

ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS METODOS “IN VIVO” E “IN VITRO” EN PRUEBAS DE DIGESTIBILIDAD EN BOVINOS*

GUILLERMO HENAO M. **

ROBERTO FAJARDO V. ***

PANDURANG DESPHANDE ****

INTRODUCCION:

El propósito del nutricionista, cuya meta final es la mejora de la producción animal, radica en la determinación de la calidad del forraje, expresada en forma de su *digestibilidad*, es decir, en términos de aquella porción del alimento que el animal es capaz de absorber y utilizar para el desarrollo de su cuerpo. Obviamente, la mejor manera de hacerlo, es usar el propio animal para lo que se conoce como “Prueba de digestibilidad” No obstante su alto costo y excesiva duración, durante muchos años los nutricionistas se sirvieron de tal método. El perfeccionamiento de una técnica de laboratorio mucho más simple, ha sido por algún tiempo el objetivo del nutricionista animal; a este respecto, se han propuesto y llevado a la práctica varios métodos con resultados variables.

El conocido como “método del rumen artificial” o “técnica in vitro”, a pesar de que tiene sus limitaciones y defectos, se ha venido usando por lo rápido y barato, en lugar de las pruebas convencionales.

Dicha técnica es particularmente valiosa en nuestro país. Si se usa un procedimiento “in vitro” adecuadamente modificado y adaptado, puede establecerse una buena correlación entre los resultados obtenidos con este método y los logrados con la “prueba in vitro” El método “in vitro”, más económico, puede aplicarse para escoger en poco tiempo varias muestras de forrajes, los resultados obtenidos con forrajes que muestren ser valiosos o de buena calidad, pueden a continuación confirmarse mediante pruebas de ceba.

El objeto del presente estudio, es por lo tanto investigar la extensión de la correspondencia entre los dos métodos bajo las condiciones existentes en nuestro medio, con el empleo de una muestra de ensilaje de uso común entre nosotros. Por simplicidad, se ha determinado la digestibilidad de la materia orgánica total.

* Trabajo dirigido presentado como requisito parcial para optar al título de Zootecnista.

** Zootecnista.

*** Zootecnista.

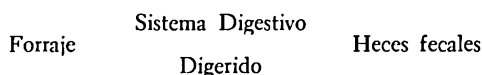
**** Experto de la FAO.

1. REVISION DE LITERATURA

Digestibilidad. Entiéndese por digestibilidad el estudio mediante el cual establecemos la proporción en que un alimento es utilizado o digerido por el organismo animal (1).

El término digestibilidad es normalmente tomado para indicar que los nutrientes o sustancias afines son absorbidos por el tracto digestivo, una vez que han sido atacados por algunas enzimas digestivas o desintegrados por la microflora. Es importante antes de iniciar cualquier estudio sobre la digestibilidad tener claro los conceptos de digestibilidad aparente y digestibilidad real o verdadera. Se considera como digestibilidad aparente la fracción del forraje que desaparece como resultado de su procesamiento en el sistema gastro-intestinal y por lo tanto es la fracción que es aparentemente digerida o absorbida porque no aparece en las heces fecales (2).

El diagrama número 1 muestra este proceso.



Cuando esta fracción no recuperada se expresa como porcentaje de la ingesta, recibe el nombre de coeficiente de digestibilidad.

La digestibilidad real es aquella en la cual se tienen en cuenta algunas sustancias como células de descamación, enzimas, bacterias del tracto digestivo y otros

productos que son agregados al material fecal (3).

La digestibilidad real nos da un índice más exacto de la cantidad de alimento digerido por un animal, pero, los sistemas para encontrarlo son más dispendiosos. Los métodos para hallar la digestibilidad, se pueden llevar a cabo "in vitro" e "in vivo" Para una mejor comprensión las estudiaremos por separado.

1.2. METODOS IN VIVO

Es necesario hacer una diferenciación clara y concisa de los métodos IN VIVO para hallar la digestibilidad. Existen técnicas para encontrar la digestibilidad aparente y la real o verdadera.

1.2.1. Determinación de Digestibilidad Aparente.

Para determinarla se utilizan: Métodos Directos e Indirectos.

1.2.2. Métodos Directos.

El más usado en la determinación de la digestibilidad de los nutrientes en los rumiantes es el de la colección total de heces. Consiste en recobrar los residuos de alimento que el animal excreta. Este residuo se sustrae del alimento consumido por el animal, obteniendo así la digestibilidad del alimento.

Para determinar los nutrientes presentes tanto en la ingesta como en las heces, éstas se someten a análisis químicos en el laboratorio (4). La digestibilidad estaría dada por la fórmula:

$$\% \text{ Digestibilidad} = \frac{\text{M. Seca consumida} - \text{M. Seca excretada}}{\text{M. Seca consumida}} \times 100 \quad (5)$$

Para efectuar la colección total de heces los animales pueden estar en confinamiento en cajas o jaulas de digestibilidad o en libre pastoreo utilizando arneses especiales.

Factores y condiciones que se deben observar para la aplicación con éxito de estos métodos:

1. Al diseñar las cajas de digestibilidad se deben tener en cuenta la edad, la espe-

cie y el sexo del animal. Las condiciones de comodidad que pueden tener los animales son básicas para el buen desarrollo del experimento (6). (Horn, L. B.; Ray, H. P. and Newman, L. B.).

