



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



## Validación funcional de un complejo multienzimático como modulador de la fermentación ruminal



Bach. Lucía Mele  
DMV MSc. María Noel Méndez  
Ing Agr MSc. María Bruni  
Ing Agr PhD. Ana Inés Trujillo  
Ing Agr PhD. Pablo Chilibroste



Montevideo, 6 de junio de 2021

# OBJETIVOS

- Evaluar *in vivo* el impacto de la utilización del producto en vacas lecheras sobre el consumo de nutrientes, producción y composición de la leche y parámetros que caractericen la utilización ruminal de la dieta
- Analizar en ensayos *in vitro* el impacto del uso de Biopremix sobre la cinética de fermentación y el potencial metanogénico resultado de la fermentación de diferentes sustratos

# CONDICIONES EXPERIMENTALES

## Manejo Animal



### Animales

- ✓ 10 vacas Holando
- ✓ NL: 2,7
- ✓ DEL:  $76 \pm 61$  d
- ✓ PV:  $458 \pm 75$  kg
- ✓ EC:  $2,5 \pm 0,3$
- ✓ 4 vacas fistuladas

### Distribuidas en bloques al azar en 2 tratamientos:

CONTROL  
SIN BIOPREMIX  
(SBP)

CON BIOPREMIX  
(CBP)

120 g/a/d

### Períodos

- **acostumbramiento:** 13 de Agosto al 03 de Septiembre 18 días.
- **Experimental:** 04 al 14 de Septiembre 10 días



# Características de la dieta

Dieta (76:24)

Ingredientes	BS (%)
<b>Forraje</b>	
Ensilaje Sorgo planta entera	75,6
<b>Concentrado</b>	
Harina Soja	16,8
Maíz Grano	5,60
Urea	0,70
Na <sup>+</sup> Cl <sup>-</sup>	0,56
CaCO <sup>3</sup>	0,34
Ca <sup>2+</sup> P <sup>-</sup>	0,22
Nutri Bov	0,14
S	0,08



	BS (%)	DE
MS	30,3 ± 0,7	
MO	92,2 ± 0,2	
FDN	49,0 ± 0,6	
FDA	25,2 ± 3,4	
PC	12,6 ± 0,2	
EE	1,34 ± 0,1	
CNF	29,2 ± 0,2	

**BIOPREMIX®**  
120g/v/d



	% Base seca
MS	93.9
MO	46.3
PC	10.6
EE	4.2
FDN	11
CHO no fibrosos	20.5
Calcio	9.5
Azufre	0.86
Magnesio	10
Fosforo	1.2

# MATERIALES Y MÉTODOS

## ☐ Registro de consumo y muestreos

**Consumo de dieta mezcla:**

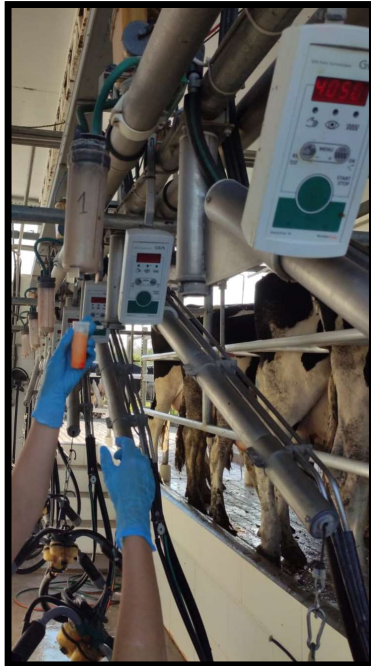
ofrecido - rechazado - desperdicios

**Muestreo de dieta ofrecida y rechazada por animal**



# MATERIALES Y MÉTODOS

## □ Producción y composición de leche



- Registro diario de producción individual en cada ordeño
- Muestreo para análisis químico



# METODOLOGÍA

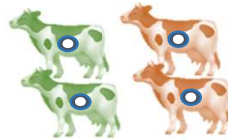
## ❑ Degradabilidad *in situ*



- **Incubación** de muestras de la dieta tal cual ofrecida
  - ✓ retiro a tiempos fijos y análisis de MS, MO y FDN en los residuos
  - ✓ estimación de la cinética de degradación (Orskov *et al.*, 1980)
  - ✓ digestibilidad de FDN



