. Este resultado era esperable y está en consonancia con los efectos indicados tanto en pruebas de degradabilidad *in situ* con bolsas de nylon (Flachowsky y Tiroke 1993) como *in vitro* (Madrid *et al.* 2002). Cabe destacar que en nuestro estudio se observan interacciones significativas entre el tipo de inóculo y el tiempo de incubación ($P < 0.001$), así el incremento medio de la degradación entre las 12 y 24 h de incubación es marcadamente superior en las muestras fermentadas en el líquido ruminal de los animales alimentados con heno de alfalfa (24.35 puntos), que en las incubadas con el inóculo procedente de las alimentadas con paja (2.51 puntos). Este efecto parece indicar que la población microbiana presente en el inóculo de alfalfa tiene una capacidad adaptativa mayor que la presente en el líquido ruminal de paja, a pesar de que a tiempo inicial de 12 h los valores de degradación en las pajas tanto tratadas como no tratadas fueron superiores con el inóculo procedente de la dieta de paja que de alfalfa, efecto que pudo ser debido al nivel de adaptación de los microorganismos a la dieta de origen.

Por otra parte, el tipo de alimento afecta significativamente ($P < 0.001$) a la degradación de la muestra. Así, las pajas tratadas o el subproducto cítrico consiguen niveles máximos de degradación superiores a las pajas no tratadas, independientemente del tipo de inóculo. El subproducto de limón se degrada muy eficientemente ya que se caracteriza (Cuadro 1)

Cuadro 1. Composición química de los diferentes tipos de pajas y del subproducto cítrico

	Paja no tratada	Paja tratada urea	Paja tratada urea+NaOH	Subproducto cítrico
MS (%)	89.5	87.0	86.9	92.1
Composición en % MS				
Materia orgánica	92.3	91.7	90.5	89.4
Proteína bruta	2.1	8.8	8.4	8.1
Fibra neutro-detergente	82.7	79.7	78.9	36.6
Fibra ácido-detergente	52.0	51.5	50.0	25.7
Lignina	9.0	7.5	6.9	2.6

por tener un alto nivel de contenidos celulares (63.4%) y estar poco lignificado (2.6%). Durand *et al.* (1988) utilizando técnicas de simulación digestiva ruminal *in vitro*, observaron como las pulpas de cítricos y remolacha son más extensamente degradadas que otros subproductos, tales como el salvado o la paja de cereales. Este tipo de subproductos se clasifican como altamente fermentables y se consideran una fuente energética muy interesante para rumiantes. En cuanto a las pajas tratadas con álcalis era de esperar que tuvieran valores de degradación superiores a los obtenidos con las pajas no tratadas, ya que los tratamientos con urea y/o NaOH pueden romper enlaces ligno-celulósicos (Sundstøl 1988), aumentando la accesibilidad de los microorganismos a las paredes celulares (Grenet y Barry 1990) y como consecuencia incrementar su degradabilidad ruminal. Además los tratamientos con urea suponen una fuente de nitrógeno extra para los microorganismos, pudiendo entonces alcanzar un mayor potencial de crecimiento. Satter y Slyter (1974) muestran que el máximo crecimiento microbiano en estudios *in vitro* se obtiene con niveles de nitrógeno amoniacal entre 5-8 mg/100 ml. Sin embargo, estas mejoras en la degradabilidad no fueron observadas entre la paja no tratada suplementada con urea *vs* no suplementada, resultados que indican que la actividad y multiplicación de los microorganismos ruminales sigue estando limitada a pesar de la suplementación con urea. Autores como Tisserand *et al.* (1993) sostienen

que además de aportar una fuente de nitrógeno en la dieta, es necesario un aporte energético suplementario para mejorar la fermentación y digestión de los alimentos muy fibrosos.