2. Debe haber un período preliminar en el cual se suministra el alimento o los nutrientes en estudio. Durante este tiempo el animal debe excretar la totalidad del alimento que consumió antes del estudio (Blaxter, K. L.; Grahman, N. C. and Wainman, F. W. 1956). El período frecuentemente usado para rumiantes es de 10 días (8). En este lapso se calcula la cantidad de alimento consumido en 24 horas.

3. En cuanto a la colección de heces, éstas se deben coleccionar en su totalidad, evitando siempre que vayan acompañadas de sustancias extrañas (9). El diseño de las cajas de digestibilidad debe ser tal que la colección sea una operación que se facilite al máximo (10).

Ray et al. en 1964 (11), estudiaron la relativa eficiencia de períodos de colección de 5, 7 y 10 días en ensayos de digestión con 21 días preliminares. Usaron terneros Hereford y no encontraron diferencias significativas en los coeficientes de digestibilidad. Algunos experimentadores recomiendan no extender el período de colección por más de 15 días (12).

El suministro debe ser a horas fijas y varias veces al día (14).

5. La edad debe estar comprendida entre 18 y 24 meses para bovinos y entre 12 y 18 meses para ovinos (15).

6. Se acostumbra utilizar 3 o 4 ovinos y de 2 a 4 bovinos para este tipo de experimentos (16).

7 No se han encontrado diferencias ni tendencias marcadas hacia la utilización de una raza en especial (17).

8. Todos los investigadores concuerdan en el uso de animales en buen estado de salud. Se deben evitar los problemas de parasitismo (18).

1.2.3. Métodos indirectos.

Se basan en el uso de "indicadores" o "marcadores", que son sustancias fisiológicamente inertes y que no son absorbidos en el tracto digestivo (19).

Existen dos tipos, marcadores internos como la lignina, los cromógenos y el nitrógeno; y los externos que son el polietilenglicol y la sílica (20).

Se han realizado estudios comparativos, entre los métodos para encontrar la digestibilidad aparente, encontrándose que no hay una variación significativa entre ellas (21). Por lo tanto hay una alta correlación entre los métodos directos e indirectos.

Como los métodos descritos solo nos dan una idea acerca de la digestibilidad aparente, se han desarrollado recientemente técnicas con las que se obtienen informaciones acerca de la digestibilidad real. Sin embargo, son métodos complicados y dispendiosos como veremos más adelante.

1.2.4. Determinación de digestibilidad verdadera.

Su objetivo es reconocer qué clase de los nutrientes presentes en las heces son producto de la digestión del alimento (22). El método más utilizado es el aplicado a la digestibilidad de proteína y grasa; en un primer paso se calcula la digestibilidad "aparente" de la proteína y de la grasa de un alimento conocido. Posteriormente se suministra al animal una dieta libre de proteínas y/o grasas y por análisis se determina qué cantidades de éstas hay en las heces. Estas cantidades son sustraídas de los pesos de grasas o

proteínas de la dieta normal que consumieron los animales (23).

WIDDOWSON et al. en 1954 (24) encontraron que el inconveniente de este método es la falta de rapidez en las raciones que no contengan grasa o proteína. Esto fue ratificado por Castle et al. en 1957 (25) quién además reportó la resistencia de los animales al consumo de las dietas.

1.3. METODOS IN VITRO

La experimentación "in vitro" puede llevarse a cabo por diferentes métodos. Básicamente lo que pretende es simular las condiciones y medios del tracto digestivo de un poligástrico en un laboratorio. Esto implica por lo tanto tener un conocimiento amplio de la anatomía y la fisiología del aparato digestivo de los bovinos; como de los procesos y cambios físicos y químicos que sufren los alimentos durante la digestión.

1.3.1 Técnica del rumen artificial para el estudio de la digestión del rumen IN VIVO.

Se han diseñado algunos tipos de rumen artificial para el estudio de los nutrientes en vivo. Uno de los primeros tipos fue propuesto por Louw et al. 1949 (26). Posteriormente Huhtanen and Gall en 1952 (27) desarrollaron un rumen artificial en miniatura en el cual según autores las principales ventajas son la economía y facilidad de trabajo; sin embargo los resultados no fueron satisfactorios. Werner en 1953 (28) perfeccionó los anteriores métodos e ideó una nueva técnica del rumen artificial IN VIVO. Este, consiste en un tubo de ensayo de porcelana equipado con tubos que permitan el escape de gases resultantes de la fermentación microbiana.

Se coloca en el tubo de ensayo de porcelana 35 cc. de fluido del rumen al cual se hace pasar gas, luego se añaden 5 gramos de la muestra que se quiere investigar. Hecho lo anterior se coloca este "Rumen" dentro del verdadero por un período de 10 días y un tubo de ensayo sin muestra que se considera como blanco. Al final del período la digestibilidad se calcula por diferencias.

1.3.2. Uso de sacos o bolsas semipermeables o de diálisis.

El método que fue desarrollado inicialmente por Louw et al. 1949 (29) en estudios de utilización de celulosa, que involucraban el uso de fluido del rumen, solución mineral y un substrato. El contenido del saco semipermeable se suspendía en un baño de agua que contenía la solución mineral a la que previamente se había ajustado el pH; a continuación se hacía pasar N_2 y CO_2 al 5% y se mantenía a la temperatura de 39° C por 24 horas.

