

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”**

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL



Evaluación de la digestibilidad de alimentos por dos métodos.

Por

José Elpidio Escobedo Rodríguez

Tesis

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

Ingeniero Agrónomo Zootecnista

**Buenavista, Saltillo, Coahuila, México
Mayo 2004**

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
“ANTONIO NARRO”**

DIVISIÓN DE CIENCIA ANIMAL

DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL

Evaluación de la digestibilidad de alimentos por dos métodos.

Por

José Elpidio Escobedo Rodríguez

Tesis

Que somete a consideración del H. Jurado Examinador como requisito parcial para obtener el título de:

Ingeniero Agrónomo Zootecnista

APROBADA

**Ph. D. Jesús M. Fuentes Rodríguez
Presidente del Jurado**

**MC. Ing. Lorenzo Suárez García
Sinodal**

**MC. Ing. Manuel Torres Hernández
Sinodal**

El Coordinador De La División De Ciencia Animal.

Dr. Ramón F. García Castillo

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. Mayo 2004.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la vida, la fuerza y las ganas de salir adelante.

A mi “ALMA TERRA MATER” por ser el cimiento de mi formación, no solo como profesionista, también como persona.

Al Dr. Jesús M. Fuentes Rodríguez por su asesoramiento, paciencia y apoyo.

Al Ing. Lorenzo Suárez por brindarme su ayuda en la revisión y guía del presente trabajo.

Al Ing. Manuel Torres por su colaboración y asesoramiento en el desarrollo de este trabajo.

A la LCN. Laura Marisela Lara por su infinito apoyo y paciencia en la culminación de este estudio.

Al Ing. Bruno Herrera por su grandioso apoyo en el proceso de este trabajo

Al ing. Ramón García Castillo por su infinito apoyo y amistad.

A todos mis maestros por su grandioso e incondicional apoyo y sobre todo por la contribución en esta etapa tan importante de mi vida.

A la familia Zavala Hernández por cederme un espacio en su hogar y por su incalculable apoyo.

A todos y cada uno de mis compañeros de generación, gracias por su ayuda y sobre todo por su compañía que al estar lejos de nuestras familias se convierte en la del familiar más cercano.

A mis compañeros de trabajo por brindarme su apoyo, su paciencia en la conclusión de este trabajo, y por su amistad incondicional

A todas aquellas personas que durante casi 5 años me acogieron en esta tierra, en la que me hicieron sentir como en casa; y que de alguna forma contribuyeron en mi formación mil gracias.

“Ser Buitre de la Universidad Antonio Narro es un orgullo que debemos poner muy en alto en todo momento”

DEDICATORIAS

A DIOS

A quien debo todo en esta vida

AL AMOR DE MI VIDA..... MI HIJA

Gpe. Yosselin Escobedo Niño

Por ser mi inspiración y razón de vivir

A MIS PADRES

Juan Escobedo González y Elisa Rodríguez Pérez.

Por quienes soy lo que soy y a quienes agradeceré de por vida la invaluable herencia que han dejado en mis manos; mi educación. Gracias por ser mis padres, gracias por amarme como yo los amo.

A MIS HERMANOS

Dolores (Iolís)

Genaro (Gena)

Juan Cecilio (Chilo)

Victor Manuel (Manolo)

Ricardo (Rica)

Por su apoyo y amor incondicional, por sus consejos y comprensión.

A MI ESPOSA

Elia Niño García

Por su comprensión y apoyo en todo momento, gracias por tu paciencia durante esta etapa.

A MIS TIOS Y TIAS

Pablo Gómez y Raquel Escobedo de Gómez.

José Ramírez y Guadalupe Escobedo de Ramírez.

A MI ABUELITO

Elpidio Escobedo Pérez (+)

Quien ha sido el mejor ejemplo de trabajo y por haberme inculcado el amor por la tierra.

A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS DE GENERACIÓN

Luz, Elizabeth, Armando, Andrés, Gabino, Adrián, Víctor, Samuel, Juanita. A

toda la generación XC de Zootecnia.

INDICE

	Pagina
INDICE DE CUADROS.....	viii
INDICE DE FIGURAS.....	x
RESUMEN.....	xi
INTRODUCCION.....	1
Justificación.....	2
Objetivos.....	3
Hipótesis.....	3
REVISION DE LITERATURA.....	4
La técnica in situ para la valoración de los forrajes.....	5
Factores que afectan los valores de la digestibilidad <i>in situ</i>	7
Tamaño de los poros de la bolsa.....	7
Tamaño de la bolsa.....	8
Cantidad de muestra.....	9
Tamaño de partícula de la muestra.....	9
Secuencia de la introducción de las bolsas al rumen.....	10
Posición de la bolsa en el rumen.....	10
Tiempo de incubación.....	11
Lavado de la bolsa.....	12
Efecto de la dieta.....	12
Contaminación microbiana y mineral.....	12
Variación en el tiempo y animales.....	13

Numero de bolsas.....	13
Métodos para estimar la digestibilidad <i>in vitro</i>	14
Metodo in vitro DAISY ^{II}	16
Características del incubador DAISY ^{II}	17
Factores que afectan la digestibilidad in vitro con el método DAISY ^{II}	18
MATERIALES Y METODOS.....	20
Descripción del área de estudio.....	22
Forrajes y animales utilizados.....	20
Digestibilidad in situ.....	21
Obtención del liquido ruminal.....	22
Digestibilidad in vitro con el método DAISY ^{II}	22
Procedimiento descriptivo.....	23
RESULTADOS Y DISCUSION.....	28
CONCLUSIONES.....	36
LITERATURA CITADA.....	37
APENDICE.....	47

INDICE DE CUADROS

	Pagina
1. Análisis de muestra original MS, H, y PC en base seca (%).....	28
2. Digestibilidad <i>in vitro</i> e <i>in situ</i> de la materia seca de alfalfa (%).....	29
3. Determinación de la Materia Seca, Humedad y Proteína Cruda después de la Digestibilidad <i>In vitro</i> (%).....	31
4. Determinación de la Materia Seca, Humedad y Proteína Cruda después de la Digestibilidad <i>In Situ</i> (%).....	31

INDICE DE FIGURAS

	Pagina
1. Incubador Daysi ^{ll}	27
2. Digestibilidad <i>in vitro</i> e <i>in situ</i> de la materia seca de alfalfa (%).....	30
3. Digestibilidad <i>in vitro</i> e <i>in situ</i> de la proteína cruda de alfalfa a diferentes tiempos de incubación (%).....	32
4. Correlación entre DIV y DIS de la materia seca de alfalfa.....	34
5. Correlación entre Tiempo y DIS de la materia seca de alfalfa.....	35
6. Correlación entre Tiempo y DIV de la materia seca de alfalfa.....	35

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar la determinación de la digestibilidad *in vitro* por el método Daisy^{II} (ANKOM Technology) comparando los resultados con los obtenidos con la digestibilidad *in situ* por el método tradicional, en ambos casos utilizando heno de alfalfa como forraje experimental. Incubando en ambos métodos a diferentes periodos (0, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96) para la obtención del porcentaje de digestibilidad.

Para estimar la DIV de los alimentos se utilizó la técnica descrita por Goering y Van Soest (1970), siguiendo la modificación metodológica propuesta por ANKOM Technology Corporation.

El experimento consistió por un lado en la incubación de 26 bolsas de nylon con 0.5 g. de muestra (24 muestras y 2 testigos blancos), 3 por cada periodo en el incubados Daisy^{II}; y por otro, la incubación en el animal fistulado la misma cantidad de bolsas con 5 g. de muestra a los mismos periodos.

El análisis estadístico utilizado fue completamente al azar con diferente número de repeticiones, con una correlación múltiple para observar la relación entre métodos y una comparación de medias, así como la regresión lineal correspondiente. Los resultados arrojados por este diseño demuestran diferencias poco significativas para ambos métodos.

Los resultados encontrados para la digestibilidad de MS *in vitro* con el método Daisy^{II} a los diferentes periodos (0, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96) fueron los siguientes: 21.854, 25.484, 35.988, 54.218, 58.099, 61.375, 60.768 y 55.167,

así mismo para la digestibilidad de la MS por el método *in situ* se encontraron los siguientes: 35.868, 44.649, 62.562, 70.050, 74.752, 75.995, 75.496, 75.768 respectivamente para los tiempos 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72 y 96.

Palabras Claves: Digestibilidad *in vitro*, Digestibilidad *in situ*

INTRODUCCIÓN

La digestión se define como la preparación de los alimentos para su absorción en el aparato digestivo. Sin embargo, la mayoría de los autores tienden a utilizar una definición implícita que quiere decir la desaparición del alimento en el aparato digestivo. Esta definición más amplia incluye la absorción al mismo tiempo que la digestión (Church y Pond, 1998).

Estimar la digestibilidad de un alimento por el método convencional in vivo resulta demorado, costoso, limita la cantidad de alimentos a evaluar simultáneamente, exige grandes cantidades de alimento (Pires et al, 1979), Por estas y otras razones han sido desarrolladas técnicas *in vitro* con la finalidad de realizar los ensayos en el laboratorio, de los procesos digestivos que ocurren en los rumiantes. Actualmente se ha desarrollado un nuevo método para obtener la digestibilidad *in vitro* de los alimentos. Este método conocido como Fermentador ruminal DAISY^{II} de ANKOM Technology Corporation, EUA. Procedimiento presentado por Santos et al, (1997). Esta técnica permite evaluar un gran número de muestras al mismo tiempo. El sistema DAISY^{II} es eficiente y una alternativa viable para el análisis *in vitro* (Garman et al, 1997). Cuando se requiere de analizar una gran cantidad de muestras y los reactivos resultan costosos, la cantidad de muestra se puede reducir siempre y cuando el volumen de inóculo permanezca constante. (González et al., 1990).