## ❑ Ambiente ruminal



- **Muestreo de líquido ruminal** a las 0, 4, 8, 12, 30, 48, 72 y 96 h del suministro de la dieta
- **Medición de**
  - ✓ pH
  - ✓ N amoniacal (Chaney y Marbach 1962)
  - ✓ Acidos grasos volátiles (Attaelmannan *et al.*, 1999)



# METODOLOGÍA

## *In Vitro*

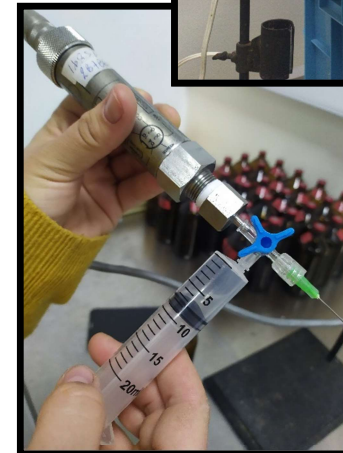
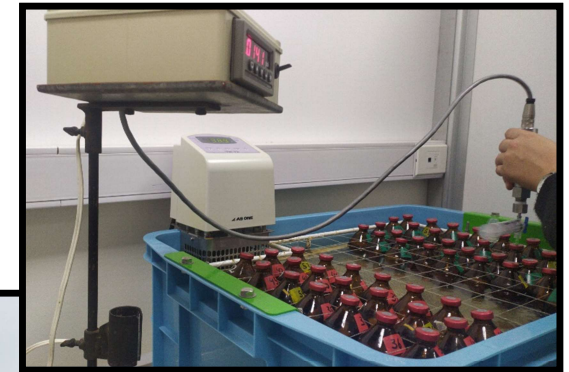
### ➤ Sistema de incubación:

- ✓ **Medio de cultivo** (Goering & Van Soest, 1970)
- ✓ **Inóculo**: provenientes
- ✓ **Sustratos CBP (0.65% MS) y SBP:**



- dieta
- ensilaje de raigrás
- ensilaje de alfalfa
- ensilaje de sorgo planta entera
- campo natural de baja disponibilidad (campo natural 1)
- campo natural de alta disponibilidad (campo natural 5)
- paja cebada
- paja de arroz
- entrefino de celulosa

- Registro y colecta de **producción de gas** en forma continua y hasta las 96 en 2 corridas.
- Cinética de producción de gas
  - Modelo exponencial simple
- Composición del gas producido (CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>)



(Theodorou *et al.*, 1994)

# METODOLOGÍA

## ☐ Análisis estadístico

✓ Modelos mixtos

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + b_{j(i)} + H_k + (TH)_{ik} + \mathcal{E}_{ijk}$$

$Y_{ijk}$  = pH ruminal, NH<sub>3</sub>, AGV totales, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>

$T_i$  = efecto trat  $i$

$b_{j(i)}$  = efecto de  $j^{\text{th}}$  vaca en trat  $i$

$H_k$  = efecto hora  $k^{\text{th}}$

$(TH)_{ik}$  = Interacción entre trat  $i$  y hora  $k$

$\mathcal{E}_{ijk}$  = error

Efecto aleatorio: vaca

✓  $P < 0.05$

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + S_j + (TS)_{ij} + \mathcal{E}_{ijk}$$

$Y_{ijk}$  = Variables que describen cinética de degradación y de producción de gas

$T_i$  = efecto tratamiento  $i$

$S_j$  = efecto sustrato  $j$  (si corresponde)