Recientemente se ha hecho énfasis en el uso de bolsas semipermeables que simulan las condiciones del rumen "in vivo"

Los principios del experimento son los mismos de Louw et al. en cuanto a duración, temperatura, pH, medio ambiente. Lo único que varía son los implementos con los que se realiza.

El método es adaptado de la técnica de digestibilidad "in vitro" descrito por Dobrinka y Havsløvs Sørensen 1964 (30). Basado en el principio de Davey y Cols 1960 (31) que establece que el proceso de digestibilidad en los rumiantes se lleva en dos etapas.

El forraje es digerido primero con microorganismos anaerobios tomados del rumen de una vaca normal y luego con la pepsina propuesta por Telly and Terry 1961 (32).

1.3.3. Uso de rumen artificial impermeable.

Como su nombre lo indica se utilizan recipientes de material impermeable. En un principio se empleó sobremanera el vidrio; en la actualidad se tiende a usar recipientes de polipropileno "Nalgene" y otros materiales sintéticos. En dicho recipiente debe haber una solución de minerales de composición similar a la de la saliva, una alícuota de licor del rumen, algunos nutrientes y una muestra del alimento en estudio. El recipiente es mantenido entre 39 y 40° C de temperatura

y el medio completamente anaerobio, el pH entre 6.5 y 6.9; en caso de presentarse alteraciones se normaliza con una solución molar de Na_2CO_3 .

Varias fórmulas para las mezclas minerales han sido propuestas:

1. La de Louw et al. 1949 (33) que consiste en 700 ml. de "licor" del rumen; 1.5 ml. Molar₁ — NH_2PO_4 ; 7.5 ml. 2 Molar $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 7.5 ml. Molar Mg SO_4 y 7.5 ml.; 0.5 Molar- CaCl_2 .

2. La fórmula de Burroughs et al. 1950 (34) es como sigue:

Na_2HPO_4	12 H_2O	52.50 gm.	NaHCO_3	52.50 gm.
KCl		7.50 "	NaCl	7.50 "
CaCl_2	6 H_2O	.75	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.25
FeSO_4	7 H_2O	.15	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.08
ZnSO_4	7 H_2O	.08	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.04
CoCl_2	6 H_2O	.02	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	37.50

Estas sales se diluyen en 2 litros de agua. La mezcla del rumen quedaría así: 100 ml. de esta solución, 100 ml. de licor del rumen filtrado y 450 ml. de agua.

NaHCO_3	9.8 gm.	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	9.30 gm.
KCl	.57 "	NaCl	.47 "
CaCl_2	.04	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.12

Los primeros aparatos usados en este tipo de experimentos eran complicados. El sistema constaba de un balón de Buchner de 150 ml. con tubos de entrada y salida de gas, además de otros dispositivos que contenían solución molar de Na_2CO_3 para regular el pH y embudo de muestreo.

En estos "rúmenes" se depositan 40 ml. de solución mineral o saliva artificial, 5 ml. de substratos en solución al 10% y 5 ml. de "licor" del rumen. Uno de los trabajos más importante realizados en este

3. La saliva artificial de McDougall 1948 (35) contiene por litro de agua destilada las siguientes sales:

sistema fue el de Elsdén 1945-1946 (36) quien estudió la formación de ácidos grasos en varias muestras. Posteriormente, los investigadores se dedicaron a simplificar los métodos y crear nuevas técnicas que facilitaron los estudios de forrajes en "Rúmenes" artificiales.

Sobresalen los estudios de Telly and Terry (37) quienes standardizaron el método de la digestibilidad "in vitro" en dos etapas. Se utilizan tubos de vidrio de 80 a 90 ml. dentro de los cuales se colocan 5 gm. de muestra, 10 de licor del rumen

y 40 ml. de solución Buffer. El licor del rumen ha sido filtrado previamente a través de dos capas de popelinas y mantenido en condiciones anaerobias.

La solución Buffer mantiene adecuadamente los microorganismos y junto con algunos elementos como el ácido Valérico y los de minerales traza favorecen el crecimiento de la población bacteriana (38).

Se hace pasar CO₂ a través de la solución y se sella el tubo con un tapón de caucho provisto de una válvula Bunsen.

Estos tubos se incuban a 38° C y se deben agitar periódicamente. Después de 48 horas de digestión Microbial es detenida mediante la adición de 1 ml. de una solución al 5% de cloruro de Mercurio, luego los tubos se centrifugan a 1.500 rpm por 15 minutos; el sobrenadante se desprecia. Se agrega enseguida 50 ml. de pepsina clorhídrica a cada tubo y de nuevo se incuba en el baño de agua a 38° C, durante 48 horas. No son necesarias las condiciones anaeróbicas. Al terminar esta segunda etapa, se centrifuga y se lava el residuo del tubo con agua destilada, en un vaso de precipitación tarado previamente. Este se lleva a la estufa a 92° C y después de 24 horas se halla la digestibilidad por diferencia (39).

Se usaron 146 muestras de pasto de diferente tipo a los que se les conocía la digestibilidad "in vivo", se encontró que la ecuación de regresión era:

$$y = 99x - 1.01 \quad (S. E. \pm 2.31)$$

Donde (y) es la digestibilidad "in vivo" y (X) es la digestibilidad de materia orgánica "in vitro".