JUSTIFICACION

El estudio de los alimentos para fines de producción animal es pieza importante en el desarrollo de la misma, de igual manera la adopción de nuevas tecnologías y/o métodos es sin duda fundamental para el avance de la nutrición animal. La digestibilidad de los alimentos es uno de los aspectos más importantes para el aprovechamiento de los mismos, sin duda alguna, este parámetro no se ha quedado atrás en su estudio, prueba de ello es la innovación del incubador Daisy^{II} de ANKOM Technology Corporation el cual funciona simulando la actividad digestiva del rumen. El funcionamiento de este instrumento, su metodología así como la interpretación de los trabajos en él realizados justifica el trabajo que a continuación se presenta con la intención de comparar la digestibilidad in vitro por el metodo antes citado con el metodo tradicional de la bolsa de nylon.

OBJETIVO

Evaluar la determinación de la digestibilidad *in vitro* con el incubador **DAISY^{II}** con el método tradicional *in situ* de la bolsa de nylon.

HIPÓTESIS

El método para determinar la digestibilidad *in vitro* **DAISY^{II}** presenta coeficientes de digestibilidad similares a los obtenidos con el método *in situ* tradicional de la bolsa de nylon.

REVISIÓN DE LITERATURA

El costo elevado de las pruebas de digestibilidad sobre todo en ganado bovino ha favorecido el desarrollo de pruebas *in vitro* que permiten simular la fermentación en el rumen bajo condiciones controladas. Se ha desarrollado una gran variedad de métodos. Algunos son mucho más apropiados que otros para fines específicos. Para las pruebas de grupo, por ejemplo se obtiene una pequeña cantidad del líquido del rumen de un animal fistulado. Después que se retira la mayor parte de partículas de alimento, el líquido se coloca en un recipiente junto con una sustancia amortiguadora (que semeja la saliva) y la muestra a prueba. La combinación se fermenta luego a la temperatura del rumen (39° C) durante un cierto tiempo, generalmente de 24 a 48 horas. Se han desarrollado métodos apropiados que suministran una estimación más válida de la digestión animal de los forrajes de alta o baja calidad que la que se obtiene cuando se utilizan los análisis químicos, cuando el objeto de la prueba es predecir o (correlacionar) la digestión en un animal vivo en la digestión que se efectúa *in vitro*. Estos métodos no son útiles para evaluar la utilización de los granos y de otros concentrados en los animales. (Church y Pond, 1998)

También se han desarrollado los fermentadores continuos. Si se manejan en forma adecuada, es posible simular la ingestión y evacuación (absorción o ambas) del rumen durante días o semanas. Por lo consiguiente, es posible simular las condiciones del rumen en una forma más exacta que lo que se puede hacer en

los cultivos de grupo, donde las condiciones serían más representativas de la alimentación de un animal una vez al día. (Church y Pond, 1998).

Se ha comprobado que los procedimientos de fermentación en el rumen son muy útiles para la investigación de alimentos o para obtener las características de los alimentos que consuman los rumiantes, especialmente cuando solo se tienen disponibles pequeñas muestras. Estos métodos son útiles también para estudiar la función del rumen y el metabolismo de algunos compuestos específicos. Por ejemplo, la determinación de las clases de N no proteico que pueden utilizar los organismos del rumen, la producción de ácidos grasos volátiles a partir de una dieta procesada de forma diferente. (Church y Pond, 1998).

La técnica *in situ* para la valoración de los forrajes

La técnica de la bolsa de nylon es conocida por su utilidad práctica para estimar la degradabilidad ruminal de materia seca y proteína de diferentes ingredientes (Orzkov et al., 1980, Cote et al., 1983).

La técnica de la bolsa de nylon es también un medio eficaz para evaluar la digestión en el rumen. En este procedimiento, se coloca el alimento en estudio en una bolsa de nylon (u otro material indigerible) la cual se coloca en el rumen de un animal fistulado ruminalmente. Se retiran las bolsas de cierto tiempo de incubación y se determina la cantidad de material que se perdió en las bolsas (por la fermentación). Dichos métodos son útiles para evaluar las diferencias relativas que

existen entre los diferentes alimentos, pero no proporcionan valores similares a aquellos que se obtienen en las pruebas de digestibilidad efectuadas con animales vivos. Tal vez este método sea más útil para estudiar la digestión de concentrados (granos) que el método *in vitro* en el que la digestión relativa es lo que interesa (Church y Pond, 2002).

Basada en la interpretación de la desaparición del material en las bolsas introducidas en el rumen de animales fistulados y medida a intervalos periódicos (Castellanos, et al., 1990) determina la cantidad de muestra que es digerida y la tasa a la cual esta digestión se realiza. Este método se utiliza cuando se requiere conocer el efecto de las condiciones ruminales sobre la digestión de las muestras. Esta técnica se inicio usando bolsas de seda muy fina, posteriormente se utilizaron materiales resistentes a la degradación ruminal como poliéster y nylon. Weakley et al., (1983) en una investigación usando bolsas de nylon determinó que un material con poros más pequeños parece disminuir el flujo de agentes digestivos dentro de la bolsa y limita el flujo de residuos digeridos. Actualmente se utilizan bolsas de dacrón, son baratas y con bajo contenido de nitrógeno Romero, (1990). La técnica de la bolsa de nylon de dacrón Torrent et al., (1994), es una herramienta para la evaluación de los alimentos y para mejorar el entendimiento de los procesos de degradación ruminal (Orzkov et al., 1980).

La ventaja de la técnica es que la digestión se lleva acabo en su ecosistema natural (Castellanos et al., 1990). Entre las desventajas esta la falta de uniformidad con que se ha usado por los investigadores (Romero, 1990; Castellanos et al., 1990).

Factores que afectan los valores de la digestibilidad *in situ*.

Es importante reconocer que la digestibilidad es variable; esto es, el mismo forraje dado al mismo animal no se digiere siempre al mismo grado. Varios factores alteran el grado de digestión. De la misma forma, existen diferencias marcadas en la capacidad de diferentes especies animales de digerir un forraje específico, en particular voluminoso y fibroso. (Church y Pond, 2002)

Son diversos los factores que afectan la digestibilidad de los nutrientes, en la mayoría de ellos coinciden varios investigadores por lo tanto, se describirán solo aquellos de mayor importancia.

Tamaño de los poros de la bolsa

La finalidad de los poros de la bolsa es limitar la entrada del contenido ruminal no asociado con la dieta a evaluar, pero si permitir la entrada de la población microbial para que degrade los ingredientes, al mismo tiempo evitar o disminuir la salida de partículas de alimento no degradable (Nocek, 1988), Belasco et al.(1958: citados por Mehrez y Orzkov, 1977) y Van Keuren y Heineman (1962) enfatizaron la importancia del tamaño del poro del material para las bolsas en la regulación del pasaje de partículas sólidas, estos aspectos fueron estudiados por Rodríguez (1968), quien reporto que materiales de 1680, 2303 y 2550 poros/cm² dan valores similares para desaparición de materia seca de las bolsas. Llamas y Tejada (1990) mencionan que materiales con 1600 poros/cm² son adecuados. Se ha encontrado que materiales con poros de 20 milimicras y 35 milimicras dan

perdidas más pequeñas de materia seca que aquellos materiales con poros de 53 milimicras (Uden et al, 1974); estos mismos autores (1974) notaron un flujo del contenido del rumen hacia las bolsas con un tamaño de poro de 35 milimicras. Kempton (1980) no encontró efecto significativo de la porosidad del material de la bolsa de nylon sobre la tasa de desaparición de la materia seca a las 72 horas. Van Soest (1983) sugiere que el tamaño óptimo de los poros esta alrededor de 30 milimicras, ya que poros más pequeños retardan la entrada de microorganismos que inhiben una óptima fermentación, mientras que poros más grandes permiten la entrada de pequeñas partículas lignificadas que distorsionan los resultados.

Tamaño de la bolsa

El tamaño óptimo de la bolsa ha sido tema de estudio de un gran número de investigadores (Rodríguez 1968 y Mehrez 1977: citados por Orzkov et al., 1980). Una bolsa suficientemente grande permite que el fluido ruminal entre en la bolsa y se mezcle con la muestra; también debe ser suficientemente pequeña para que fácilmente se retire de la cánula ruminal. Usualmente se utilizan bolsas de 140 x 90 mm. con esquinas redondeadas para prevenir que cualquier cantidad de muestra sea atrapada (Orzkov, et, al., 1980). Kempton (1980) recomienda bolsas de 150 x180 mm. que sean pegadas por calor. Mehrez y Orzkov (1977) observaron un incremento en la desaparición de materia seca en 24 hrs. al utilizar bolsas de 17 x 19 cm. en lugar de 5 x 8 cm.

Cantidad de muestra

El peso de la muestra también es importante, Van Hellen y Ellis (1977) recomiendan una relación materia seca-área de la bolsa de $10\text{mg}/\text{cm}^2$; a diferencia de Uden y Van Soest (1984) que recomiendan no usar más de 6 o 7 mg/cm^2 . tamaño de poro de 5-74milimicras. Mientras que Tomlin et al., (1967: citados por Mehrez y Orzkov, 1977) sugieren que el peso de la muestra no debería exceder de 0.1 g de materia seca/cm. de longitud de la bolsa. Castellanos et al., (1990) recomienda de 2 a 5 g de muestra, Van Soest (1975) (citado por Romero, 1990) recomienda 8 g para forrajes, para tener suficiente material residual después de incubar para los análisis de laboratorio. Orzkov (1980) et al., ha encontrado que se necesitan 2 g para la paja molida seca, 5 g de heno de buena calidad o hierba seca, 5 g de concentrado y 10 a 15 g de hierba fresca. Kempton (1980) recomienda 5 g para material fibroso y 5 g para harinas proteicas y granos.

Tamaño de partícula de la muestra.