Producción de ácidos grasos volátiles

La concentración del total de ácidos grasos volátiles, así como la proporción molar de cada ácido en el medio de incubación a 48 h para cada tipo de inóculo, se presentan en el Cuadro 3. El efecto del tipo de inóculo afecta significativamente ($P < 0.001$), a la concentración total de AGV y al porcentaje de cada ácido individualmente. El inóculo obtenido de los animales alimentados con paja presentó unos niveles de AGV muy inferiores a los obtenidos con el inóculo de alfalfa para cada uno de los alimentos ensayados (22.27, 20.67, 22.77, 26.79 y 27.49 mM *vs* 92.21, 49.18, 51.81, 55.2 y 59.23 mM, para el subproducto del limón, paja, paja suplementada urea, paja tratada urea y paja tratada urea+NaOH, respectivamente). Estos resultados están relacionados con los valores de degradación *in vitro* comentados anteriormente, ya que con el líquido ruminal procedente de los animales alimentados con paja se obtuvieron niveles de degradación de la materia seca inferiores a los obtenidos con el líquido de alfalfa, sugiriendo que la actividad fermentativa de los microorganismos procedentes del inóculo de paja es menor que la de alfalfa, y por tanto la producción de AGV también es menor. Así, autores como Pitt *et al.* (1996) y Khandaker *et al.*

Cuadro 2. Degradabilidad de la materia seca del subproducto de limón y de las pajas tratadas y no tratadas, dependiendo de tipo de inóculo y tiempo de incubación

	<i>Inóculo de donante con dieta de paja de cebada</i>							<i>Inóculo de donante con dieta de heno de alfalfa</i>						
	12h	24h	36h	48h	72h	ES	Sig. ¹	12h	24h	36h	48h	72h	ES	Sig
Limón	29.5 ^a	31.1 ^a	49.9 ^b	62.9 ^c	70.7 ^d	0.6	***	45.2 ^a	69.5 ^b	79.1 ^b	75.4 ^b	77.9 ^b	1.7	**
Paja	13.9 ^a	15.8 ^b	20.2 ^c	25.1 ^d	31.4 ^e	0.1	***	11.8 ^a	35.0 ^b	39.8 ^c	40.7 ^c	50.9 ^d	0.5	***
Paja+urea	18.7 ^a	23.7 ^a	32.7 ^b	33.5 ^{bc}	38.6 ^c	0.6	***	11.9 ^a	39.1 ^b	40.5 ^b	41.3 ^b	47.4 ^c	0.5	***
Paja tratada urea	21.6 ^a	24.4 ^b	38.6 ^c	39.1 ^c	45.1 ^d	0.1	***	15.6 ^a	34.5 ^b	46.8 ^c	45.9 ^c	54.1 ^c	1.0	***
Paja tratada urea+NaOH	16.6 ^a	26.8 ^b	38.4 ^c	41.9 ^c	52.3 ^d	0.7	***	10.6 ^a	38.3 ^b	49.2 ^c	54.0 ^c	55.8 ^c	1.2	***
Análisis multifactorial	Efectos principales							Interacciones						
	A (Tipo inóculo)			***				AxB			***			
	B (Tiempo incubación)			***				AxC			***			
	C (Tipo alimento)			***				BxC			*			
								AxBxC			**			

¹ Nivel de significación: ***=P<0.001; **=P<0.01; *=P<0.05

Cuadro 3. Producción total de ácidos grasos volátiles (AGV) y porcentaje ácido acético, propiónico y butírico, dependiendo del tipo de inóculo y tipo de alimento