Posteriormente C. E. Harris en 1963 (41), comparó la digestibilidad "in vivo" con la digestibilidad "in vitro" obtenida esta última en dos laboratorios diferentes. Los resultados se resumen así:

Estudios recientes realizados por R. L. Reid, B. Clark and G. A. Jung en 1964 (42) con pasto Sudán, en los que se utilizaron los métodos "in vivo" e "in vitro", pusieron de manifiesto la alta correlación existente entre los métodos.

Busy Sanz en la Estanzuela, Uruguay en 1967 (43) realizó estudios comparativos de diferentes raciones, valiéndose del método "in vivo" de la colección total de heces y del de las "dos etapas" in vitro.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. DETERMINACION IN VIVO

El método utilizado fue el de la colección total de heces. El experimento fue iniciado el 26 de enero y se terminó el 23 de febrero.

2.1.2. Procedimiento.

El procedimiento empleado para llevar a cabo el experimento se describe así:

1. Período preliminar: Se efectuó en un período de 21 días durante el cual se corrigieron los defectos de fabricación en las cajas de digestibilidad; se acostumbró a los animales a permanecer sosegadamente en jaulas, para eliminar las variaciones debidas al "stress"; se determinó la cantidad aproximada de alimento consumido en 24 horas y el horario más apropiado para este suministro, así como para la colección de heces. Además se limpió el tracto digestivo de nutrientes diferentes al material usado en el experimento. En este período se efectuaron colecciones de heces tres veces al día para determinar porcentajes de humedad, hasta obtener un dato standar para 24 horas.

2. Suministros de alimento y agua. El ensilaje se ofrecía tres veces al día a las 7 a. m. y a las 12 m y a las 5:30 p. m.

Previo el suministro de alimento se recogían y pesaban los sobrenadantes que luego eran analizados en el laboratorio. El agua se suministraba después de recoger el alimento sobrante y antes de ofrecer el nuevo alimento su consumo era ad libitum.

3. Colección de heces. Este período duró 7 días; las heces se recogían tres veces al día y eran almacenadas en bolsas plásticas que garantizaban una humedad constante. Cumplido un período de 24 horas se pesaban las bolsas con las heces y se tomaba una muestra para análisis.

4. Análisis de laboratorio. Del alimento ofrecido y rechazado se tomaban muestras al azar, que eran llevadas al laboratorio en cajas de Petri cerradas. Para los análisis de humedad se pesaba una cantidad que variaba entre 25 y 30 gramos, se colocaba ésto en una caja metálica y se llevaban a la estufa por 24 horas a 92° C. Al término de éstas se determinaba los porcentajes de humedad por diferencia. La materia seca se guardaba para determinación de cenizas. Para este análisis se tomaba una muestra entre 2 y 3 gramos, se colocaba en un crisol y se llevaba a la mufla de 20 a 30 minutos a 550-600° C. El porcentaje de cenizas se determinaba por diferencias de pesos. En cuanto a las heces, se les aplicaba los mismos análisis de laboratorio en idéntica forma. Toda muestra tanto de heces como de alimento se buscaba que fuera lo más representativa posible y tenía su respectiva replicación.

2.1.2. Materiales.

Citamos a continuación la lista de materiales empleados para realizar el experimento IN VIVO.

1. Cajas de digestibilidad. Fueron construidas en base al plano de Horn, Ray y Neumann (7) J. Animal Sc. 13, 20-34,

1954, sin embargo fue necesario hacer algunas reformas, primero porque los operarios que las construyeron no interpretaron a cabalidad los planos y segundo por fallas de diseño en las cajas. Transcribimos a continuación los principales cambios y explicaremos el porqué de ellos.

1.1. Las cajas de colección de heces eran en un solo cuerpo, hubo necesidad de hacer cajas individuales que facilitaron la colección y se pudieron adaptar al tamaño del animal.

1.2. Para obviar que los animales se salieran de las cajas se utilizaban cadenas que iban en la parte posterior de la caja, evitando así que el animal sacase el tren posterior de ésta. Se presentaron problemas debido a que en las cadenas quedaban heces y muchas veces dificultaba el que éstas cayeran dentro de las cajas. Se solucionó este problema adaptando las cajas al tamaño de cada animal, de tal manera que los talones del tren posterior quedaran en contacto con un barrote de madera que separaba el piso de la jaula y las heces caían directamente en las cajas.

1.3. Para la eliminación de la orina, se aconsejaba el uso de un arnés especial el que la llevaba a través de un orificio en el piso de la jaula. Se presentó el inconveniente de que los animales pisaban las mangueras y dañaban con facilidad los arneses; además esta orina iba a alterar las heces. Se solucionó de la manera más favorable el problema abriendo orificios de 3 cms. de diámetro en el piso de la jaula.

1.4. Para mantener el animal en la posición correcta se colocaron collares.

1.5. Las cajas de heces y alimento fueron recubiertas con plástico, para facilitar la colección de heces y de sobrenadantes de alimento. Garantizando así que no habían variaciones en la humedad.

Estas cajas fueron fabricadas en madera y colocadas bajo techo. Se buscó un lugar de fácil acceso y cercano al sitio del almacenamiento de ensilaje y de toma de agua.

2. Forrajes. Se utilizó ensilaje de avena. El resultado del análisis fue similar y realizado en diferentes laboratorios. Es-

te ensilaje no contenía ningún tipo de aditivo y fue bastante bien aceptado por los animales.