El tamaño de partícula de la muestra es de suma importancia. Nocek (1988) reportó que los materiales más grandes y toscos están asociados con tasas de digestión más bajas y de mayor variación y viceversa con materiales finamente molidos. Romero (1990) menciona que cribas menores de 2 mm. no deberían utilizarse ya que al disminuir tanto el tamaño de las partículas se incrementa el área de exposición del material al líquido ruminal, aumentando así las posibilidades de ataque por los microorganismos ruminales; todo esto conduciría a una sobrestimación de los valores de la digestibilidad. Uden y Van Soest (1984)

mencionan que se ha encontrado que con partículas menores de 0.6 mm estas tienden a agruparse en un cúmulo donde la parte central no se ve expuesta al líquido ruminal, reduciéndose así la degradación del sustrato (Figroid et al., 1972: citados por Romero, 1990). Investigaciones hechas por Nocek (1985) indican que incrementando el tamaño de muestra con relación a la superficie de la bolsa, el alimento se compacta con el microambiente de la bolsa disminuyendo el flujo del líquido ruminal, el contacto con las partículas alimenticias y la tasa de digestión, principalmente en los períodos iniciales de incubación. El material molido cribado a 1 mm y pasado y retenido por una malla de 0.3 mm es el que debe ser utilizado (Castellanos et al., 1990), la preparación de las muestras deberá representar hasta donde sea posible lo que sucedería con el animal rumiante (Orzkov et al., 1980).

Secuencia de introducción de las bolsas al rumen

Nocek (1985) (citado por Romero, 1990) sugiere introducir las bolsas a intervalos y sacarlas todas al mismo tiempo, luego lavarlas

Posición de la bolsa en el rumen

Balch y Johnson 1950: citados por Orzkov et al., (1980) reportaron que la digestión procedía más rápidamente cuando las bolsas fueron incubadas en el saco ventral del rumen, aunque el trabajo realizado más tarde por Edwin y Eliston (1959: citados por Orzkov et al., 1980 y Rodríguez (1968): citado por Orzkov et al., 1980) mostró que la posición de las bolsas en el rumen tuvo poco o ningún efecto

sobre la degradación de varios alimentos. No se ha demostrado ninguna reducción en la variabilidad de la degradación de la materia seca al atar peso con el fin de anclar las bolsas en el saco ventral del rumen, pero Rodríguez (1968): citado por Mehrez y Orzkov, 1977 y Orzkov et al., 1980) encontró que el peso del ancla no tuvo efecto en la variabilidad, pero la variación entre las bolsas fue reducida cuando estas fueron atadas con un hilo de longitud de 50 cm. en lugar de 30 cm., Rodríguez (1968) indicó que la longitud del hilo permitió mayor movimiento de las bolsas en el interior del rumen, y de este modo minimizó el efecto de las variaciones en el ambiente ruminal. Mehrez y Orzkov (1977) amarraron un ancla hecha de latón con un peso aproximado de 40g en el fondo de las bolsas para prevenir que estas flotarán. Este procedimiento no tuvo efecto en la variabilidad en la desaparición de materia seca entre las bolsas, pero en los trabajos realizados por Balch y Johnson (1950) y Miles (1951: citados por Mehrez y Orzkov, 1977) concluyeron que la digestibilidad fue más rápida.

Tiempo de incubación

Se puede utilizar en forma general 12 a 36 horas de incubación; materiales fibrosos 36 horas; suplementos proteicos 2, 4, 6, 12, 24 hrs.; forrajes tropicales más de 48 hrs. ; para leguminosas, herbáceas y arbóreas es suficiente 48 hrs. (Romero 1990). El tiempo necesario para la incubación dependerá del material que se este utilizando: concentrados 12-36 hrs.; forrajes de alta calidad 24-60 hrs.; de baja calidad 48-72 hrs. (Orzkov et al., 1980).

Lavado de la bolsa

El procedimiento usual es lavar la bolsa corriente hasta que el agua salga clara con un tiempo aproximado de 5 minutos por muestra (Van Keuren y Heinemann, 1962; Mehrez y Orzkov, 1977). Resultados de una investigación de Mehrez y Orzkov (1977) muestran que el peso de las bolsas disminuyó debido al lavado; sin embargo, la media en pérdida de materia seca fue muy pequeña (0.05 ± 0.002 g). Resultados similares fueron reportados por Van Keuren y Heinemann (1962) quienes encontraron que el método de lavado no tuvo efecto en el coeficiente de variación en la desaparición de materia seca.

Efecto de la dieta

Animales que reciben dietas altas en concentrado tienen una actividad celulolítica reducida en el rumen (Orzkov et al., 1980). Es importante que los animales fistulados que reciben dietas uniformes sean utilizados para determinar la tasa de degradación de los materiales alimentados (Kempton, 1980).

Contaminación microbiana y mineral

Según Mehrez y Orzkov (1977), los concentrados tienen relativamente poca contaminación por microorganismos (entre el 5 y 10 % del nitrógeno de los residuos). Olubobukun et al., (1990) mencionaron que el sustrato restante puede ser fácilmente sobrestimado sin antes practicarle una corrección para la contaminación microbiana, que es un 95 % para la PC y 20 % para la MS. Van Milgen et al., (1992) mencionan que los fosfatos de calcio pueden ser las fuentes

mayores de contaminación mineral en novillos alimentados con alfalfa. Wanderley et al., (1993) mencionaron que en alimentos que son bajos en proteína se puede incurrir en errores grandes al cuantificar la tasa de degradación de nitrógeno debido a la colonización microbiana en forrajes y granos expuestos a una fermentación ruminal *in situ*.

Variación en el tiempo y entre animales

Orzkov et al., (1980) encontró como principal fuente de variación el componente entre animales, seguido por la variación entre días; la variación menor se encontró entre bolsas incubadas juntas y retiradas del rumen al mismo tiempo, coincidiendo con Romero (1990). Por ejemplo cuando se alimentaron siete diferentes especies animales con el mismo heno de alfalfa, se encontraron diferencias apreciables en la digestión de las diversas fracciones tomadas en cuenta. Esta información demuestra las diferencias inherentes entre las especies animales en lo que se refiere a su capacidad de utilizar alimentos fibrosos, e indica de modo claro una ventaja de los rumiantes y el caballo sobre el cerdo y el conejo (Church y Pond, 2002).

Número de bolsas

En ganado ovino Orzkov et al., (1980) utilizó nueve bolsas con una cánula de 40 mm de diámetro; Kempton (1990) maneja seis bolsas como cantidad ideal en ovejas, aunque un número considerablemente mayor se puede utilizar en ganado bovino.

Métodos para estimar la digestibilidad *in vitro*

El método del saliva-pepsina (Tilley y Terry, 1963) es uno de los métodos más usados para predecir la digestibilidad *in vivo* (Clancy y Wilson, 1966; De Boever *et al.*, 1988). Semejante a otras, esta técnica y sus variantes simulan la digestión gástrica por lo tanto es más exacta la determinación de la digestibilidad de muchos forrajes (Tilley y Terry, 1963; De Boever *et al.*, 1988).

Uno de los problemas principales de la técnica es la obtención del líquido ruminal el cual es obtenido típicamente animales fistulados, llegando a ser en algunos países cada vez más difícil obtener las licencias requeridas para preparar quirúrgicamente tales animales así como lo costoso de su manutención.

Los resultados de la técnica también son afectados por la calidad del líquido ruminal que puede modificarse debido al, proceso, a la dieta y a la especie animal donante, a la época de la colección y a las condiciones anaerobias, el pH y la temperatura óptimos (Tilley y Terry, 1963; Clancy y Wilson, 1966).

La mayoría de estos problemas pueden ser prevenidos realizando estandarizaciones en los métodos (Tilley y Terry, 1963), pero algunos otros efectos tales como, la digestión postgástrica, la tasa de paso de la digesta y la digestión de compuestos nitrogenados insolubles también pueden afectar.

Algunos de estos factores han conducido a las diferencias en el método *in vitro* y el método *in vivo* causando predicciones bajas de la digestibilidad *in vivo*. Varios trabajos realizados han encontrado datos exactos para forrajes frescos, sin embargo en ensilajes y pajas es menor la predicción de la digestibilidad con el

método de la saliva-pepsina (Klopfenstein *et al.*, 1972; Adesogan *et al.*, 1998; Givens *et al.*, 1995).

Varias técnicas basadas en la celulasa se han utilizado con un cierto éxito, para estimar digestibilidad del forraje. Comparado con los métodos de líquido ruminal, tales métodos son generalmente más simples, menos tardados y no requieren de animales fistulados. El problema principal con estas técnicas es la variabilidad de las preparaciones enzimáticas debido a la incubadora y a la fuente de la enzima (Barber *et al.*, 1989; Givens *et al.*, 1995)

Sin embargo, las predicciones basadas en la digestibilidad enzimática de la energía in vivo también varían con la especie de forraje, la población microbial y el estado de madurez de la planta (Barber *et al.*, 1989; Givens *et al.*, 1995) tales implicaciones han limitado su uso, además de las diferencias de los procesos. Dependiendo del laboratorio, la solubilidad de la celulosa se realiza con pepsina o el tratamiento detergente neutro. Otras variaciones implican incluyendo la amilasa y los tratamientos previos de la gamannasa para el almidón y los alimentos ricos en grasa respectivamente. Mientras que algunos resultados indican que el procedimiento de la pepsina-celulasa es más exacto otros favorecen el procedimiento de la celulosa detergente neutro. Sin embargo, el método de la celulasa-pepsina es más fácil de manipular, propenso a menos errores y requiere pocas horas para terminar, aunque la técnica del detergente neutro también requiere pocos días (Dowman y Collins, 1982). Mientras que tales métodos no requieren animales fistulados, su uso continúa siendo limitado por la

variabilidad de la actividad enzimática y porque resulta inadecuado el tipo de enzimas empleadas durante la digestión in vivo.