$(TS)_{ij}$  = Interacción entre trat  $i$  y sustrato  $j$

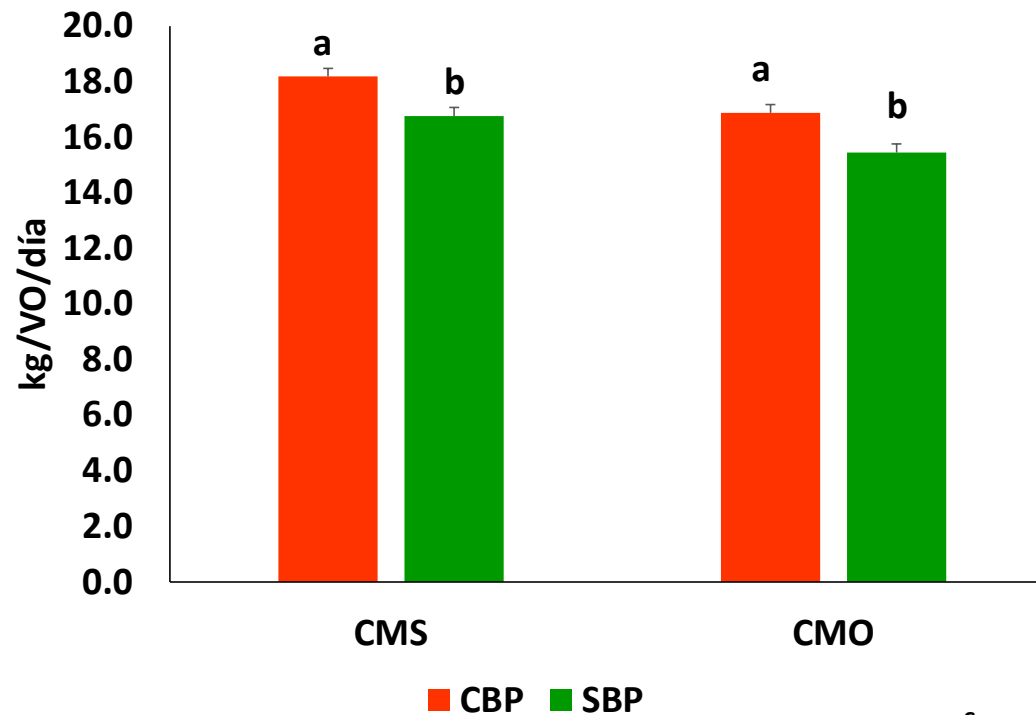
$\mathcal{E}_{ijk}$  = error

Efecto aleatorio: corrida

# RESULTADOS

## Consumo de Dieta Mezcla

	CBP	SBP	EEM	P
CMS	18.2	16.8	0.30	0.04
CMO	16.9	15.5	0.32	0.05

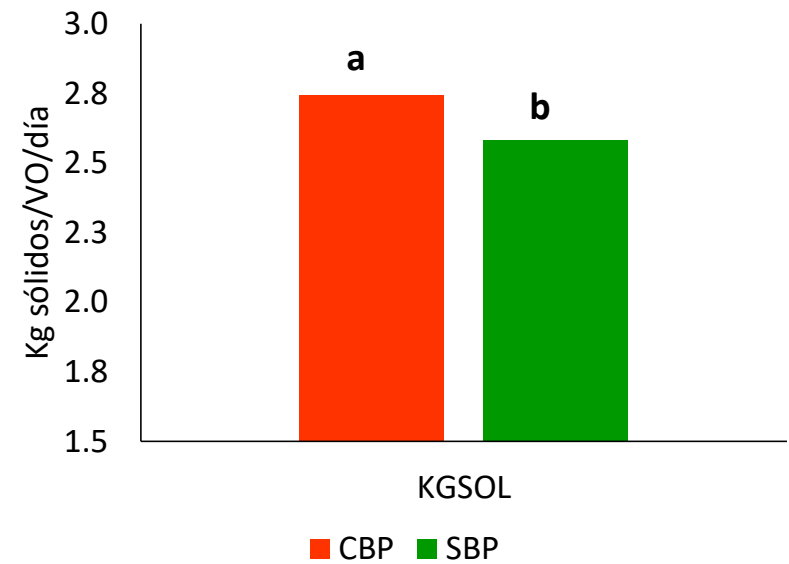
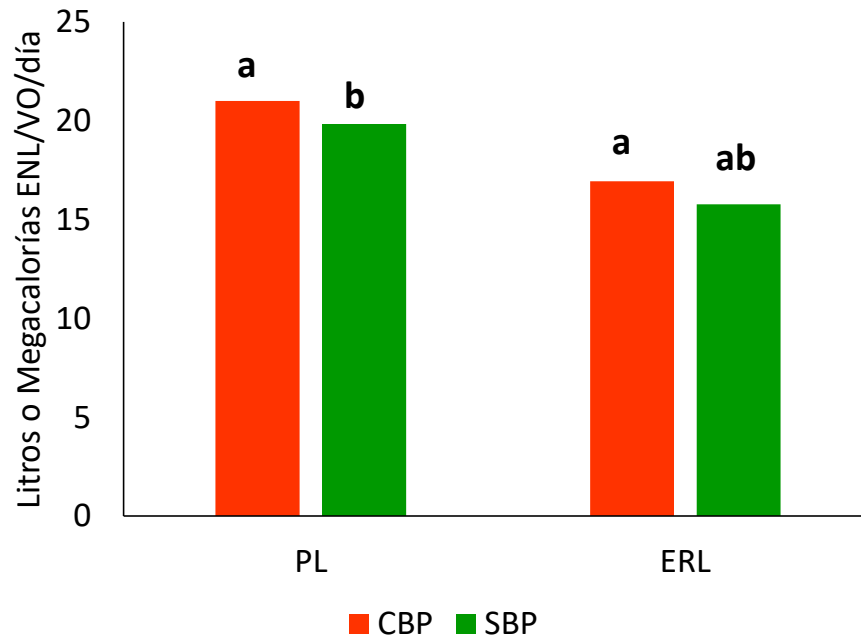