3. Tipo de animal. Fueron usados para el experimento 2 animales castrados de raza Rojo Danés de 18 meses de edad. Sus pesos fueron:

	Peso inicial Kgrs.	Peso final Kgrs.
Animal Nº 1	245	251
Animal Nº 2	261	268

Al iniciar y al terminar el experimento los animales se encontraron en perfecto estado de salud.

TABLA 1. COMPOSICION QUIMICA DEL ENSILAJE UTILIZADO PARA LA INVESTIGACION "IN VITRO"

Humedad	Proteínas	Grasa	Cenizas	Fibra	E N N
%	%	%	%	%	%
74.50	9.51	3.03	7.30	35.00	45.16

2.2. DETERMINACION IN VITRO

2.2.1. Método utilizado.

Se empleó el método de Telly and Terry, adaptado por M. J. Wurster and L. D. Kamstra para el uso de la Universidad estatal de South Dakota en los Estados Unidos. Consta de dos etapas: en una primera la muestra seca de forrajes es colocada en un tubo de ensayo con una solución Buffer y licor de rumen. Este "licor" no es más que microorganismos que se han obtenido de la panza de un animal previamente fistulado. Esta primera etapa es anaerobia y dura 48 horas. La segunda etapa es aerobia; en ésta se supone que la muestra sufre un "ataque" por las enzimas y jugos del abomaso o cuajar. Para ello se prepara una solución de pepsina clorhí-

drica la cual se mezcla con la muestra y se deja durante 48 horas. Al término de este período la muestra o residuo que queda se considera como la parte del alimento que se excreta, por el animal. Este sobrenadante se lleva a la estufa y posteriormente, por diferencia de pesos, se calcula la digestibilidad.

Con más detalles enumeraremos los pasos necesarios para llevar a cabo cada una de las etapas:

2.2.2. Primera etapa.

1. Pesar 5 grs. de forraje e introducirlos en tubos de "Nalgene" de 100 ml. Si las muestras pesadas no se van a trabajar inmediatamente es conveniente tapar los tubos de ensayo.

- .2. El día que se empieza la experiencia, poner a funcionar varias horas antes el baño de agua (baño de María), para regular su temperatura en 39° C.
 - .3. Cuando la temperatura ha sido ajustada correctamente, quitar los tapones de los tubos de ensayo y agregar 25 ml. de solución McDougall.
 - .4. Cuando todos los tubos han sido llenados, colocarlos en el baño de agua, pasar burbujas de CO₂ y taparlos nuevamente.
 - .5. Obtener flúido de rumen de un animal fistulado. Procurar hacerlo con un ayuno mínimo de 3 horas.
 - .6. A medida que se colecta el flúido de rumen se va pasando a través de un filtro de tela (popelina); se deposita en un termo previamente calentado.
 7. Transportar el flúido lo más rápido al laboratorio para evitar que se enfríe.
 - .8. Ya en el laboratorio, se saca del termo, se filtra nuevamente y se recoge en un Erlenmeyer a 39° C. Pasar CO₂ para mantener el medio anaerobio.
 9. Mezclar flúido de rumen con la solución McDougall en la proporción siguiente: 15 cc. de sol. McDougall por 10 cc. de flúido del rumen. En lo posible hacerlo con un agitador magnético que además de regular la temperatura agita constantemente la solución.
 - .10. De la mezcla anterior agregar 25 cc. a cada tubo.
 - .11. Después de la adición, tapar los tubos con tapones de caucho provistos de válvulas Bunsen para el escape de gases y tubos de entrega de gas.
 - .12. Es importante que los tubos queden bien sellados; para ellos se ajustan los tapones y se pone una banda de esparadrapo alrededor del tubo.
 - .13. Pasar CO₂ a través de los tubos. Hacerlo cuidadosamente para que las burbujas producidas no dañen la muestra en las paredes del tubo.
 - .14. Pasar CO₂ cada 3 o 4 horas para que haya una buena mezcla de la muestra con la solución y para asegurar la anaerobiosis durante el proceso.
 - .15. Después de 48 horas quitar los tapones a los tubos.
 16. Dejar por lo menos una hora, antes de centrifugar.
 - .17. El mismo procedimiento se le aplica a los tubos de control (blancos) en los cuales no se ha depositado muestra. Su objeto es determinar la cantidad de sólidos totales que aportan los reactivos.
 - .18. Lavar las paredes de los tubos con agua destilada, con la ayuda de una varita de caucho.
 - .19. Centrifugar durante 10 minutos por 2.500 rpm.
 - .20. Drenar y desechar el sobrenadante. Sigue a continuación la digestión de pepsina.
- 2.2.3. Segunda etapa.
- .1. Después de la fermentación bacteriana la etapa de la pepsina puede ser iniciada y los tubos se pueden refrigerar según la conveniencia.
 - .2. Agregar 50 ml. de solución de pepsina a cada tubo inclusive a los blancos, controlando que el residuo de la fermentación sea suspendido en la pepsina.