Sin embargo, la técnica desarrollada por Van Soest y sus colaboradores (Van Soest *et al.*, 1966) supone una alternativa al método de Tilley y Terry (1963), ya que permite una valoración más rápida de los alimentos sin afectar negativamente a la precisión del valor obtenido (Van Soest, 1994). Este procedimiento consiste en una incubación de los alimentos con líquido ruminal durante 48 h a 39°C, seguida del tratamiento del residuo obtenido con una solución neutro-detergente durante 1 h a 100°C, y los valores obtenidos se consideran una estimación de la digestibilidad real de los alimentos (Van Soest *et al.*, 1966).

Método in vitro DAISY^{II}

La incubadora DAISY^{II} de ANKOM Technology fue introducida recientemente para hacer más fácil la valoración de la digestibilidad in vitro. El método puede digerir varias muestras del forraje en bolsas dentro de frascos de cristal, los cuales se rotan en un compartimiento aislado. Cuando se reduce la cantidad de muestra, manteniendo constante el volumen de inóculo, se incrementa la estimación de la digestibilidad y la variabilidad se duplica. Por eso cuando se necesita analizar un gran número de muestras se puede reducir el peso de la muestra en función de economizar en reactivos (González *et al.*, 1990).

En este método se asume que la materia que desaparece durante la incubación es digerida. Recientemente Holden (1999) comparó los métodos Tilley

y Terry y Daisy^{II} para predecir la digestibilidad de materia seca con el buffer recomendado por ANKOM Technology Corp. para ambos métodos. Los resultados de este experimento mostraron concordancia entre los dos métodos, comprobando con esto que el Daisy^{II} podría ser usado para predecir la digestibilidad *in vitro* de los forrajes y granos.

Características del incubador Daisy^{II}

El incubador DAISY^{II} ANKOM Technology Corp. facilita el estudio de la desaparición de la materia seca por el método *in vitro*. Diseñado con un dispositivo programable, el incubador puede digerir hasta 100 muestras al mismo tiempo. El contenido ruminal o inóculo solo tiene que ser distribuido en cuatro frascos fermentadores que se encuentran ubicados dentro del incubador.

Los pasos para realizar los procesos de la DIVMS son sencillos. El incubador mantiene constante y uniforme la temperatura (39.5° C), así como la agitación en cada uno de los frascos dentro de la cámara.

Capacidad (muestras):	100
Temperatura de operación:	39.5° C
Energía requerida:	120V o 220V
Dimensiones:	44cm x 64cm x 47cm
Peso:	31 Kg. (68 lbs)

Factores que afectan la digestibilidad *in vitro* con el método Daisy^{II}

No obstante los resultados de la digestibilidad obtenidos por este método pueden ser afectados por tamaño de muestra y método de proceso, la proximidad de los frascos incubadores a alguna fuente de calor y al grado al cual las bolsas se sumergen en el contenido ruminal. Adesogan A. T. (inédito) observó que las predicciones de la digestibilidad *in vitro* eran más exactas cuando los forrajes fueron incubados en bolsas no estandarizadas. Sin embargo, cuando se utilizan tales bolsas, los resultados obtenidos son variables de acuerdo al tamaño del poro, tipo de sellado y tipo de tela de las bolsas. La pérdida de substrato de partículas solubles o finas y materia indigerible, también es dependiente del tipo del alimento y el proceso de las muestras. Además, los efectos asociados entre las muestras incubadas en el mismo recipiente pueden también influenciar los resultados.

D. Damiran, et al., al evaluar la técnicas, el tamaño de muestra (0.25 vs 0.50 g) y el tamaño de molido (1 mm vs 2mm). Encontró que para la digestibilidad de MS de heno de pasto, fue: el Daisy^{II} (688g/Kg.) e *in situ* (713g/Kg.). En contraste con la paja, en Daisy^{II} (404 g/Kg.) e *in situ* MS (409g/Kg.) En resumen encontró que las digestibilidades estimadas en Daisy e *in situ* fueron mayores para heno de pasto molido a 1mm vs 2 mm de igual manera encontró que en el Daisy^{II} e *in situ* usando una muestra de 250 mg. resultaron mayores las estimaciones de digestibilidad que aquellas muestras de 500 mg.

Mabjeesh S. J. et., al evaluando dos diferentes fuentes de inoculo para la digestibilidad *in vitro* para los métodos Daisy^{II} y Tilley y Terry encontró que la fuente de inoculo no afecto la digestibilidad de ninguno de los alimentos usados.

Por otro lado Cone et al. (1989) encontró que el tipo de dieta del animal donador afecta los valores de la degradabilidad *in vitro*.

Debido a que la población microbiana ruminal se ve afectada por numerosos factores, la procedencia del inóculo ruminal se considera la mayor fuente de variación en la determinación de la digestibilidad *in vitro* Martenand Barnes, (1980).

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del área de estudio.

El presente trabajo se llevo a cabo en las instalaciones de la unidad metabólica del departamento de Nutrición y Alimentos, así como en el laboratorio de Reproducción Animal, perteneciente al departamento de Producción Animal de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, localizada en Buenavista, Saltillo a 8 kilómetros de dicha ciudad y ubicada en las coordenadas geográficas 25° 22' 00 Latitud Norte y 101° 01'00" Longitud Oeste y a una Altitud de 1743 msnm. (García, 1973)

Forrajes y Animales Utilizados

El forraje utilizado fue alfalfa henificada molida en molino Willey con una criba de 0.2 mm. de diámetro y secada a una temperatura de 70° por 24 horas, determinándose materia seca total a las muestras para posteriormente ser pesados 5 g. de muestra (*in situ*), 0.5 g. (*in vitro*) y colocados en cada una de las 24 bolsas de nylon, previamente lavadas, secadas, pesadas e identificadas. Las bolsas en grupos de 3 fueron atadas en línea a un hilo de nylon, dejando una distancia de 10 cm. entre bolsas.

Digestibilidad *in situ*

Un grupo de 26 bolsas (24 muestras y 2 blancos), fueron incubadas durante 96 horas en el rumen de un torete fistulado, con intervalos de 96, 72, 48, 24, 12, 6, 3 y 0 en este último periodo solo se introdujeron las bolsas por un máximo de 3 minutos con la intención de que solo se humedecieran con el liquido ruminal, llevándose a cabo este procedimiento en una sola ocasión. Al término de la incubación, las bolsas fueron lavadas a chorro, hasta que el agua salió clara posteriormente se procedió a secarlas en estufa a 70° C durante 24 horas. Fueron enfriadas en desecador y pesadas. Una vez esto se procedió a mezclar las 24 bolsas entre cada uno de los 8 tiempos (3 repeticiones por intervalo) resultando 8 bolsas a las cuales se les determinó materia seca y proteína cruda (N X 6.25 Kjédhal), se calculó el coeficiente de digestibilidad *in situ* de MS con la fórmula:

$$\%D = \frac{(\text{BOLSAS} + \text{MTRA DIGERIDA}) - (\text{BOLSA} + \text{MTRA SIN DIGERIR})}{\text{GRAMOS DE MUESTRA}} \times 100$$

Las bolsas utilizadas en este trabajo de la marca ANKOM, las cuales se pueden utilizar en estudios de concentrado y forraje; y con un tamaño de 5x10 cm. y 10x20 cm. Hechas de poliéster libre de nitrógeno y con un tamaño de poro de 50 (+/- 15) milimicras.

Obtención del Líquido Ruminal

Para la obtención del líquido ruminal se utilizó un toro de aproximadamente 750 Kg. con cánula ruminal al cual se le restringió agua y alimento un día antes de la extracción del líquido. Una vez extraído el líquido, se filtró y depositó en dos termos de ½ litro cada uno, ya en el laboratorio se mezcló con saliva artificial a razón de 1:4 y se procedió al gaseado con CO₂ esto último con la finalidad de obtener un pH neutro.

Digestibilidad *in vitro* con el incubador DAISY^{II}

Para estimar la DIV de los alimentos se utilizó la técnica descrita por Goering y Van Soest (1970), siguiendo la modificación metodológica propuesta por Ankom Technology Corporation. Las muestras de 0.5 g se incubaron en el interior de bolsas de nylon, introducidas en recipientes de vidrio de 4 l de capacidad en los que se añadieron 2 lts. de una mezcla de líquido ruminal y del medio de cultivo (1:4 v/v) descrito por Goering y Van Soest (1970) y 25 muestras por recipiente (un blanco por frasco). La preparación del medio de cultivo y la mezcla con el líquido ruminal se realizaron en condiciones anaerobias (gaseado continuo con CO₂) y manteniendo la temperatura constante a 39°C. El incubador utilizado Daisy^{II} dispone de cuatro recipientes de los cuales solo se utilizaron dos. Una vez cerrados los recipientes se introdujeron en el incubador durante 96, 72, 48, 24, 12, 6, 3 y 0 horas, bajo agitación continua. Transcurrido este tiempo se extrajeron las bolsas de los recipientes. El procedimiento siguiente fue el lavado y secado de las bolsas, el cual se realizó de la misma forma que en el método *in situ*. La

determinación de materia seca, digestibilidad y cenizas fue el mismo modo para ambos casos.

PROCEDIMIENTO DESCRIPTIVO PARA EL METODO DAISY^{II}

A.- Procedimiento

a) Preenjuagar las bolsas para filtrar en acetona de 3 a 5 minutos y complete el tiempo con aire seco. La acetona enjuaga y remueve una superficie que inhibe la digestión microbiana.

b) Identificar, pesar las bolsas y registrar su peso.

c) Poner en ceros la balanza y pesar en cada una de las bolsas 0.5 gramos de muestra

Nota: Una muestra con tamaño de 0.5 gramos en una digestión de 48 horas es aceptable de acuerdo a estudios recientes. De cualquier modo utilizando 0.25 gramos de muestra colocarla en la bolsa y sellada al calor e introducirla al frasco digestor en el cual caben 25 muestras, las cuales deben estar distribuidas por ambos lados del divisor plástico del frasco. Colocar también una bolsa sellada esta será el blanco que se utilizara como factor de corrección.

