

**COMPOSICIÓN QUÍMICA Y FERMENTACIÓN RUMINAL DE LA DIETA POR BOVINOS EN PASTOREO EN UN PASTIZAL NATIVO DEL ORIENTE DE DURANGO**  
CHEMICAL COMPOSITION AND RUMINAL FERMENTATION OF DIET BY GRAZING CATTLE IN NATIVE RANGELANDS OF EAST DURANGO

**<sup>1</sup>Murillo-Ortiz Manuel, Reyes-Estrada Osvaldo, Herrera-Torres Esperanza, Villarreal-Rodríguez Guadalupe**

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Juárez del Estado de Durango. México.

### RESUMEN

Se llevó a cabo un estudio para evaluar la composición química y los parámetros de fermentación ruminal de la dieta consumida por ganado bovino, en libre pastoreo en dos épocas del año; se utilizaron cuatro novillos con fístula en el esófago, en un diseño completamente al azar. Los valores de proteína cruda (PC), fibra detergente neutro (FDN) y digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica (DIVMO), fueron más altos en la época de lluvia, en comparación con la época seca ( $P<0.05$ ). Se observó interacción estación x tiempo para la concentración de nitrógeno amoniacal ruminal (N-NH<sub>3</sub>) ( $P<0.05$ ). Las concentraciones de N-NH<sub>3</sub> registradas en los diferentes tiempos fueron más bajas en la época seca y más altas en la época de lluvia ( $P<0.05$ ). No se detectaron interacciones estación x tiempo en el pH y en la concentración de ácidos grasos volátiles (AGVS); sin embargo, las concentraciones de propionato y butirato, así como de ácidos grasos volátiles totales, fueron más altas en la época de lluvia en comparación con la época seca ( $P<0.05$ ); aunque las concentraciones de acetato fueron más altas en la época seca ( $P<0.05$ ). Los resultados indican que el ganado bovino requiere de suplementación proteica y energética durante la época seca.

**Palabras clave:** Bovinos, dieta, pastoreo, composición química, fermentación ruminal.

### ABSTRACT

A study was conducted to evaluate the chemical composition and ruminal fermentation parameters of diets consumed by grazing cattle during two seasons of year. Four steers with esophageal cannulae (350 ± kg BW) were used in randomized complete design. Highest protein crude (CP), neutral detergent fiber (NDF) and *in vitro* organic matter

---

<sup>1</sup>Manuel Murillo Ortiz. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Juárez del Estado de Durango. Carretera Durango-Mezquital Km 11.5. C.P. 34000 korima99@hotmail.com

Recibido: 19/02/2013. Aceptado: 20/06/2013.  
Identificación del artículo: abanicoveterinario3(2):12-21/0000032

digestibility (IVOMD) values were obtained in wet season as compared dry season ( $P<0.05$ ). Interaction season x time was observed for ruminal ammonia nitrogen ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ) ( $P<0.05$ ).  $\text{NH}_3\text{-N}$  concentrations registered at different times were lower in the dry season and higher in wet season ( $P<0.05$ ). No season x time interactions were detected for pH and volatile fatty acids concentrations (VFA) ( $P<0.05$ ). However, propionate and butyrate concentrations as well as total volatile fatty acids were higher in the wet season compared to the dry season ( $P<0.05$ ); although acetate concentrations were higher in the dry season. The results indicate that cattle required protein and energy supplementation during dry season.

**Keywords:** Cattle, diet, grazing, chemical composition, ruminal fermentation.

## INTRODUCCIÓN

La ganadería bovina es una actividad económica importante para el estado de Durango y se desarrolla preferentemente en condiciones extensivas. Bajo estas condiciones de producción, los pastizales nativos son la única fuente de alimento para el ganado; sin embargo, en los últimos años, la sequía recurrente y el sobrepastoreo, han ocasionado el deterioro masivo de los pastizales.

Lo anterior ha traído como consecuencia el bajo rendimiento productivo, y en casos extremos la sobrevivencia del ganado; ante estas condiciones, es prioritario conocer los nutrientes aportados por la dieta, con el propósito de diseñar programas estratégicos de suplementación para el ganado bovino en apacentamiento (Murillo *et al.*, 2005).