- .3. Incubar a 39° C por 48 horas en el baño de agua. No es necesario que el medio sea anaerobio.
 - .4. Cumplidas las 48 horas, centrifugar y drenar lo que sobrenada como se ha dicho antes.
 - .5. El residuo que queda en el tubo se introduce en un vaso de precipitación tarado previamente; se deben lavar con agua destilada y limpiar las paredes de cada tubo.
 - .6. Los vasos de precipitación se llevan a la estufa por 24 horas a 92° C.
 7. Pesar los vasos de precipitación una hora después de sacados del horno.
 - .8. Con estos pasos se procede posteriormente al cálculo de la digestibilidad.
- 2.2.4. Preparación de soluciones.
- .1. Solución McDougall o "saliva artificial"

	Gramos/litro (1)	Gramos/litro (5)
NaHCO ₃	9.80	49.00
Na ₂ HPO ₄ . 12H ₂ O	9.30	46.50
KCl	.57	2.85
NaCl	.47	2.35
MgCL ₂ anhidro	.06	.30
CaCl ₂ anhidro	.04	.20

El CaCl₂ se agrega al final. Posteriormente se pasan burbujas hasta que la solución esté clara y se ajuste el pH entre 6.9-7.0.

- .2. Solución de pepsina. Se disuelven 2 grs. de pepsina en 850 ml. de agua destilada. Agregar KCl concentrado al 36% o 1.7 N y completar hasta un litro de volumen. El pH final de la solución debe quedar entre 1.7-2.0.

2.2.5. Materiales.

- .1. Baño de agua (baño de María) en el que se pueda regular la temperatura.
- .2. Cilindro de CO₂ con su manómetro respectivo.
- .3. Tubos de ensayo de Nalgene de 100 ml. Provistos de tapones de caucho con válvulas Bunsen.

- .4. Agitador magnético para preparar las soluciones.
5. Implementos de laboratorio como son: termos, aspiradores, termómetros, estufas, pipetas, balanzas analíticas, buretas, etc.

3. RESULTADOS Y ANALISIS

3.1. DIGESTIBILIDAD IN VIVO.

Para determinar el porcentaje de digestibilidad se procedió así:

- .1. Se determinó la cantidad total del alimento consumido en cada período. Se consideraron 7 períodos, cada uno de 24 horas.
- .2. A este alimento se le determinó el porcentaje de humedad y por diferencia se halló el porcentaje de materia seca. Ya con este dato pudimos calcular la cantidad de materia seca consumida por animal por período.

3. Las heces se recogían y se pesaban para los mismos períodos. Se les sometía a los mismos análisis del alimento, encontrando de esta manera la materia seca excretada.

4. Conociendo la cantidad de materia seca consumida y excretada por animal por período, se procedió a aplicar la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Digestibilidad} = \frac{\text{M. seca consumida} - \text{M. seca excretada} \times 100}{\text{M. seca consumida}}$$

3.2. DIGESTIBILIDAD IN VITRO.

Explicaremos en forma esquemática el procedimiento para calcular el porcentaje de digestibilidad.

A = Peso de muestra inicial. En nuestro caso fue .5 grs.

B = Peso de vaso de precipitación vacío.

C = Peso final de vaso de precipitación más muestra

D = Residuo de digestión = C - B.

E = Peso de sólidos totales de reactivos o "blancos" Tomamos como base .0171 grs., que fue el valor promedio de todas las las observaciones hechas.

F = Residuo REAL de digestión = D - E.

G = Porción absorbida = A - F.

$$\% \text{ digestibilidad} = \frac{G}{A} \times 100$$

La tabla 4 nos indica los valores encontrados. La muestra de ensilaje de avena utilizada en este experimento fue previamente secada y molida. Posteriormente se dividió en dos porciones que aparecen en la tabla.

3.3. ANALISIS DE RESULTADOS IN VIVO.

1. Coeficiente de variación de resultados en cada animal.

% Digestibilidad total Animal N° 1	% Digestibilidad total Animal N° 2
54.73	54.35
53.54	54.00
52.68	55.52
53.10	53.05
52.82	53.48
54.39	54.27
51.30	53.81

$$S^2 = \frac{\sum X^2}{n - 1} = \frac{7.89}{6} = 1.31$$

$$S = \sqrt{1.31} = 1.14$$

$$C.V. = \frac{S}{\bar{X}} = \frac{1.14}{53.22} = 2.1\%$$

$$S^2 = \frac{\sum X^2}{n - 1} = \frac{3.67}{6} = .61$$

$$S = \sqrt{.61} = .78$$

$$C.V. = \frac{S}{\bar{X}} = \frac{.78}{54.07} = 1.4\%$$

Estos bajos coeficientes de variación indican la homogeneidad de los resultados entre animales.

.2. Prueba de homogeneidad de los muestreos.

Períodos	I	II	III	IV	V	VI	VII	
Animal 1	54.73	53.54	52.68	53.10	52.82	54.39	51.30	
Animal 2	54.35	54.00	55.52	53.05	55.48	54.27	53.81	
d	.38	.46	2.84	.05	.66	.02	2.51	6.92

$$H_o = M_o = 0$$

$$H_a = M_b > 0$$

$$S_d^{-2} = \frac{\sum d}{n} = \frac{6.92}{7} = .98$$

$$S_d = \sqrt{.98} = .99$$

$$t = \frac{S_d^{-2} - 0}{S_d} = \frac{.98 - 0}{.99} = .989$$

$$G \text{ de } L = 6$$

MUESTRA NUMERO 1

$$S^2 = \frac{\sum X^2}{n-1} = \frac{21.6376}{15} = 1.44$$

$$S = \sqrt{1.44} = 1.20$$

$$C.V. = \frac{S}{\bar{X}} = \frac{1.20}{51.30} = 2.33\%$$

Los coeficientes de variación son bajos, indican por lo tanto, homogeneidad de los resultados entre mues-

La probabilidad de encontrar un valor mayor en este muestreo con $M_o = 0$ es $< .4$. Luego no se puede rechazar la hipótesis nula y se considera el muestreo homogéneo.