Se consideró efecto significativo cuando  $P \leq 0.05$

# RESULTADOS

## Producción de leche, energía y sólidos

	CBP	SBP	EEM	P
PL	22.0	18.5	1.94	0.006
KGSOL	2.9	2.4	0.21	0.050
ERL	17.8	14.8	1.27	0.06



Se consideró efecto significativo cuando  $P \leq 0.05$

# Resumen resultados productivos

## ☐ Consumo, desempeño productivo y eficiencia

	<b>CBP</b>	<b>SBP</b>	<b>EEM</b>	<b>P</b>
<b>CMS</b>	18.2	16.8	0.98	0.04
<b>CMO</b>	16.9	15.5	0.93	0.05
<b>CMS%PV</b>	4.00	3.61	0.26	0.07
<b>CMO%PV</b>	3.71	3.33	0.25	0.07

	<b>CBP</b>	<b>SBP</b>	<b>EEM</b>	<b>P</b>
<b>PL</b>	22.0	18.5	1.94	0.006
<b>KGSOL</b>	2.9	2.4	0.21	0.050
<b>ERL</b>	17.8	14.8	1.27	0.06

## RESULTADOS de los experimentos *in situ* e *in vitro*

- ✓ Comprender los resultados productivos
- ✓ Analizar el efecto del BIOPREMIX® en otros alimentos y subproductos agrícolas