Tradicionalmente, los estudios dirigidos a evaluar el estado nutricional del ganado en pastoreo, se enfocaban a relacionar los cambios estacionales de los nutrientes aportados por pastizales; con los requerimientos nutricionales de los animales (Murillo *et al.*, 2004). No obstante, en nuestro país, pocos estudios han relacionado la composición química de la dieta consumida con el medio ambiente ruminal en bovinos en pastoreo.

El rumen es el sitio principal de degradación de los forrajes, y donde se generan los productos finales de fermentación (amoníaco y ácidos grasos volátiles). El pH del contenido ruminal, influye sobre la degradación de la fibra, la síntesis de proteína microbiana y como consecuencia en el suministro de proteína al ganado en pastoreo (McCollum *et al.*, 1985); por lo tanto, el conocimiento de los cambios estacionales en la composición química de la dieta y los patrones de fermentación ruminal en ganado bovino en pastoreo, son una herramienta valiosa para hacer más eficiente la utilización de la dieta y el rendimiento productivo de los animales en libre pastoreo.

En el presente trabajo se plantea la hipótesis de que la composición química, así como la fermentación ruminal de la dieta consumida por el ganado en pastoreo, presentan variaciones estacionales. En consideración a lo anterior, el objetivo de este estudio es determinar la composición química y los parámetros de fermentación ruminal de la dieta consumida por ganado bovino, en libre pastoreo en dos épocas del año.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Descripción del área de estudio

El trabajo de investigación se desarrolló en un agostadero ubicado en el oeste de Durango, el cual presenta una vegetación clasificada como pastizal mediano arbosufrutescente, en lomeríos del malpaís (COTECOCA, 1979). Geográficamente el área de muestreo se ubica entre los 104° 32' 21'' longitud oeste y 24° 22'00'' latitud norte; a una altitud de 1800 msnm. El clima es seco-templado con lluvias en verano (BS<sub>1</sub>K). La región presenta una temperatura y precipitación media anual de 17.5°C y 450 mm, respectivamente (INEGI, 2003).

### Composición química

Para la obtención de muestras de la dieta consumida por el ganado, se utilizaron 4 novillos fistulados de esófago de 320 kg de peso vivo (Holecheck *et al.*, 1982). Los muestreos se realizaron por la mañana (7:30 h), durante cuatro días consecutivos y con una duración de 45 minutos, en tres ocasiones por época de año (Karn, 2000). Las muestras obtenidas se conservaron en hielo durante su transporte hasta el laboratorio, donde se secaron a 60°C por 48 h. Posteriormente, las muestras se molieron en un molino Wiley, con malla de 2 mm. para realizar los siguientes análisis de laboratorio: materia seca (MS), materia orgánica (MO), PC (AOAC, 1994), (FDN), fibra detergente ácida (FDA), lignina (Van Soest *et al.*, 1991) y digestibilidad *in vitro* de la materia seca y de la materia orgánica (Ankom, 2004).

### Fermentación ruminal

Para la determinación de los patrones de fermentación ruminal, se tomaron muestras de líquido ruminal de 2 becerros fistulados, del rumen de 350 kg. de peso vivo. Los muestreos de líquido ruminal se realizaron por la mañana (7:30 h.), durante dos días consecutivos y en tres ocasiones por época de año (Karn, 2000). Por la mañana y antes del inicio del pastoreo, se tomaron muestras de 30 ml. de líquido ruminal de cada becerro, a las cuales de inmediato se les midió el pH y enseguida el líquido se filtró en cuatro capas de gasa.

Una vez filtrado se tomaron submuestras de aproximadamente 10 ml., las cuales se recibieron en frascos de plástico provistos con 2.5 ml. de ácido metafosfórico al 25 % (peso/volumen); y se mantuvieron en congelación hasta la determinación de ácidos grasos volátiles (Galyean, 1980). Otra submuestra de 10 ml. se depositó en frascos de plástico provistos con 0.3 ml. de ácido sulfúrico al 50 % como conservador y se mantuvo en congelación hasta su análisis de nitrógeno amoniacal (Galyean, 1980). Una vez concluido la toma de muestras de líquido ruminal, los animales salieron a pastorear y nuevamente se tomaron muestras de líquido ruminal a las. 4, 8 y 12 h. después de iniciado el pastoreo.