Preparación de la mezcla de solución Buffer: (para cada frasco digestor)

a) Precaliente a 39° C ambas soluciones (A y B) en recipientes separados.

b) Agregue 266 ml de solución B a 1330 ml de la solución A proporción (1:5)

- c) La cantidad exacta de A y B debe ser ajustada con la solución B, al obtener un pH de 6.8 a 39° C. No más arriba de 6.8, el ajuste de pH es necesario.
- d) Agregue 1600 ml de la mezcla A y B A cada frasco que contiene las bolsas con muestra.
- e) Coloque los frascos ya con muestras y la solución Buffer dentro del incubador DAISY^{II} y active el botón de la temperatura y el agitador (la luz roja en el botón indica encendido).
- f) Equilibre la temperatura de los frascos digestores dejándolos por un mínimo de 20-30 minutos. Este tiempo se puede usar para la colección y preparación del inculo del rumen).

Preparación del inculo e incubación

- a) Mantener todo el material de cristal a 39°C.
- b) Precaliente dos termos de capacidad de 2 litros con agua a 39°C, vacié el agua caliente justo antes de la colección del rumen inoculado.
- c) Usando el procedimiento adecuado para la colección tire los dos litros de agua a 39° C de los termos para poder agregar el inculo del rumen a los termos.
- d) Agregar aproximadamente 2 puñados de material fibroso del rumen con su colección en uno de los termos.
- e) Vacía el inculo del rumen de los termos dentro del recipiente agitador.
- f) Purga el recipiente agitador con gas CO₂ y se mezcla en una velocidad alta por 30 segundos, la acción de mezclar sirve para desalojar microbios que son agregados al material y así asegurar una población representativa de la fermentación *in vitro*.

g) Filtrar la mezcla digerida dentro de un matraz de 5 litros (precalentado a 39°C) a través de cuatro capas de gasa.

h) Filtre el fluido del rumen restante de los otros termos a través de cuatro capas limpias de gasa en el mismo matraz de 5 litros.

Nota: Deje gasa extra alrededor de la orilla que facilite exprimir el contenido del material filtrado.

El matraz debe ser continuamente purgado con CO₂ y continuar purgando durante la transferencia del inculo.

i) Mida 400 ml de inculo del rumen en un cilindro graduado y agréguelos a uno de los frascos digestores en el cual se encuentra la solución buffer y las muestras, purgue el frasco digestor con gas CO₂ por 30 segundos cierre y asegure bien la tapa.

j) Repita el proceso para todos los frascos que se usen.

Nota: No permita que el gas CO₂ haga burbujas a través del inculo buffer, se sugiere que se use CO₂ en forma gaseosa y lo aplique colocando una manta encima del contenido del frasco.

k) Incubación (confirme que los botones de la temperatura y la agitación estén encendidos).

La determinación *in vitro* en periodo de 48 horas los resultados son confiables. El incubador DAISY^{II} se mantiene a una temperatura de 39° C /-0.5.

l) Al completar la incubación, remueva la jarra y tire el fluido, enjuague las bolsas minuciosamente con agua fría y golpee ligeramente el agua hasta que queden limpias. Use un mínimo de agitación mecánica.

m) Registre el peso de la bolsa al salir de la digestión in vitro como W3.

Cálculos

$$\%DIV = 100 - \frac{(W3 - (W1 \times C1))}{W2} \times 100$$

$$\%DIV Ms = \frac{100 - (W3 - (W1 \times C1))}{W2 \times Ms} \times 100$$

Donde:

W1= Peso de la bolsa tarada

W2= Peso de la muestra

W3= Peso final de la muestra después de la digestión in vitro

C1= Corrección de la bolsa (blanco) (peso original de la bolsa/peso final).

Ms = % de materia seca.

B.- Reactivos

a) Solución Buffer A:	g/litro
KH ₂ PO ₄	10.0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5
NaCl	0.5
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.1
Urea (Reactivo de marca)	0.5
b) Solución Buffer B:	
Na ₂ CO ₃	15.0

Na₂S₉H₂₀

1.0

c) Inoculo fluido de rumen

C.- Aparatos

a) Incubadora DAISY^{II} (Figura 1)

Aparato de filtración

Bolsa que impulsa a sellar el calor

Cilindros graduados de 1 lt. y 500 ml.

2 termos

Tela para filtrar (gasa)



Figura 1 Incubador Daysi^{II}

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Digestibilidad *in vitro* e *in situ* de la materia seca

Los valores obtenidos de la digestibilidad *in vitro* mediante el método Daisy^{II} empleado en este trabajo se pueden interpretar como estimaciones de la digestibilidad real de los alimentos (Van Soest, 1994).

En el cuadro 1 se presenta el análisis de la muestra original estudiada (heno de alfalfa), para % MS, % H, % y % PC en base a materia seca, siendo similares a los encontrados por Mabjeesh, et al.,2000, (MST 88.4% y 21.8% PC).

Cuadro 1 Análisis de muestra original MS, H, y PC en base a materia seca (%)

MUESTRA	%MST	%H	%PC BMST
ALFALFA	89.885	10.115	24.95

Los coeficientes de digestibilidad *in vitro* e *in situ* para la materia seca se presentan en el cuadro 2 donde se aprecia la tendencia al aumento de la digestión de el forraje conforme se incrementa el tiempo de incubación, siendo más drástico las primeras 24 horas y estabilizándose en los siguientes periodos, lo que hace suponer la digestión máxima. Los resultados coinciden con lo encontrado por Mabjeesh, et al., (2000) (58%) incubando heno de alfalfa a 48 hrs. Así como a los encontrados por Marinucci et al. (1992) en el cual la digestibilidad de la MS de la alfalfa fue mucho mayor al determinarse por el método *in situ* que por el *in vitro* (70.9 y 59.8%, respectivamente). En contraste difieren a los resultados encontrados por Damiran, et al., (2002), *in situ* fue 653g/Kg., Daisy 689g/Kg. para

heno de pasto, también observó que la digestibilidad se incrementaba cuando el tamaño de partícula disminuía (1mm vs 2mm), Daisy 688g/Kg. y 713g/Kg. para in situ para 1mm de molido.

Cuadro 2 Digestibilidad in vitro e in situ de La materia seca de alfalfa (%).

TRATAMIENTOS	TIEMPO DE INCUBACION							
	0	3	6	12	24	48	72	96
<i>IN VITRO</i>	21.854	25.484	35.988	54.218	58.099	61.375	60.768	55.209
<i>IN SITU</i>	35.868	44.649	56.845	70.050	74.752	75.995	75.496	75.768

En la figura 2 se puede observar la tendencia de la digestibilidad *in vitro* e *in situ* a incrementarse drásticamente en los primeros 5 periodos (0, 3, 6, 12, 24 y 48) para después permanecer constante. De acuerdo al tiempo de incubación se puede apreciar la digestibilidad máxima en el periodo 48 hrs. En el caso de la digestibilidad in vitro se observa una pequeña disminución de la digestibilidad en el último periodo de incubación, lo cual podría atribuirse a problemas en el sellado de las bolsas o a un error en la lectura de los pesos, también se observa una mayor variabilidad en todos los periodos de incubación en comparación con el metodo *in situ* el cual presenta una mayor uniformidad en todos los periodos. El coeficiente de variación encontrado en este método presenta significancia aceptable (4.48) y (2.49) respectivamente. De igual manera los resultados arrojados en el modelo estadístico manifiestan una mayor uniformidad en los tiempos 0, 3, 6, 12, 24,48 y

72 para el método *in situ*, observándose una mayor constancia para el método *in situ* en todos los periodos.

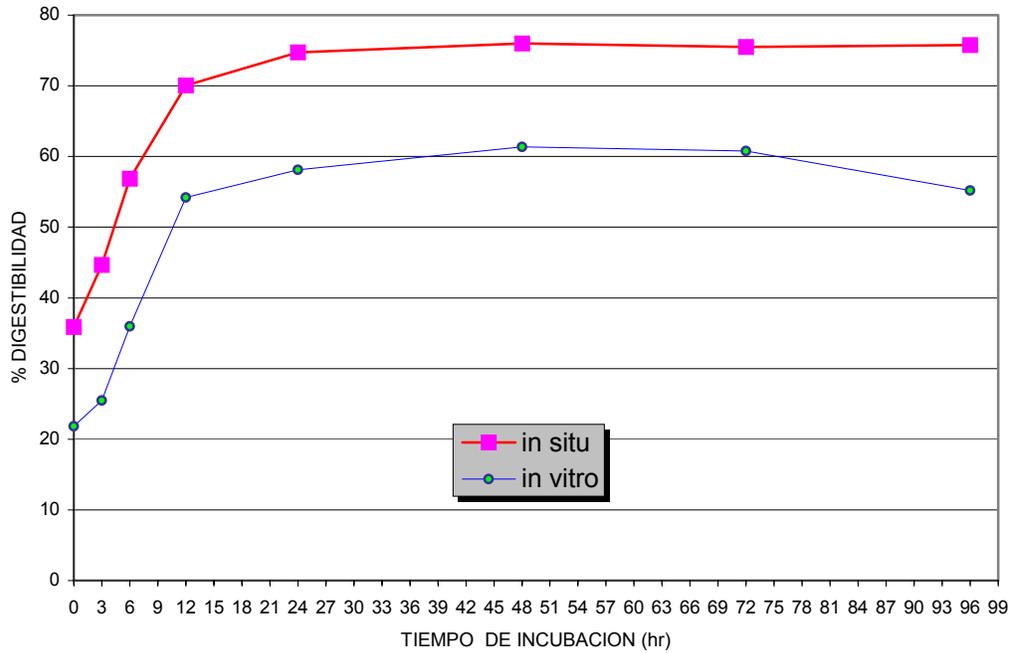


Figura 2 Digestibilidad in vitro e in situ de la MS de alfalfa (%).