# 1. Experimento *in situ*

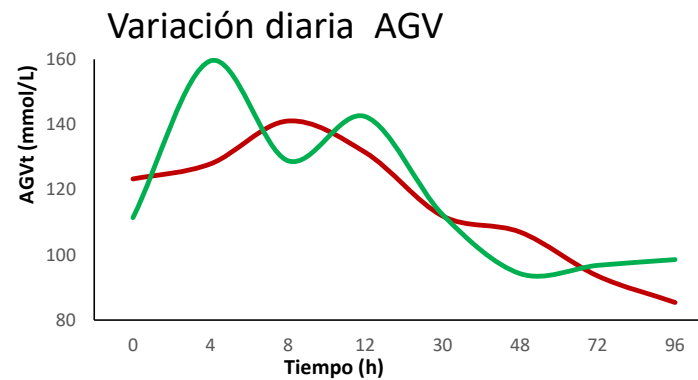
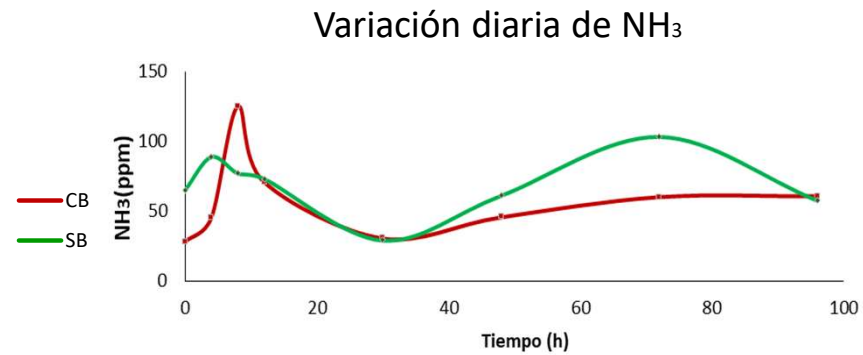
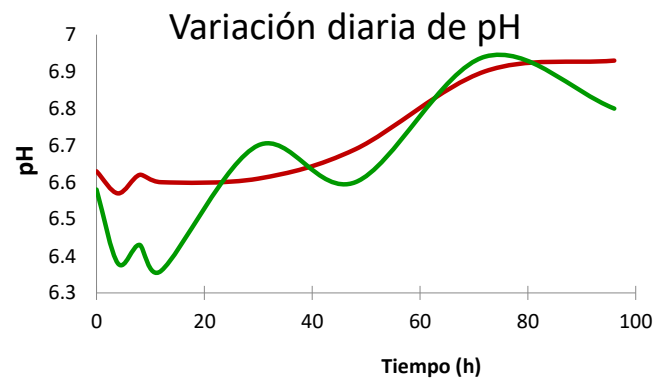
## ➤ Variables del ambiente ruminal



	Tratamiento		EEM	P valor		
	CBP	SBP		T	h	Txh
pH	6.64	6.61	0.02	0.15	<.0001	0.16
N-NH3 (ppm)	58.7	69.3	7.72	0.33	0.02	0.92
AGV t (mmol/L)	115.2	118.0	3.00	0.53	<.0001	0.19
C2	79.3	81.1	1.97	0.53	0.004	0.15
C3	24.7	24.1	0.92	0.64	<.0001	0.44
C4	11.16	12.79	0.38	0.01	<.0001	0.04
C2+C4	90.43	93.87	2.23	0.29	<.0001	0.13
Cetog/Glucog	3.84	4.11	0.93	0.05	<.0001	0.78