### **Análisis estadístico**

Los datos obtenidos de composición química, fueron sometidos a un análisis de la varianza para un diseño completamente al azar ; mientras que las variables obtenidas por tiempo como son pH, ácidos grasos volátiles (AGV) y nitrógeno amoniacal (N-NH<sub>3</sub>), fueron sometidos a un análisis de parcelas divididas en el tiempo. En este arreglo de tratamientos, las parcelas grandes fueron las épocas del año y las parcelas chicas, los tiempos de muestreo a través del día. En el análisis de los datos se utilizó el paquete estadístico SAS (2003).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Composición química**

En la Tabla 1, se presenta la composición química de la dieta consumida por los animales durante dos épocas del año. Como se puede observar, se registraron diferencias en los contenidos de MS del forraje consumido por los animales entre épocas del año ( $P < 0.05$ ). La media del contenido de PC fue de 10.0 % y varió de 13.2 % en la época de lluvia, a 6.8 % en la época seca.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, indican que en la época de lluvia la PC de la dieta mostró niveles aceptables, puesto que un contenido de 80 g/kg MS es considerado adecuado para bovinos en pastoreo (NRC, 1996). Resultados similares a los obtenidos en este estudio, fueron reportados por Chávez y González (2009). De igual manera, se observaron diferencias entre épocas del año en los contenidos de FDN, FDA y lignina de la dieta consumida por el ganado ( $P < 0.05$ ). En ambos casos los contenidos más altos de FDN, FDA y lignina se observaron en la época seca (72.3 %, 50.0 % y 7.3 %, respectivamente) y los más bajos en la época de lluvia (64.4 %, 42.2 % y 4.5 %, respectivamente). Las diferencias observadas entre épocas el año, pueden atribuirse a que en la época seca, la mayor parte de los pastizales se encuentran en las

etapa de madurez y latencia, las cuales se caracterizan por el incremento en los contenidos de fibra (Ramírez *et al.*, 2001).

**Tabla 1** Composición química de la dieta de bovinos en pastoreo en dos épocas del año

	Lluvia	Seca	Media	emm
MS (%)	85.7±0.45 <sup>b</sup>	90.085.7± <sup>a</sup>	87.8	0.18
PC (%)	13.2±.10 <sup>a</sup>	6.8±0.15 <sup>b</sup>	10.0	0.08
FDN (%)	64.4±0.60 <sup>b</sup>	72.3±0.65 <sup>a</sup>	68.3	0.63
FDA (%)	42.2±0.40 <sup>b</sup>	50.0±0.13 <sup>a</sup>	46.1	0.31
Lignina (%)	4.5±0.42 <sup>b</sup>	7.3±0.11 <sup>a</sup>	5.9	0.27
DIVMS (%)	68.2±0.50 <sup>a</sup>	61.4.1±0.60 <sup>b</sup>	64.8	0.67
DIVMO (%)	64.5±0.32 <sup>a</sup>	56.6-±0.80 <sup>b</sup>	60.5	0.58

<sup>ab</sup>Medias dentro de las hileras con diferente literal indican diferencias ( $P < 0.05$ )

emm: Error estándar de la diferencia entre medias

La DIVMS de la dieta, fué diferente entre épocas del año ( $P < 0.05$ ) y varió de 61.4 % en el periodo seco, a 68.2 % en el periodo lluvioso; con una media de ambos periodos de 64.8 %. También se observaron diferencias en la DIVMO de la dieta ( $P < 0.05$ ); el valor más alto se registró en la época de lluvia (64.5 %) y el más bajo en la época seca (56.6 %); ambos valores de DIVMS y DIVMO de la dieta seleccionada por el ganado bovino, en las dos épocas del año, fueron superiores a los reportados por Chávez *et al.*, (1986) y Gutiérrez, (1991).

### Fermentación ruminal

En la Tabla 2, se muestran las concentraciones de nitrógeno amoniacal ruminal (N-NH<sub>3</sub>), a diferentes horas del día en las dos épocas del año; se observaron interacciones entre las concentraciones de N-NH<sub>3</sub> a diferentes horas del día y la época de año ( $P < 0.05$ ). En este caso, se compararon las medias de las dos épocas del año en las diferentes horas de muestreo.