	<i>Inóculo de donante con dieta de paja de cebada</i>					<i>Inóculo de donante con dieta de heno de alfalfa</i>			
	Total AGV mM	% Molar				Total AGV mM	% Molar		
		Acético	Propiónico	Butírico		Acético	Propiónico	Butírico	
Limón	22.27 ^{ab}	78.78 ^{bc}	16.18 ^a	4.64 ^{ab}	92.21 ^b	67.27	21.21	9.66 ^b	
Paja	20.67 ^a	79.79 ^c	16.17 ^a	4.03 ^a	49.18 ^a	70.49	21.90	6.37 ^a	
Paja+urea	22.77 ^b	78.52 ^{bc}	16.66 ^{ab}	4.81 ^{abc}	51.81 ^a	68.86	22.07	7.20 ^a	
Paja tratada urea	26.79 ^c	76.02 ^a	18.24 ^{bc}	5.55 ^c	55.20 ^a	69.51	22.25	6.86 ^a	
Paja tratada urea+NaOH	27.49 ^c	77.08 ^{ab}	17.72 ^c	5.18 ^{bc}	59.23 ^a	66.61	25.24	6.71 ^a	
ES	0.25	0.25	0.14	0.10	2.27	0.45	0.38	0.19	
Sig. ¹	***	*	*	*	**	NS	NS	*	
Análisis bifactorial	A (Inóculo)				B (Tipo de alimento)			AxB	
	Total de AGV		***		***		***		
	% Acético		***		*		NS		
	% Propiónico		***		*		NS		
	% Butírico		***		**		**		

¹ Nivel de significación: ***=P<0.001; **=P<0.01; *=P<0.05; NS=P>0.05

(1998) confirman la importancia del grado de fermentación ruminal sobre la producción de AGV.

En cuanto a la proporción molar de los ácidos grasos volátiles, cabe destacar que el porcentaje de ácido acético, propiónico y butírico fue afectado significativamente ($P < 0.001$) por el tipo de inóculo. La proporción de ácido acético fue mayor en las incubaciones con líquido procedente del animal donante alimentado con paja, debido posiblemente a que el tipo de población microbiana dominante en este inóculo fuera marcadamente fibrolítica predominando la fermentaciones acéticas. Aunque, también, con el inóculo de alfalfa se obtuvieron niveles de porcentajes acéticos usualmente asociados a fermentaciones de forrajes (Madrid *et al.* 2002) como era de esperar.

El tipo de alimento afectó ($P < 0.001$) tanto a la producción total de AGV como a la proporción molar de los mismos. La producción mayor de AGV a las 48 h se produce en el subproducto de limón incubado con el inóculo de alfalfa (92.21 mM), coincidiendo con el nivel máximo de degradación obtenido a las 48 h (75,49%). En cuanto a la producción menor de AGV a las 48 h se obtiene en la paja no tratada incubada con el inóculo procedente de los animales alimentados con paja (20.67mM), que también tiene el nivel menor de degradación a las 48 h (33.58%). Durand *et al.* (1988), usando una técnica de simulación *in vitro* ruminal, comparan varios tipos de subproductos clasificándolos en cuatro grupos dependiendo del grado de digestibilidad de su materia orgánica y la producción total de AGV: pulpas (80%, 93 mM), subproductos de granos de cereales (68%, 69 mM), pajas tratadas con NaOH y henos (55%, 60 mM), y pajas no tratadas o tratadas con NH_3 (34%, 40 mM).

CONCLUSIONES

Estos datos confirman que las técnicas de determinación *in vitro* de la degradación de la

materia seca y de la producción de ácidos grasos volátiles es un método adecuado para estimar y comparar la digestión microbiana ruminal de varios subproductos. Sin embargo, los resultados de estos métodos dependen de la calidad y conformación de la dieta de los animales donantes de líquido ruminal, incluso si sus raciones son sólo a base de forrajes.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Histología y Anatomía Patológica Veterinaria de la Universidad de Murcia su colaboración en la recolección del líquido ruminal.

BIBLIOGRAFÍA

- Archimède H., Sauvant D., Hervieu J., Ternois F., Poncet C. 1996. Effects of the nature of roughage and concentrate and their proportion on ruminal characteristics of non lactating goats, consequences on digestive interactions. *Anim. Feed Sci. Technol.* 58: 267-282.
- Bochi-Brum O., Carro M.D., Valdés C., González J.S., López S. 1999. Digestibilidad *in vitro* de forrajes y concentrados: efecto de la ración de los animales donantes de líquido ruminal. *Arch. Zootec.* 48: 51-61.
- Durand M., Dumay C., Beaumatin P., Morel M.T. 1988. Use of the rumen simulation technique (RUSITEC) to compare microbial digestion of various by-products. *Anim. Feed Sci. Technol.* 22: 197-204.
- Flachowsky G., Tiroke K. 1993. Influence of type of feeding and rumen incubation time on in sacco dry matter degradability of ryegrass, straw and concentrate in sheep and goats. *Small Rum. Res.* 9: 321-330.
- Grenet E., Barry P. 1990. Microbial degradation in the rumen of wheat straw and anhydrous ammonia treated wheat straw observed by electron microscopy. *Reprod. Nutr. Dev.* 30:533-540.