# 1. Experimento *in situ*

## ➤ Variables del ambiente ruminal

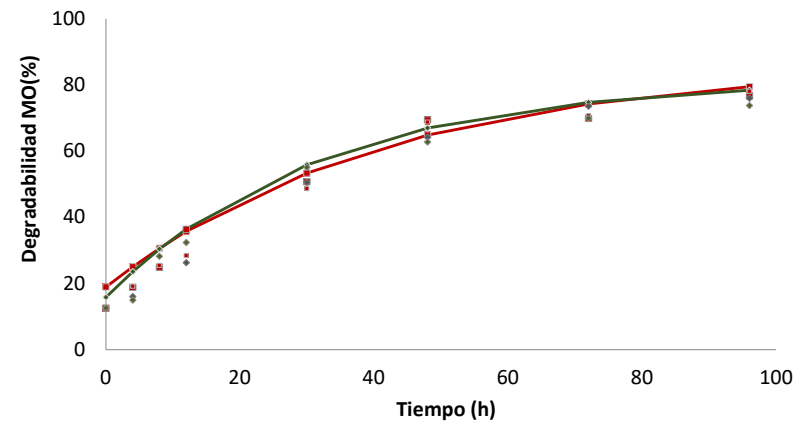


# 1. Experimento *in situ*

## ➤ Cinética de degradación de la MS y MO la dieta

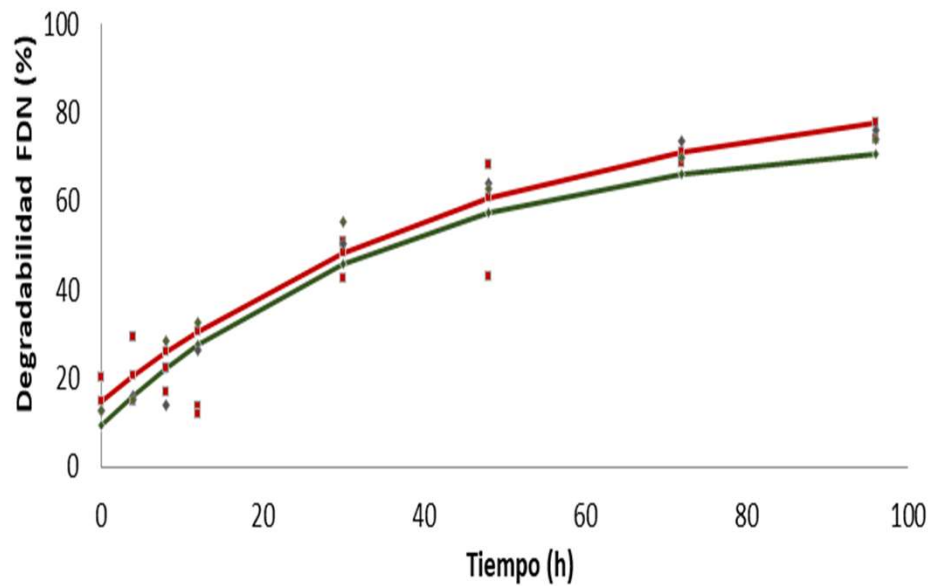
	Tratamiento		EEM	P valor
	CBP	SBP		
<b>MS<sup>1</sup></b>				
a (g/kg)	0.24	0.22	0.01	0.28
b (g/kg)	0.63	0.61	0.04	0.68
c (h <sup>-1</sup> )	0.02	0.03	0.00	0.36
a+b (g/kg)	0.88	0.83		
<b>MO<sup>1</sup></b>				
a (g/kg)	0.19	0.16	0.01	0.24
b (g/kg)	0.67	0.66	0.04	0.82
c (h <sup>-1</sup> )	0.02	0.03	0.00	0.39
a+b (g/kg)	0.86	0.82	0.05	

<sup>1</sup> Modelo:  $a + b*(1-EXP(-c*t))$



# 1. Experimento *in situ*

## ➤ Cinética de degradación de la FDN de la dieta



	Tratamiento		EEM	P valor
	CBP	SBP		
FDN <sup>2</sup>				
b	0.72	0.63	0.05	0.33
c	0.02	0.03	0.00	0.33
L	0.87	2.21	0.22	0.05

<sup>2</sup> Modelo:  $b*(1-EXP(-c*(t-L)))$ ; (b corregido por fracción soluble 0.16 CBP y 0.13 SBP)



	CBP	SBP
Dig FDN 30 h is	0.48	0.46
Dig FDN 48 h is	0.60	0.57

# Estimaciones del aporte de energía de la dieta

## ➤ Estimaciones de energía a partir de experimentos *in situ*

	CBP	SBP
Estimaciones ( <i>in situ</i> )		
Digestibilidad de MO (%) (30 h <i>in situ</i> ) <sup>2</sup>	66.50	64.90
Digestibilidad de MO (%) (48 h <i>in situ</i> ) <sup>3</sup>	72.50	70.50

<sup>2</sup> Ecuación sumativa (30 h *in situ* -Van Soest, 1984)

<sup>3</sup> Ecuación sumativa (48 h *in situ* - Van Soest, 1984)

## ➤ Estimaciones de energía a partir del desempeño animal

	CBP	SBP
CMS (kgMS)	18.4	16.6
ERL (Mcal)	17.76	14.77
Estimaciones		
ENI (Mcal/KgMS)	1.42	1.39
EM (Mcal/KgMS)	2.37	2.32
ED (Mcal/KgMS)	2.89	2.83
Digestibilidad de E (%)	65.50	64.20

# Estimaciones del aporte de proteína de la dieta

## ➤ Estimaciones de energía a partir de composición química

	CBP	SBP
ERL (Mcal)	17.76	14.77
PRN (Kg)	0.77	0.65
CMS (kgMS)	18.39	16.61
Estimaciones		
PM disponible (kg) <sup>1</sup>	1.74	1.56
PC consumida (kg) <sup>2</sup>	2.30	2.13