Las concentraciones de N-NH<sub>3</sub> ruminal registradas a las 0, 4, 8 y 12 h., fueron diferentes entre épocas del año ( $P < 0.05$ ). Las concentraciones de N-NH<sub>3</sub> observadas

en los diferentes tiempos de muestreo, fueron más bajas en la época seca y más altas en la época de lluvia ( $P < 0.05$ ).

**Tabla 2** Concentraciones de nitrógeno amoniacal ruminal (mg/dl) en varios tiempos de muestreo de la dieta consumida por bovinos en libre pastoreo en dos épocas del año

Tiempo (h.)	Épocas		Media	eem
	Lluvia	Seca		
0	5.3±1.0 <sup>a</sup>	3.4±1.0 <sup>b</sup>	4.3	0.72
4	7.2±1.71 <sup>a</sup>	4.8±0.22 <sup>b</sup>	6.0	1.11
8	14.9±1.12 <sup>a</sup>	6.2±0.27 <sup>b</sup>	10.5	1.47
12	15.1±1.0 <sup>a</sup>	8.4±1.21 <sup>b</sup>	11.7	0.72

<sup>ab</sup>Medias con distinta literal en la misma hilera son diferentes ( $P < 0.05$ )

eem: Error estándar de la diferencia entre medias

Estas diferencias pueden explicarse, a partir de la época seca, el contenido de proteína es más reducido que el de la época de lluvia; además de que posiblemente estos valores puede estar asociados a un incremento en el contenido de nitrógeno, ligado la fracción fibra de la dieta consumida por el ganado durante la época seca (Playne y Kennedy, 1976). Satter y Slyter (1974) sugieren que para que se favorezca una óptima síntesis de proteína microbiana, es necesario una concentración mínima de N-NH<sub>3</sub> de 5 mg/100 ml. de líquido ruminal. Las concentraciones de N-NH<sub>3</sub> registradas en la época de lluvia en los diferentes tiempos de muestreo rebasan estos requerimientos de N-NH<sub>3</sub> ruminal; sin embargo, en la época seca las concentraciones de N-NH<sub>3</sub> observadas a las 0 y 4 h. , son inferiores a estos requerimientos; aunque dentro de esta misma época las concentraciones observadas a las 8 y 12 h. son superiores a estos requerimientos.

En la Tabla 3, se muestran los valores de pH y las concentraciones de ácidos grasos volátiles del forraje consumido por el ganado. Los valores de pH y las concentraciones de ácidos grasos volátiles (AGVS), no fueron afectadas por la interacciones de la época del año x tiempo ( $P < 0.05$ ); por lo que únicamente se discuten las medias de los efectos principales. El pH registrado, fué diferente entre épocas del año ( $P < 0.05$ ); el pH observado en la época seca (6.8), fué superior al de la época de lluvia (6.4).

Al respecto Orskov (1982) menciona que bajo condiciones de pastoreo, el pH ruminal normalmente varía de 6.3 a 7.0, debido al tiempo dedicado al pastoreo y a la rumia. Generalmente, con el avance de la madurez de las plantas, se espera un incremento en el pH, debido a que pequeñas cantidades de ácidos grasos volátiles, pueden ser amortiguadas por grandes cantidades de saliva, asociadas con un incremento en el tiempo de masticado y de rumia de los forrajes maduros (McCollum *et al.*, 1985).

**Tabla 3** Valores de pH ruminal y concentraciones de ácidos grasos volátiles de la dieta consumida por bovinos en libre pastoreo en dos épocas del año

	Épocas		eem
	Lluvia	Seca	
pH	6.4±0.55 <sup>a</sup>	6.8±0.68 <sup>b</sup>	0.74
AGV Totales (mM/l)	90.1±0.10 <sup>a</sup>	80.7±0.35 <sup>b</sup>	0.22
	mol/dl		
Acético	69.3±1.0 <sup>a</sup>	71.5±1.51 <sup>a</sup>	1.01
Propiónico	18.2±1.15 <sup>a</sup>	15.5±1.02 <sup>b</sup>	0.72
Butírico	8.5±1.20 <sup>a</sup>	6.6±1.81 <sup>b</sup>	0.34
Isobutírico	1.3±0.22 <sup>a</sup>	1.1±1.03 <sup>b</sup>	0.81
Isovalérico	1.1±0.13 <sup>a</sup>	0.85±0.27 <sup>b</sup>	0.09
Valérico	0.76±0.11 <sup>a</sup>	0.66±0.14 <sup>b</sup>	0.04