En cuanto al comportamiento de la PC presento gran similitud en ambos métodos, observándose una digestibilidad más marcada a partir del periodo de 24 hrs. para el método *in vitro* no así para el método *in situ* siendo a partir de las 12 hrs. la mayor digestibilidad Figura 3.

Cuadro 3 Determinación de la Materia Seca, Humedad y Proteína Cruda de alfalfa después de la Digestibilidad *In Vitro* (%).

DIGESTIBILIDAD <i>in vitro</i>				
TIEMPO	%MS	% H	%PC	%PC EN BASE MST
0	99.20	0.8	20.18	20.34
3	98.70	1.3	19.90	20.16
6	97.20	2.8	17.34	17.84
12	96.60	3.4	15.92	16.48
24	95.30	4.7	11.89	12.47
48	94.00	6.0	11.71	12.45
72	91.80	8.2	11.68	12.72
96	90.80	9.2	11.65	12.83

Cuadro 4 Determinación de la Materia Seca, Humedad y Proteína Cruda de alfalfa después de la Digestibilidad *In Situ* (%).

DIGESTIBILIDAD <i>in situ</i>				
TIEMPO	%MST	%H	%PC	% PC EN BASE MST
0	99.80	0.2	19.33	19.36
3	98.50	1.5	18.48	18.76
6	97.60	2.4	17.91	18.35
12	96.20	3.0	14.21	14.77
24	95.80	4.2	12.51	13.06
48	94.20	5.8	11.94	12.67
72	92.00	8.0	11.65	12.66
96	90.00	10.0	11.20	12.44

En la figura 3 puede observarse la misma tendencia para ambos métodos en cuanto al comportamiento de la PC.

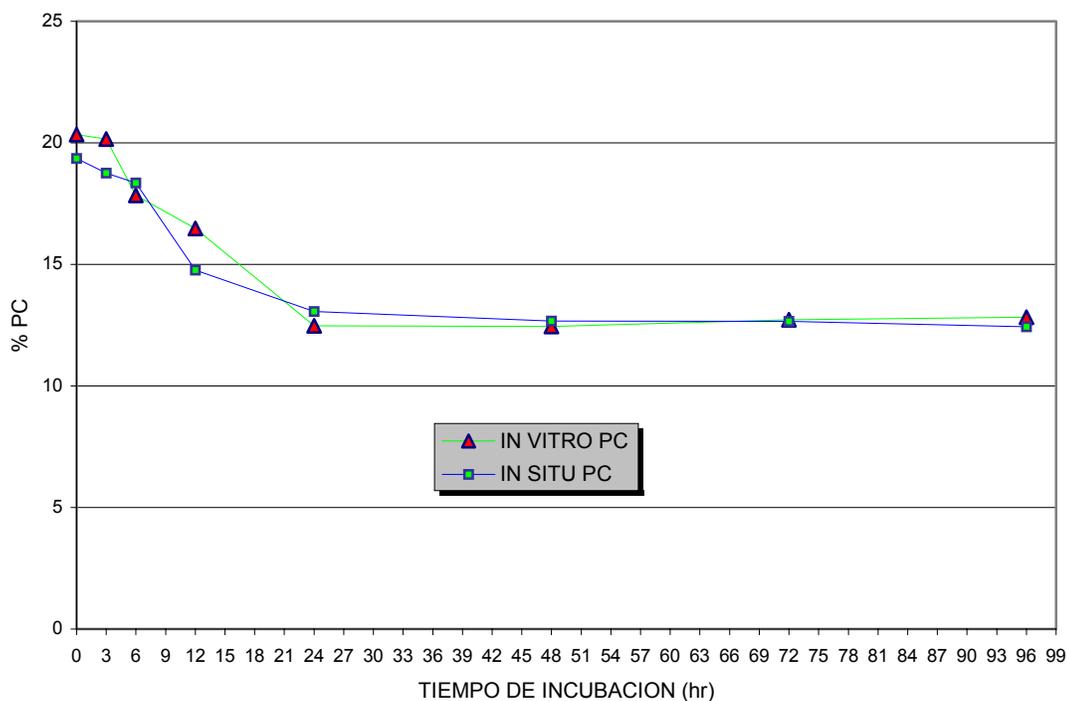


Figura 3 Digestibilidad in vitro e in situ de la proteína cruda de alfalfa a diferentes tiempos de incubación (%).

Los resultados obtenidos con anterioridad indican que el valor de la digestibilidad in vitro determinada por el método Daisy^{II} puede verse afectada negativamente por una alta proporción de alimentos concentrados en la ración de los animales donantes de líquido ruminal. Este hecho se podría atribuir al menor número de microorganismos celulolíticos en el inóculo procedente de estos animales, como consecuencia del descenso del pH ruminal ocasionado por el consumo de altas cantidades de concentrado Bochi-Brum et al. (1999). Otros factores influyentes en los resultados podrían ser las bolsas usadas, características del alimento, la proximidad de los frascos incubadores a alguna fuente de calor y al grado al cual las bolsas se sumergen en el contenido ruminal. Adesogan A. T. (inédito).

Cherney et al. (1993) establecieron que el método *in vitro* es el que mejor se relaciona al *in vivo*, aunque señalaron que este método es susceptible a variaciones debido a diversos factores que exigen un buen control. Algunos de estos factores causantes de variación son; la fuente del inóculo, la dieta basal, la especie del animal donante y la hora de recolección del inóculo (lapso antes o después de la alimentación).

La diferencia principal entre los métodos es relacionada al tamaño de partícula de material indigerible en los alimentos, por lo que se sugiere que los alimentos sean molidos a tamaños más grandes con lo cual se pueda prevenir el escape de partículas indigeribles de la bolsa Mabjeesh et al, (2000).

El tamaño del poro de la bolsa (50 +/- 15µm coincide con el reportado por Vanzant et al. (1998) con una capacidad de muestra de 10 mg/cm².

En cuanto al coeficiente de correlación se realizó una corrida múltiple entre las variables tiempo de incubación, digestibilidad *in situ* y digestibilidad *in vitro*. Los resultados indican una relación positiva entre el tiempo de incubación y la digestibilidades *in vitro* e *in situ* (0.6842), (0.7125), al nivel 0.05 respectivamente lo que quiere decir que a medida que aumenta el tiempo de incubación se incrementan la digestibilidad de igual manera la relación entre la digestibilidad *in vitro* y la digestibilidad *in situ* mostró ser positiva (.9854) al nivel 0.01.

Referente a la ecuación de regresión esta arrojó los siguientes resultados:
vector de coeficiente de regresión. B0 = 18.621

$$B1 = 0.966$$

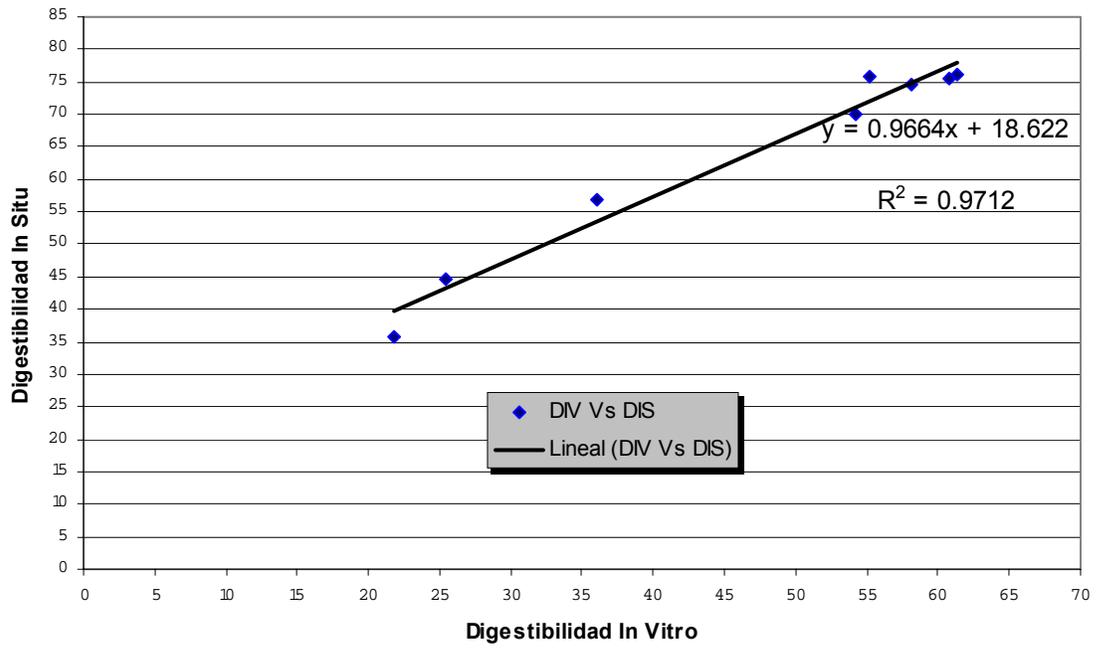


Figura 4 Correlación entre DIV y DIS de la materia seca de alfalfa.