<sup>1</sup> Estimado a partir de tablas (partición de la proteína a nivel ruminal) nacionales y proteína microbiana (NRC, 2001)

<sup>2</sup> Consumo y composición de la dieta

## ➤ Estimaciones de proteína a partir del desempeño animal

	CBP	SBP
ERL (Mcal)	17.76	14.77
PRN (Kg)	0.77	0.65
CMS (kgMS)	18.4	16.6
Estimaciones		
PM disponible (kg) <sup>1</sup>	1.69	1.43
PC consumida (kg) <sup>2</sup>	2.30	2.13

<sup>1</sup> Eficiencia de síntesis de proteína retenida en leche y requerimientos (NRC 2001)

<sup>2</sup> Consumo y composición de la dieta

## 2. Experimento *in vitro*

### ➤ Efecto del BIOPREMIX® en la utilización ruminal de diferentes alimentos y subproductos agrícolas

#### Composición química y digestibilidad (% base seca)

Alimentos	MO	PC	FDNmo	FDAmo	EE	CNF	Div MS 96 h
Dieta	92.36	12.52	49.45	27.63	1.33	29.06	80.3 a
Ensilaje Sorgo	92.10	5.90	51.50	30.70	2.90	31.80	57.1 a
Ensilaje Raigras	85.10	10.90	49.60	29.90	3.60	21.00	74.7 a
Ensilaje Alfalfa	91.87	14.09	51.24	37.99	2.36	24.18	59.7 a
Campo Natural 1	91.48	12.07	73.27	36.38	0.48	5.66	40.9 bc
Campo Natural 5	91.83	6.66	76.20	38.00	0.37	8.60	25.8 c
Paja cebada	89.24	2.55	82.27	53.42	1.22	3.20	48.7 ab
Paja arroz	82.72	2.81	72.10	43.09	0.59	7.22	44.2 ab
Entrefino de celulosa	92.17	1.48	88.95	71.14	0.14	1.61	1 - 2 d

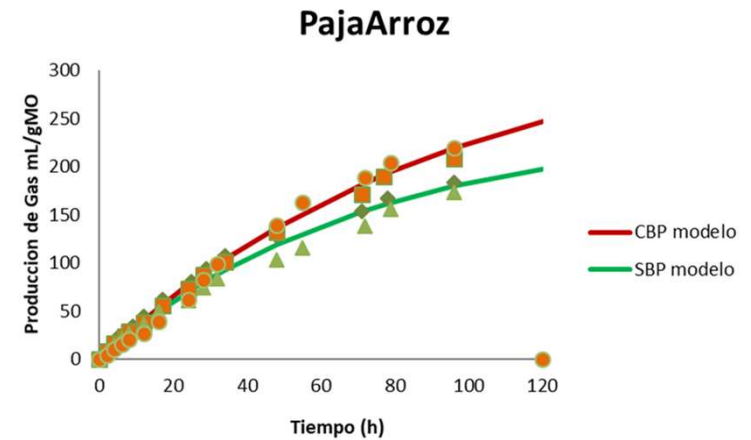
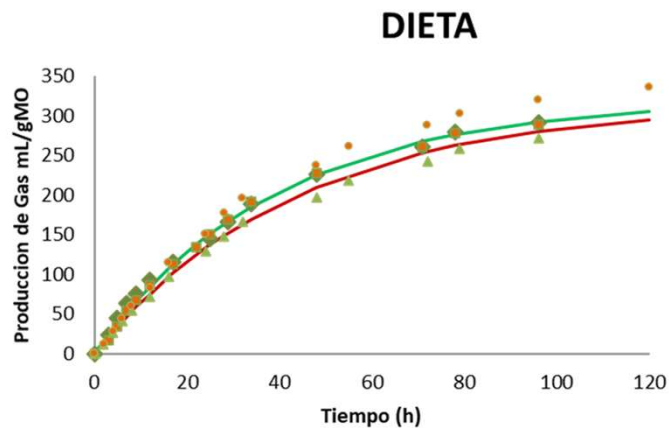
1 y 5: campo natural Fraile Muerto de baja y alta disponibilidad