<sup>ab</sup>Medias con distinta literal en la misma hilera son diferentes (P < 0.05)

eem: error estándar de la diferencia entre medias

Por lo que respecta a la producción de AGVS, las concentraciones de AGVS totales fueron diferentes entre épocas del año (P<0.05); la concentración más alta se observó en la época de lluvia (90.1 mMol/l), y la más baja en la época seca (80.7 mMol/l). De igual modo, las concentraciones de ácido propiónico y butírico fueron diferentes entre épocas del año (P<0.05); no así las concentraciones de ácido acético, las cuales fueron iguales entre épocas del año (P>0.05). Las concentraciones de ácido propiónico y

butírico en la época de lluvia (18.2 y 8.5, mol/dl, respectivamente), fueron superiores a las de la época seca (15.5 y 6.6 mol/dl, respectivamente). La concentración de ácido acético en la época seca (71.5 mol/dl) fué superior a la de época de lluvia (69.3, mol/dl).

Las concentraciones de ácidos grasos volátiles obtenidas en este estudio, coinciden con los reportadas por Choat *et al.* (2003), en ganado bovino en libre pastoreo. Así mismo, previos trabajos han demostrado cambios similares en las concentraciones de AGVS en ambas épocas del año, así como en las fases de crecimiento y de dormancia de los pastizales (Funk *et al.*, 1987; Playne y Kennedy, 1976). El hecho de haber encontrado en la época seca, una concentración superior de ácido acético a la observada en la época de lluvia; lo anterior se explica a partir de que un incremento en las concentraciones de acetato, son características de la fermentación de los carbohidratos estructurales de las paredes celulares de las plantas; mientras que altas concentraciones de ácido propiónico, son favorecidas por la fermentación de los carbohidratos solubles presentes en el contenido celular de las plantas (Van Soest, 1994).

Como se ha demostrado, en la época seca, los carbohidratos estructurales del pastizal prevalecen sobre los carbohidratos solubles, que son de fácil fermentación; y como consecuencia se registran en el rumen altas concentraciones de acetato, en comparación con las concentraciones de propionato (Minson, 1990).

También se encontraron diferencias entre épocas del año, en las concentraciones de los AGVS menores (isobutírico, isovalérico y valérico) ( $P < 0.05$ ). Las concentraciones más altas de ácido isobutírico, isovalérico y valérico se encontraron en la época de lluvia (1.3, 1.1 0.76 mol/dl, respectivamente), y las más bajas en la época de seca (1.1, 0.85 y 0.66 mol/dl, respectivamente). Los AGVS menores, son requeridos por un número representativo de bacterias celulolíticas presentes en el rumen (Orskov, 1982); y sus concentraciones son más altas en la época de lluvia, cuando el crecimiento de las plantas es rápido y declinan en la medida en que el forraje madura (Playne y Kennedy, 1976).

## CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos indican, que la conjunción de los componentes químicos de la dieta con las concentraciones de nitrógeno amoniacal y de ácidos grasos volátiles, reflejan la eficiencia de utilización de la dieta seleccionada por el ganado bovino en pastoreo. Los contenidos de PC de la dieta consumida por el ganado en la época seca, no cubren las necesidades de proteína de bovinos en pastoreo, lo que sugiere la suplementación proteica del ganado durante esta época del año. En términos generales las concentraciones de N-NH<sub>3</sub> ruminal fueron las óptimas para el crecimiento



microbiano; y como consecuencia se favorece la digestión de la fracción fibra de la dieta. Las concentraciones de ácidos grasos volátiles, reflejaron en cierta medida la eficiencia de utilización de la materia orgánica digestible de la dieta. Por lo anterior se concluye, que el ganado bovino apacentado en pastizales ubicados en el oriente del estado de Durango, requiere de suplementación alimenticia particularmente proteica y energética durante la época seca del año.