3.4. ANALISIS DE RESULTADOS IN VITRO.

.1. Coeficientes de variación de resultados en cada muestreo.

$$S^2 = \frac{\sum X^2}{n-1} = \frac{6.0021}{15} = .40$$

$$S = \sqrt{1.40} = .632$$

$$C.V. = \frac{S}{\bar{X}} = \frac{.632}{52.29} = 1.20\%$$

tras.

.2. Prueba de homogeneidad de los muestreos.

$$H_o = M_o = 0$$

$$H_a \quad M_b < 0$$

$$\sum d = 19.52$$

$$S_d^{-2} = \frac{\sum d}{n} = \frac{19.52}{16} = 1.22$$

$$S_d^{-2} = \sqrt{1.22} = 1.10$$

$$t = \frac{S_d^{-2} - 0}{S_d} = \frac{1.22 - 0}{1.10} = 1.109$$

Grados de libertad = 15

Las tablas de "t", teniendo en cuenta los 15 grados de libertad nos indican que la probabilidad de un valor mayor en este muestreo $M_0 = 0$ es $< .3$. Por lo tanto no se puede rechazar la hipótesis nula y se acepta una alta homogeneidad en el muestreo.

3.5. La ecuación de regresión calculada fue:

$$\hat{Y} = .857x + 9.14$$

donde \hat{Y} = valores de digestibilidad In Vivo.

X = valores de digestibilidad In Vitro.

La regresión de X sobre Y, $b_{xy} = .857$; la regresión de Y sobre X, $b_{yx} = .261$.

La correlación entre valores X y Y calculada fue:

$$r = \sqrt{.261 \times .857}$$

$$r = .72$$

$r = .72$ es significativo aun a niveles de 1% ($P < .01$).

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se efectuó el estudio comparativo de los métodos IN VITRO e IN VIVO, para determinar la digestibilidad. Utilizando el sistema de colección total de heces y de las "Dos etapas" de Telly and Terry, respectivamente.

Se llevó a cabo un período preliminar en el que se consiguió que los animales se habituaran a permanecer en las jaulas y a consumir el alimento. Terminado éste, se empezó el período de experimentación con una duración de 7 días, en el cual, el alimento se suministraba previamente pesado y las heces eran colectadas y pesadas.

La experimentación IN VITRO implicó la realización de dos etapas. En la primera, la muestra de forraje se sometía a una digestión microbiana; y en una segunda era "atacada" por la pepsina. La muestra en estudio era ensilaje de avena.

Las conclusiones obtenidas en el presente trabajo fueron las siguientes:

1. Los coeficientes de variación de resultados en cada animal y en cada muestra nos indican una alta homogeneidad.
2. Se encontró una alta correlación ($r = .72$) entre los métodos IN VITRO e IN VIVO.
3. El método IN VIVO requiere períodos demasiado largos de experimentación.
4. Es además bastante dispendioso en su ejecución y su costo muy elevado.
5. Con el método IN VITRO se pueden realizar estudios de varias muestras a la vez, con la mayor eficiencia a menor costo.