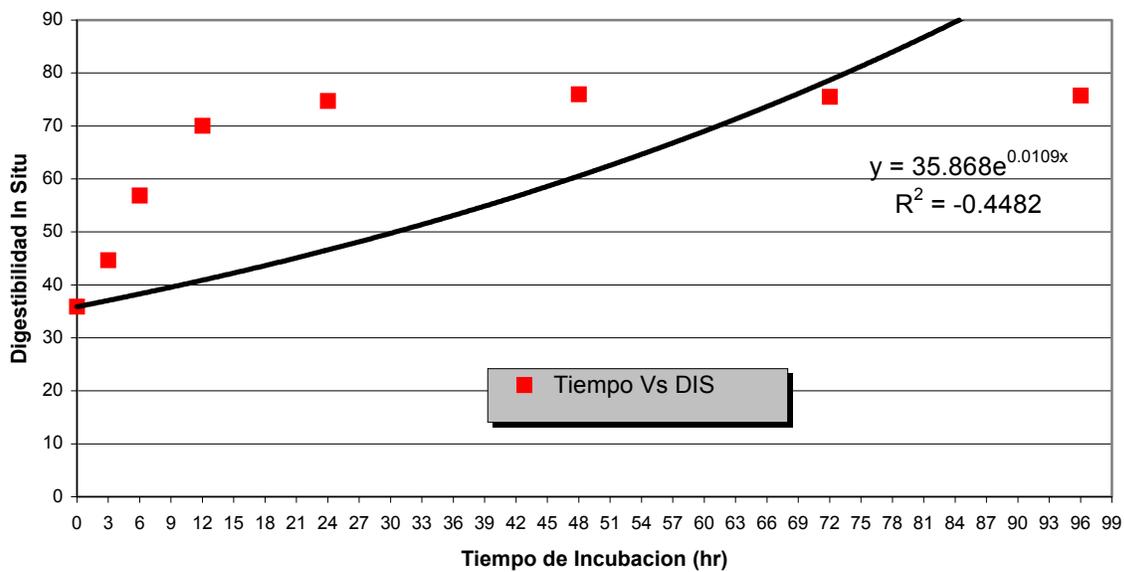


Figura 5 Correlación entre Tiempo y DIS de la materia seca de alfalfa

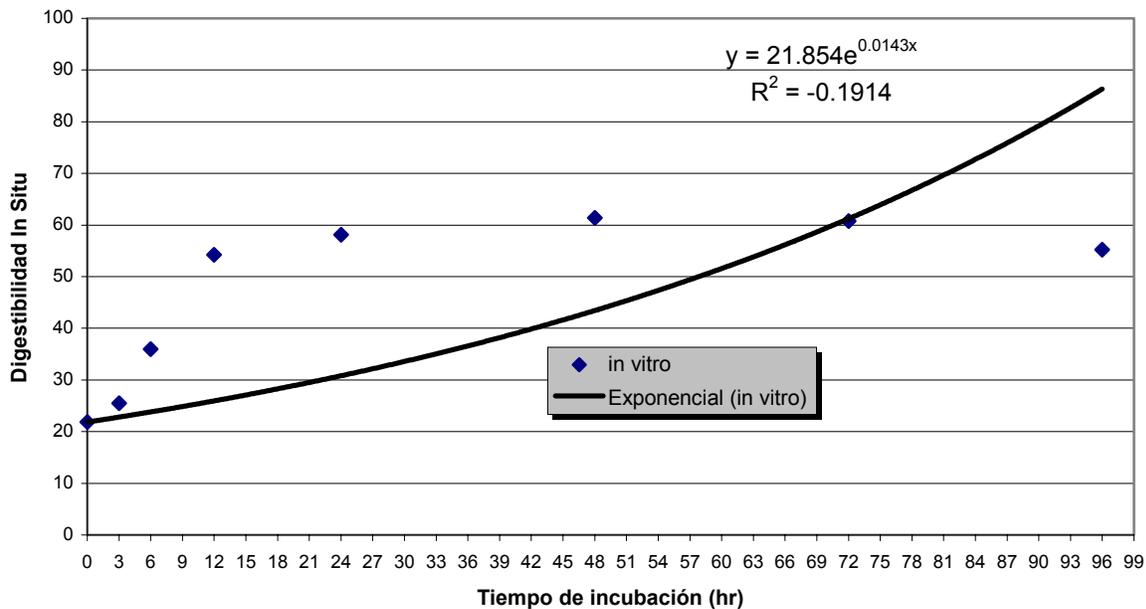


Figura 6 Correlación entre Tiempo y DIV de la materia seca de alfalfa.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

Los resultados muestran que el coeficiente de digestibilidad fue mayor con el método in situ alcanzando un valor máximo de 75.995 % mientras que con el Daisy^{II} el máximo fue de 61.375 % por otro lado el mínimo fue de 35.868% y 21.855 % respectivamente. Cabe destacar los errores que pudieran haberse dado puedan deberse al sellado de la bolsa o alguna imprecisión de la balanza.

En cuanto a la estimación de la digestibilidad a nivel de laboratorio estos métodos presentan una alternativa de no utilizar animales o menor número de ellos, reducen la mano de obra y permiten analizar un mayor número de muestras.

Según resultados encontrados, estos métodos son confiables siempre y cuando se mantenga un buen control de las variables en el desarrollo del experimento ya que de esto depende el grado de exactitud que arrojen los resultados finales.

El sistema DAISY^{II} es un método rápido y fácil para estimar la digestibilidad in vitro de los alimentos, en comparación con el método de la bolsa de nylon tradicional.

LITERATURA CITADA

Adesogan, A. T., D. I. Givens, and E. Owen. 1998. Prediction of the *in vivo* digestibility of whole crop wheat from *in vitro* digestibility, chemical composition, *in situ* rumen degradability, *in vitro* gas production and near infrared reflectance spectroscopy. *Animal Feed Science and Technology*, 74: 59-272.

Adesogan, A. T. 2003. What are feed worth? , A critical evaluation of selected nutritive value methods Department of Animal Sciences University of Florida, Gainesville. Proceedings 13th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium, pp 33-47

ANKOM Technology C.L. Kelley/All rights reserved. 1-Mar-98 1998

<http://www.ankom.com/products/daisy.html>

Barber, G. D., D.I., Givens, M.S., Kridis, N.W Offer and I. Murray,. 1990. Prediction of the organic matter digestibility of grass silage. *Animal Feed Science and Technology*, 28: 115-128.

Bryant, M. P. 1972 Commentary on the Hungate technique for culture of anaerobic bacteria. *American Journal of Clinical Nutrition* 25, 1324–13

Castellanos, R. A., I. G. Llamas y A. S. Shimada. 1990. Manual de Técnicas de Investigación en Rumiología. 1ª Edición. Editado por Consultores de Producción Animal S. C. México DF. pp. 29-42

Church, C. D., G. W. Pond 1998. Fundamentos de Nutrición y Alimentación de Animales 1ª Edición 6ª Reimpresión. Editorial LIMUSA. México D. F. pp. 46, 47, 51, 55.

Church C. D., G. W. Pond, R. K. Pond 2002. Fundamentos de Nutrición y Alimentación de Animales 2ª Edición Editorial LIMUSA. México DF. Pp. 60, 61, 62, 63.

Clancy, M.J., R.K. Wilson, 1966. Development and application of a new chemical method for predicting the digestibility and intake of herbage samples. Proceedings of the Xth International Grassland Congress, Helsinki, Pp. 445-453.

Cote, M., J. R. Seoane and P. Gervais. 1983. Evaluation of rumen degradation of Forage dry matter in sheep and cattle using the nylon bag technique. Can. J. Anim. Sci. 63:367.

Czerkawski, J. W., G. Breckenridge 1977. Design and development of a long term rumen simulation technique (Rusitec) British Journal of Nutrition 38, 371–384.28.

Damiran, D, T. DelCurto, D.W. Bohnert, G.D. Pulsipher and S. Findholt 2002
Comparison of techniques and grinding size to estimate digestibility of forage Oregon State University, Union, Oregon Department of Fish & Wildlife, La Grande. Abstracts American Society of Animal Science 80 (Suppl 2):19 Abstract.

De Boever, J.L., B.G., Cottyn, J.I., Andries, F.X. Buysse, and J.M. Vanacker, 1988. The use of a cellulase technique to predict digestibility, metabolizable and net energy of forages. Animal Feed Science and Technology, 19: 247-260.

Dowman, M.G., F.C. Collins, 1982. The use of enzymes to predict the digestibility of animal feeds. Journal of the Science of Food and Agriculture, 33: 689-696.

Garman, C. L., L. A., Holden, H. A., Kane, 1997. Comparison of in vitro dry matter digestibility of nine feedstuffs using three methods of analysis. J. Dairy Sci., v.80, Suppl. 1, p.260.

Givens, D.I., B.G., Cottyn, P.J.S. Dewey, and A., Steg, 1995. A comparison of the neutral detergent-cellulase method with other laboratory methods for predicting the digestibility *in vivo* of maize silages from three European countries. *Animal Feed Science and Technology*, 54: 55-64.

Goering, H.K. and P. J. Van Soest. 1970. Forage Fiber Analysis. (apparatus, reagents procedures and some applications). Agr. Handbook No. 379. ARS, USDA. Washington DC.

González, D., M. E., Ruiz, F. Romero, et al.1990 Recomendaciones sobre la utilización de los métodos *in vitro*, *in situ* y enzimático en el estudio de la digestión de alimentos In: Ruiz, M. E., Ruiz, A. Nutrición de rumiantes: guía metodológica de investigación. 1990. p.127-140.

Gutiérrez, O. E, 1990. Uso de la bolsa de nylon para estimar la utilización de la proteína en rumiantes. Memoria de la tercera reunión de nutrición animal. UAAAN, Buenavista, Saltillo, Coah. México, Memorias 88-90. p 54 -62.

Hobson, P. N. 1969. Rumen Bacteria Methods in Microbiology 3B, 133–159.

Hungate, R. E. 1969. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes Methods in Microbiology 3B, 117–132.

Julier, B., M., Lila, V., Furstoss, V. Travers, and C. Huyghe, 1999. Measurement of cell-wall digestibility in lucerne using the filter bag technique. *Animal Feed Science and Technology*, 79: 239-245

Kempton, T. J., 1980. El uso de la bolsa de nylon para caracterizar el potencial de degradabilidad de alimentos para el rumiante. *Producción Animal, Tropical* 5:115-126.

Klopfenstein, T.J., V.E., Krause, M.J. Jones, and W. Woods, 1972. Chemical treatment of low quality forages. *Journal of Animal Science*, 35: 418-422.