### LITERATURA CITADA

- ANKOM Technology. Procedures for fiber and in vitro analysis. 2004.
- AOAC. Official Methods of Analysis (15th Ed.) Association of Official Analytical Chemist. Washington. 1994.
- CHÁVEZ S, Fierro GLC, Peña RH, Sánchez GE, Ortiz MV. Composición botánica y valor nutricional de la dieta de bovinos en un pastizal mediano abierto en la región central de Chihuahua. *Téc Pecu Mex*. 1986; 50:90-105.
- CHÁVEZ SAH, González GF. Estudios Zootécnicos (Animales en Pastoreo). En: Chávez SAH. (ed). *Rancho Experimental la Campana, 50 años de Investigación y Transferencia de Tecnología en Pastizales y Producción Animal*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. 2009:113-206.
- CHOAT WT, Krehbiel CR, Duff GC, Kirksey RE, Lauriault LM, Rivera JD, Capitan BM, Walker DA, Donart GB, Goad CL. Influence of grazing dormant native range or winter pasture on subsequent finishing cattle performance, carcass characteristics and ruminal metabolism. *J Anim Sci*. 2003; 81:3191-3201.
- COTECOCA. Comisión Técnico Consultiva para la Determinación de los Coeficientes de Agostadero. Editorial Calypso. SARH. Durango, México. 1979.**
- FUNK MA, Galyean ML, Branine ME, Krysl LJ. Steers grazing blue grama rangeland throughout the growing season. I. Dietary composition, intake, digesta kinetics and ruminal fermentation. *J. Anim. Sci*. 1987; 65:1342-1353.
- GALYAN ML. *Techniques and Procedures in Animal Nutrition Research*. New Mexico State University. 1980: 124.
- GUTIERREZ JL. *Nutrición de Rumiantes en Pastoreo*. Colección de Textos Universitarios. Universidad Autónoma de Chihuahua. México. 1991.
- HOLECHECK JL, Vavra M, Pieper RD. Methods for determining the nutritive quality of range ruminants diets: A Review. *J Anim Sci*. 1982; 35:309-315.
- INEGI. *Anuario Estadístico Durango*. México. 2003.
- KARN JF. Supplementation of yearling steers grazing northern great plains rangelands. *J. Range Manage*. 2000; 53: 170-175.
- MCCOLLUM FT, Galyean ML, Krysl LJ, Wallace JD. Cattle grazing blue grama rangeland. I. Seasonal diets and rumen fermentation. *J. Range Manage*. 1985; 38: 539-542.

- MINSON DJ. Forages in Ruminants Nutrition. California, USA: Academic Press, 1990: 82.
- MURILLO OM, Reyes EO, Palacio CC, Toca RJ, Carrete CFO, Herrera TE. Constituyentes parietales del forraje consumido por ganado bovino en un pastizal mediano arbosufrutescente en Durango. Memorias del XXVIII Congreso Nacional de Buiatría. Morelia, Michoacán. México. 2004: 209.
- MURILLO OM, Reyes O, Palacio C, Carrete F, Ruiz O, Herrera E. Consumo voluntario y valor nutricional de la dieta de bovinos en un pastizal mediano arbosufrutescente en dos épocas de año. II Simposio Internacional de Manejo de Pastizales. Zacatecas, Zac. 2005:125.
- NRC. Nutrient Requirements of Beef Cattle. Seventh Revised Edition. National Research Council (U.S). Subcommittee of beef cattle Nutrition; Washington, D,C. National Academic Press. 1996.
- ORSKOV ER. Protein Nutrition in Ruminants. Academic Press, New York. 1982.
- PLAYNE JJ, Kennedy PM. Ruminant volatile fatty acids and ammonia in cattle grazing dry tropical pastures. J. Agric. Sci. (Camb).1976; 86:367-372.
- RAMÍREZ RG, Enríquez A, Lozano F. Valor nutricional y degradabilidad ruminal del zacate buffel y nueve zacates nativos del NE de México. Ciencia UANL. 2001; IV: 314-321
- SAS. 2003. SAS User's Guide: Statistics. SAS Inst, Inc Cary, NC. 2001.
- SATTER LD, Slyter LL. Effect of ammonia concentración on rumen microbial L.D. protein production *in vitro*. Britch. J. Nutr.1974; 32:199.
- VAN SOEST PJ, Robertson JB, Lewis BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polisacarides in relation to animal nutrition. J. Dairy Sci. 1991;74:3583- 3588.
- VAN SOEST PJ. Nutritional Ecology of the Ruminant. 2nd ed. Cornell Univ Press Ithaca, New York, USA: Academic Press. 1994.