BIBLIOGRAFIA

1. MAYNARD, A. L. y J. K. LOOSLI. 1962. Animal Nutrition. Fifth Edition McGraw-Hill. London p. 112.
2. REID, J. T. 1966. El valor relativo de los resultados agronómicos y con animales en investigaciones sobre posturas. Empleo de los animales en las investigaciones, sobre posturas. Editado por O. Paladines. Montevideo. IICA, Zona Sur, pp. 49-50.
3. ROBAYO, A. 1968. Conferencia sobre digestibilidad, dictada en el curso de Nutrición. Universidad Nacional de Colombia.
4. RAY, M. L., R. D. CHILD and BROWN. 1964. Compositions of length of collection period in digestion Studies. J. Anim. Sci. 23: 889.
5. ABRAMS, J. T. Nutrición Animal y Dietética Veterinaria, traducida de la 4ª edición. Ed. Acribia, Madrid, pp. 8-35.
6. HORN, L. B., RAY, H. P. and NEWMAN, L. B. Digestibility stalls for bovine. J. Anim. Sci. 13, 24.
7. BLAXTER, K. L. GRAHMA, N. C. and WAINMAN, F. W. Duration of periods. Brit. J. Nutri. 1956. 10, 69-91.
8. SCHÜRCH, A. Methods for determination of digestibility coefficients of feeds for ruminants. European Association for Animal Production (EAAP), pp. 11-13.
9. HARRIS, L. E., COOK C. W. and STODDART L. A. 1952. Collection period In Vivo Digestibility. J. Anim. Sci. 11, 181.
10. ALBA, J. Alimentación del ganado en América Latina. 1958. Ed. Fournier, México, pp. 47-68.
11. REID, R. L., G. A. JUNG and S. MURRAY. 1964. The measurement of nutritive quality in a bluegrass pasture using in vivo and in vitro techniques. J. Anim. Sci. 23: 700-710.
12. KANE, E. A. 1953. A comparison of various digestion trial techniques with dairy cattle. J. Dairy Sci. 36: 325-335.
13. BOWDEN, D. M. and D. C. CHURCH. 1962. In Vivo measures of digestibility and chemical components of forages. J. Dairy Sci. 45: 980-985.
14. BARNES, R. F. 1968. Variability with in and among experimental stations in the determination of in vivo digestibility and intake of alfalfa. J. Anim. Sci. 27 (2) 519-524.
15. SUCHURCH, A. 1969. Methods for determination of digestibility coefficient EAAP p. 9.
16. LOOSLI, J. K. 1945. Feeding laboratory animals., Ann. N. Y. Acad. Sci. 46: 45-75.
17. HARRIS, E. C. WAYNE COOK and L. A. STODDART. 1952. Range nutrition techniques. J. Anim. Sci. 11: 181-190.
18. LUCAS, H. L. 1960. Critical features of a good dairy feeding experiment J. Dairy Sci. 43: 193-212.
19. REID J. T. 1950. A new indicator method for the determination of digestibility and consumption forage by ruminants, J. Dairy Sci. 33: 60-71.
20. ELANS, C. S., P. S. REYNOLDS, R. E. DAVIS and D. D. EVERDON. Digestibility studies by means of chromic oxide, lignin and total collection techniques with sheep. J. Anim. Sci. 21: 189.
21. PUTNAM, P. A., J. K. LOOSLI and R. G. WÖRNER. Excretion of chromium oxide by dairy cows, J. Dairy Sci. 41: 1723-1729.
22. CRAMPTON, E. W. 1961. Nutrición Animal aplicada. Ed. Acribia. Zaragoza. pp. 86-100.
23. CRAMPTON, E. W. and RUTHERFORD, D. E. 1954. "Apparent digestibility of Dietary protein as a function of Protein level" J. Nut. V. 54, p. 445.
24. WIDDOWSON, B. L., CIPOLLONI, M. A. 1951. "The significance of the differences in digestibility of feeds by cattle and by sheep" J. Anim. Sci. V 10, p. 337.
25. CASTLE, E. J. and CASTLE, M. E. 1957. Digestible protein, equivalent in total protein. J. Agric. Sci., 49, 106.

26. LOUW, J. G., H. H. WILLIAMS and L. A. MAYNARD. 1949. A new method for the study In Vitro of rumen digestions, *Science* 110: 478.
27. HUIITANEN, C. N. and L. S. GALL. 1952. The miniature artificial rumen and its uses. *J. Ani. Sci.* 11: 766.
28. WERNER, A. C. I. 1956 Criteria for establishing the validity of in vitro studies with rumen microorganisms in so-called artificial rumen systems. *J. Gen. Microbiol.* 14: 733.
29. LOUW, J. G., STODDAR, G. E. JACOBSON, N. L. and ALLEN, R. S. 1949. Study in vitro of rumen digestions. *J. Anim. Sci.* 9: 473.
30. DOBRINKA, D. and S. RENSEN, P. H. 1964. Sterility Research Institute, The Royal Vet. and Agric. College of Denmark, 155.
31. DAVEY, L. A. COLS, G. I. 1960. *J. Agric. Sci.* 55.
- TILLEY, J. M. A., DERIAZ, R. E. and TERRY, R. A. 1961. *Porc. 8th. Intern. Grassl. Congress.* 533.
- BARNETT, A. J. G. and R. L. REID. 1961. Reaction in the rumen. Edward Arnold publishers Ltda. London. P. 41.
34. BURROUGHS, W., ARIAS, C. DE RAÚL, P. GERLAUGH, P. and BETHKE, R. M. 1950. *J. Anim. Sci.* 9, 513.
35. McDougall, E. I. 1948. The artificial saliva *Biochem. J.*, 43, 99.
36. ELSDEN, S. R. 1945-46. The formation of fatty acids from various substrates. *J. exp. Biol.* 22, 51.
37. TILLEY, J. M. A. and R. A. TERRY, 1963. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *J. Britl. Grass. and Sco.* 18: 104-111.
38. VAN DYNE, G. M. and P. T. HUG. 1968. Variables affecting in vitro rumen fermentation studies in forage. Union Carbide Corporation, Nuclear Division, p. 43.
39. ALEXANDER, R. H. Establecimiento de un sistema de digestibilidad in vitro en el laboratorio. Métodos "in vitro" para determinar el valor nutritivo de los forrajes. Editado por O. L. Paladines, Montevideo. IICA. Zona Sur, 1967, pp. 101-145.
40. BARNES, R. F. Use of "in vitro" rumen fermentation techniques for estimating forage digestibility and intake, *Agronomy Journal.* 57 (2): 213-216. 1965.
41. HARRIS, C. E. Comparison of "in vivo" and "in vitro" measurements of the digestibility of fodder crops., *Journal of the British Grassland Society.* 18 (3): 189. 1963.
42. REID, R. L. et al. Studies with Sudragrass. II. Nutritive evaluation by "in vivo" and "in vitro" methods. *Agronomy Journal* 56. (6): 537-541. 1964.
43. BUSY SANZ, A. Estudio comparativo del valor nutritivo de forraje verde, henos, ensilaje y concentrados determinados in vitro e in vivo. Tesis Mag. Sci. La Estanzuela, Uruguay, IICA, Zona Sur, 1967. p. 73.