## 2. Experimento *in vitro*

### ➤ Parámetros de cinética de producción de gas

	Tratamiento		EEM	P valor		
	CBP	SBP		Trat	Sust	Sust x Trat
b (mL/MO)	242.69	229.48	6.34	0.16	<.0001	0.12
c (h <sup>-1</sup> )	0.021	0.023	0.002	0.32	<.0001	0.76

Modelo:  $b*(1-EXP(-c*t))$



## 2. Experimento *in vitro*

### ➤ Composición de gases

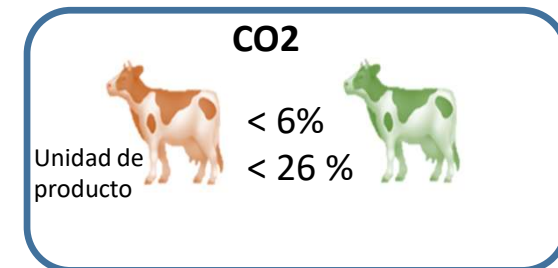
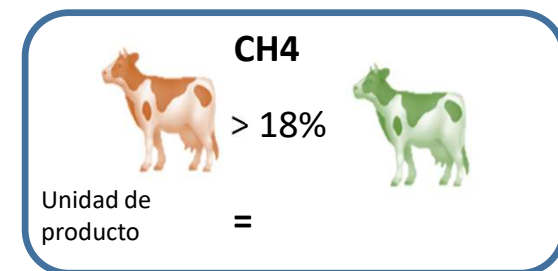
SUSTRATO	CH <sub>4</sub> (mg/gMO*)	EEM
Dieta	3.42 a	0.24
Ensilaje Sorgo	2.66 b	0.23
Ensilaje Raigras	3.64 a	0.23
Ensilaje Alfalfa	2.81 b	0.24
Campo Natural <sup>1</sup>	1.53 e	0.24
Campo Natural <sup>5</sup>	1.10 e	0.24
Paja de Cebada	2.00 c	0.23
Paja de Arroz	2.06 c	0.23
Entrefino de celulosa	0.53 f	0.24

	CO <sub>2</sub> (mg/gMO*)	EEM
Dieta	57.2 b	7.06
Ensilaje Sorgo	67.1 b	7.06
Ensilaje Raigras	73.2 a	7.27
Ensilaje Alfalfa	57.5 b	7.27
Campo Natural <sup>1</sup>	38.1 c	7.06
Campo Natural <sup>5</sup>	24.6 c	7.06
Paja de Cebada	38.3 c	7.27
Paja de Arroz	46.6 c	7.06
Entrefino de celulosa	15.9 f	7.27

## Estimación de producción de CH4 y CO2 de la dieta

### ➤ Estimación de producción de CH4 y CO2 de la dieta

	Tratamiento		EEM	P valor
	CBP	SBP		
CMS	18.2	16.8	0.98	0.04
PL	22.0	18.5	1.94	0.06
KG SOLIDOS	2.9	2.4	0.21	0.05
CH4 (mg/gMO)	3.6	3.3	0.33	NS
CO2 (mg/gMO)	53.1	61.3	8.53	NS
CH4 (g/vaca/día) CMS	64.9	54.7		
CH4 (g/vaca/día) PL	2.9	3.0		
CH4 (g/vaca/día) KGSOL	22.5	22.7		
CO2 (g/vaca/día) CMS	966	1026		
CO2 (g/vaca/día) PL	44	55		
CO2 (g/vaca/día) KGSOL	335	426		



## CONSIDERACIONES FINALES

- Respuesta consistente del BIOPREMIX ® en las variables productivas
  - Importancia de un ensayo a nivel comercial
  - Diferentes niveles de intensificación?
- Condiciones de utilización ruminal de los nutrientes
  - Estabilidad
  - Utilización de la fibra
- Nuevas interrogantes
  - Señales internas que expliquen las respuestas productivas
- Desempeño del BIOPREMIX ® en la utilización ruminal de otros alimentos y residuos agrícolas.

**MUCHAS GRACIAS**