- Hoover W.H. 1986. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. *J. Dairy Sci.* 69: 2755-2766.
- Khandaker Z.H., Steingass H., Drochner W. 1998. Supplementation of wheat straw with sesbania on voluntary intake, digestibility and ruminal fermentation in sheep. *Small Rum. Res.* 28: 23-29.
- Madrid J., Hernández F., Megías M.D. 1999 a. Comparison of *in vitro* techniques for predicting digestibility of mixed cereal straw and citrus by-product diets in goats. *J. Sci. Food Agric.* 79: 567-572.
- Madrid J., Megías M.D., Hernández F. 1999 b. Determination of short chain volatile fatty acids in silages from artichoke and orange by-products by capillary gas chromatography. *J. Sci. Food Agric.* 79: 580-584.
- Madrid J., Megías M.D., Hernández F. 2002. *In vitro* determination of ruminal dry matter and cell wall degradation, and production of fermentation end-products of various by-products. *Anim. Res.* 51:189-199.
- Marten G.C., Barnes R.F. 1980. Prediction of energy digestibility of forages with *in vitro* rumen fermentation and fungal enzyme systems, En: *Standardization of Analytical Methodology for Feeds*, pp. 61-71. Eds. Pigden W.J., Balch C.G., Graham M. Proceedings of workshop held in Ottawa, Ottawa, Canada.
- Menke K.H., Steingass H. 1988. Estimation of energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Dev.* 28: 7-55.
- Mould F.L. 1988. Associative effects of feeds. En: *Feed Science*, pp. 279-292. Ed. Ørskov E.R. Elsevier. Amsterdam.
- Nagadi S., Herrero M., Jessop N.S. 2000. The influence of diet of the donor animal on the initial bacterial concentration of ruminal fluid and *in vitro* gas production degradability parameters. *Anim. Feed Sci. Technol.* 87: 231-239.
- Ørskov E.R., Hovell F.D.DeB., Mould F. 1980. The use of the nylon bag technique for the evaluation of feedstuffs. *Trop. Anim. Prod.* 5: 195-213.
- Pitt R.E., Van Kessel J.S., Fox D.G., Pell A.N., Barry M.C., Van Soest P.J. 1996. Prediction of ruminal volatile fatty acids and pH within the net carbohydrate and protein system. *J. Anim. Sci.* 74: 226-244.
- Satter L.D., Slyter L.L. 1974. Effect of ammonia concentrations on rumen microbial protein production *in vitro*. *Br. J. Nutr.* 32: 199-208.
- Steel R.G.D., Torrie J.H. 1980. *Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach*. 2nd ed., McGraw-Hill Book Co., New York.
- Sundstøl F. 1988. Improvement of poor quality forages and roughages. En: *Feed Science*, pp: 257-277. Ed. Ørskov E.R. Elsevier. Amsterdam.
- Tilley J.M.A., Terry R.A. 1963. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *J. Br. Grassl. Soc.* 18: 104-111.
- Tisserand J.L., Arista E., Faurie F. 1993. Straw feeding value in sheep and goat: effect of energy and nitrogen supply. *Ann. Zootech.* 42:169.
- Weis, W.P. 1994. Estimation of digestibility of forages by laboratory methods. En: *Forage Quality. Evaluation and Utilization*, pp. 644-681. Ed. Fahey G.C. American Society of Agronomy, Inc. Madison, Wisconsin, USA.
- Wilman D., Foulkes G.R., Givens D.I. 1996. A comparison of four methods of estimating the rate and extent of cell wall degradation in grass silages. *Anim. Feed Sci. Technol.* 63: 99-109.