Llamas, L. G. y I. Tejada, 1990. Técnicas de Laboratorio para el Análisis de Forrajes para Rumiantes. *Manual de Técnicas de Investigación en Rumiología, Sistema de Educación Continua en Producción Animal en México*. Ed. Consultores en Producción Animal 1er. Edición, México p38.

Mabjeesh, S. J, M. Cohen, and A. Arieli 2000 In Vitro Methods for Measuring the Dry Matter Digestibility of Ruminant Feedstuffs: Comparison of Methods and Inoculum Source. Department of Animal Sciences, The Faculty of Agricultural, Food, and Environmental Quality Sciences *J. Dairy Sci* 83:2289–2294 2289 e-mail: mabjeesh@agri.hugi.ac.il.

Mann, S. O. 1968. An improved method for determining cellulolytic activity in anaerobac bacteria Journal of Applied Bacteriology 31, 241–244.

McDougall, E. I. 1948 Studies on ruminal saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva Biochemical Journal 43, 99–109.

Morvan, B. J. Doré F. Rieu-Lesme L. Foucat, G Fonty & P. Gouet 1994. Establishment of hydrogen utilizing bacteria in the rumen of the newborn lamb fens Microbiology, Letters. 117, 249-256.

Mehrez, A. Z. and E. R. Orzkov, 1977. A study of the artificial fibre bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. J. Agric. Science., Camb. 88:645 -650.

Newbold, C. J. R. J. Wallace & F. M. McIntosh 1997 Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants British Journal of Nutrition 76, 249–261.

Nocek, J. E. 1985. Evaluation of specific variables affecting in situ estimates of ruminal dry matter and protein digestion. J. Animal Sci. 60:1347.

Nocek, J. E. and R. A. Khon, 1988. In situ particle size reduction of alfalfa and timothy hay as influenced and particle size. 71:932.

Olivares, Sáenz Emilio, 1994 Paquete de Diseños Experimentales FAUANL Versión 2.5 Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León, Marín, Nuevo León, México.

Olivares, Sáenz Emilio, 1996 Diseños Experimentales con Aplicación a la Experimentación agrícola y Pecuaria P. 291

Orzkov, E. R., B. D. Hovell y F. Moud. 1980. Uso de la técnica de la bolsa de nylon para la evaluación de los alimentos. *Producción Animal Tropical*. 5:213.

Pires, M. B. G., E. A. G. Freitas, D. S. Trindade, et al. Estabelecimento de um sistema de digestibilidade *in vitro* no laboratório da equipe de pesquisa em Nutrição Animal. *Anuario Técnico do IPZFO, Porto Alegre*, v. 6, p. 345-385. 1979.

Richardson, A. J., A.G. Calder, C.S. Stewart & A. Smith 1989 Simultaneous Determination of Volatile and non-volatile fatty acidic fermentation products of anaerobes by capillary gas chromatography *Letters in Applied Microbiology* 9, 5–8.

Rodriguez, H., 1968 The in vivo Bag Technique in Digestibility Studies. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola (English Edition)* 2:77-81

Olubobukun, J. A., W. M. Craig y K. R. Pond, 1990. Effects of mastication and microbial contamination on ruminal in situ forage disappearance. J. Animal Sci. 68:3371.

Romero, F. 1990. Utilización de la Técnica de Digestión in situ para la Caracterización de los Forrajes. Nutrición de rumiantes. Guía metodologica de investigación. ALPA. RISPAL. 1a Edición. San Jose Costa Rica. Pp. 105-114.

Santos, G. T., M. A. Assis, H. V. Petit, et al. 1997 Chemical composition and in situ degradability of leucaena (*Leucaena leucocephala*) and desmodium (*Desmodium ovalifolium*) submitted at two conservation forms. J. Dairy Sci., Champaign, v.80, Suppl. 1, p.221.

Tablas Estadísticas, Departamento de Estadística y Cálculo U A A A N, P. 24.

Tilley, J. M. A. and R. A. Terry, 1963. A two stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. Journal of the British Grassland Society, 18: 104-111.

Torrent, J. D. E. Johnson and M. A. Kujawa. 1994. Co- product fiber digestibility: kinetics and in vivo assessment. J. Anim. Science. 72: 970-795.

Uden, P., R. Parra y P. J. Van Soest, 1974. Factors Influencing Reliability of the Nylon Bag Technique. *J. Dairy Sci.* 57:622

Uden, P. y P. J. Van Soest, 1984. Investigation of in situ Bag Technique and a Comparison of the Fermentation in heifers, sheep, ponies and rabbits. *J. Animal Sci.* 58:213

Van Keuren, R. W. and W. W. Heinemann, 1962. Study of a nylon bag technique for in vivo stimulation of forage digestibility. *J. Anim. Sci.* 14:111-117.

Van Milgen, J., M.L. Roach, L. L. Berger, M. R. Murphy, D. B. Moore, 1992. Technical note: Mineral deposits on Dacron bags during ruminal incubation. *J. Animal Sci.* 70:2551-2555.

Van Soest, P.J., R.H. Wine, and L.A. Moore, 1966. Estimation of the true digestibility of forages by the in vitro digestion of cell walls. Proceedings of , The Xth International Grassland Congress, Helsinki. Finish Grassland Association. pp 438-441

Van Soest, P. J., 1983. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. 1ed. Corvallis, Oregon, EE.UU. O & B Books. P 374.

Van Soest, P. J., 1994. Nutritional Ecology of the Ruminants. 2a Ed. Comstock, Cornell University Press Ithaca. New York.

Vogel, K. P., J.F. Pedersen, S.D. Masterson, J.J. and Toy, 1999. Evaluation of a filter bag system for NDF, ADF, and IVDMD forage analysis. Crop Science, 39: 276-279

Wanderley, R. C., J. T. Huber, Z. Wu. M. Pessarakli y C. Fuentes Jr. 1993. Influence of microbial colonization of feed particles on degradation of nitrogen degradability by in situ incubation. J. Animal Sci. 71:3073-3077.

Weacley, D. C., M. D. Stern y L. D. Satter, 1983. Factors affecting disappearance of feedstuffs from bags suspended in the rumen. J. Anim. Sci. 56:493.

Weatherburn M. W. 1967. Phenol–hypochlorite reaction for determination of ammonia Analytical Chemistry 39, 971–974.

Wilman, D. and A. Adesogan, 2000. A comparison of filter bag methods with conventional tube methods of determining the in vitro digestibility of forages. Animal Feed Science and Technology, 84: 33-47.

APENDICE

A 1. Digestibilidad in vitro de la materia seca de alfalfa

ANVA

FV	GL	SC	CM	F	F.01	P>F
TRATAMIENTOS	7	5263.949	751.9932	180.108	4.28	0.000
ERROR	14	58.453	4.175			
TOTAL	21	5322.402				

C. V. = 4.48 %

COMPARACION DE MEDIAS

TRATAMIENTO	MEDIA	.01
6	61.375	A
7	60.769	A B
5	58.099	A BC
8	55.168	BC
4	54.218	C
3	35.989	D
2	25.484	E
1	21.855	E

A 2. Digestibilidad in situ de la materia seca de alfalfa

ANVA

FV	GL	SC	CM	F	F.01	P>F
TRATAMIENTOS	7	5149.141	735.591	295.556	4.28	0.000
ERROR	14	34.844	2.489			
TOTAL	21	5183.984				

C. V.= 2.49%

COMPARACION DE MEDIAS

TRATAMIENTO	MEDIA	.01
6	75.995	A
8	75.768	A
7	75.496	A
5	74.753	A
4	70.050	B
3	56.845	C
2	44.649	D
1	35.868	E

A 3. Coeficiente de Correlación entre Tiempo, DIV y DIS de la materia seca de alfalfa.

Tiempo	DIV	DIS
X1	X3	X2
0	21.855	35.868
3	25.484	44.649
6	35.989	56.845
12	54.218	70.050
24	58.099	74.753
48	61.375	75.995
72	60.769	75.496
96	55.679	75.768

r (horas exposición digestibilidad in vitro) = 0.6842 NS

r (horas exposición digestibilidad in situ) = 0.7125*

r (digestibilidad in vitro digestibilidad in situ) = 0.9854**

Coeficiente de correlación

GL (N-2)	.01
6	0.834

A 4. Coeficiente de Regresión entre DIV y DIS de la materia seca de alfalfa.

Vector de coeficiente de regresión

B0 18.621
B1 0.966

Análisis de varianza

FV	GL	SC	CM	F	F.01	P>F
REGRESION	1	1731.345	1731.345	201.151	13.75	0.000
ERROR	6	51.643	8.607			
TOTAL	7	1782.989				
Coefficiente de determinación = 0.971						

Valores de t calculada y niveles de significancia observados.

Coeficiente	Tc	T.01	P
B0	5.572	3.707	0.001
B1	14.183	3.707	0.000

A 5. Coeficiente de Regresión entre TIEMPO y DIS

Vector de coeficiente de regresión

B0 53.305
B1 0.318

Análisis de varianza

FV	GL	SC	CM	F	F .01	P>F
REGRESION	1	905.196	905.196	6.187	13.75	0.046
ERROR	6	877.792	146.299			
TOTAL	7	1782.989				
Coefficiente de determinación = 0.508						

Valores de t calculada y niveles de significancia observados.

Coeficiente	Tc	T.01	P
B0	8.924	3.707	0.000
B1	2.487	3.707	0.046

A 6. Coeficiente de Regresión entre TIEMPO y DIV de la materia seca de alfalfa

Vector de coeficiente de regresión

B0 36.464
B1 0.311

Análisis de varianza

FV	GL	SC	CM	F	F .01	P>F
REGRESION	1	867.581	867.581	5.28	13.75	0.06
ERROR	6	985.942	164.324			
TOTAL	7	1853.523				

Coeficiente de determinación = 0.468

Valores de t calculada y niveles de significancia observados.

Coeficiente	Tc	T .05	P
B0	5.76	3.707	0.001
B1	2.298	3.707	0.06