



## Comparación de dos técnicas *in vitro* e *in situ* para estimar la digestibilidad verdadera en varios forrajes tropicales<sup>¶</sup>

Revista  
Colombiana de  
Ciencias  
Pecuarias

### Comparison between *in vitro* and *in situ* protocols for estimating true digestibility of several tropical forages

Luis A Giraldo<sup>1\*</sup>, Zoot, MS; Lina A Gutiérrez<sup>2</sup>, Bact; Claudia Rúa<sup>3</sup>, Bact.

<sup>1</sup>Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. Medellín, Colombia.

<sup>2</sup>Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

<sup>3</sup>Institución Universitaria Colegio Mayor de Antioquia, Medellín, Colombia.  
conisilvo@une.net.co

(Recibido: 1 febrero, 2006; aceptado: 25 julio, 2007)

#### Resumen

Los estimados de digestibilidad *in vitro* verdadera de la materia seca se compararon en cuatro forrajes de origen tropical usando el incubador ANKOM Daisy<sup>II</sup> y la técnica *in situ* o de la bolsa de nylon. Hubo diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en la digestibilidad verdadera *in vitro* de la materia seca (DVIVMS) entre los forrajes angleton, kikuyo y San Joaquín. No hubo diferencias significativas entre repeticiones ( $p > 0.05$ ) para los distintos forrajes. La correlación entre la DVIVMS y la degradabilidad verdadera *in situ* de la materia seca (DVISMS), fue significativa y alta ( $p < 0.01$ ,  $R^2 = 0.95$ ) para los cuatro forrajes evaluados. Fue posible predecir la degradabilidad verdadera *in situ* de la materia seca con base en la digestibilidad verdadera *in vitro* de la materia seca mediante la ecuación:  $DVISMS = 6.16 + 0.87 * DVIVMS$  ( $p < 0.01$ ,  $R^2 = 0.95$ ). Los resultados obtenidos, permiten confirmar que la técnica *in vitro* para estimar la digestibilidad verdadera utilizando el incubador Daisy<sup>II</sup> es confiable, rápida, precisa y sencilla, en comparación con el método *in vivo* utilizando la degradabilidad ruminal *in situ* o de la bolsa de nylon.

**Palabras clave:** degradabilidad *in situ*, digestibilidad aparente (DA), digestibilidad *in vitro* (DIV), digestibilidad verdadera (DV), digestor Daisy<sup>II</sup>.

#### Summary

This study was conducted to evaluate the new *in vitro* system, Daisy<sup>II</sup> and to compare its feasibility to determine dry matter (DM) true digestibility in ruminant tropical forages as compared with the *in situ* (nylon bag) technique. Results from the Daisy<sup>II</sup> incubator were compared to those obtained by traditional *in situ* (nylon bag technique) method. Four different forages were tested. Samples from each forage were incubated (*in situ*) in the rumen of two bovines (incubation time: 48 h) or inserted (*in vitro*) into four

¶ Para citar este artículo: Giraldo LA, Gutiérrez LA, Rúa C. Comparación de dos técnicas: *in vitro* e *in situ* para estimar la digestibilidad verdadera en varios forrajes tropicales. Rev Col Cienc Pec 2007; 20: 269-279

\* Autor para el envío de correspondencia: Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. AA.1027 Medellín, Colombia. E-mail: conisilvo@une.net.co

*different digestion jars that were placed into a Daisy<sup>II</sup> incubator for 48h. The variability (coefficient of variation, CV) of the in vitro measurements (among jar repeatability) was low. The Daisy<sup>II</sup> values were significantly higher than the degradability values as measured by the in situ method. When in vitro true dry matter digestibility (IVTDMD) obtained from in situ true dry matter digestibility (ISTDMD) was plotted against the Daisy<sup>II</sup> data, the following linear equation was achieved. The degradability of dry matter obtained in situ (Y, true) and in vitro by Daisy<sup>II</sup> (X, true after 48 h of incubation) were highly correlated ( $p < 0.01$ ) and the regression equation was:  $Y = 6.16 + 0.87 X$ , ( $R^2 = 0.95$ ,  $p < 0.01$ ). The Daisy<sup>II</sup> incubator produces repeatable in vitro the dry matter degradability data which are highly related to those obtainable with the reference in situ procedure.*

**Key words:** *apparent digestibility, incubator Daisy<sup>II</sup>, in situ degradability, in vitro digestibility, true digestibility.*

## Introducción

La calidad nutritiva de los forrajes está en función de la proporción y el nivel de consumo, de la digestibilidad, del contenido de nutrientes y la eficiencia en que estos pueden ser metabolizados y utilizados por los animales (5). Durante el proceso digestivo, una porción de los carbohidratos estructurales pueden ser hidrolizados, fermentados y degradados por microorganismos ruminales, lo que permite al animal aprovechar los productos finales como los ácidos grasos y el amoníaco principalmente, así como una parte de la proteína dietética; además, parte de los microorganismos ruminales son también el origen de proteínas y aminoácidos que son aprovechadas en el tracto digestivo del rumiante como proteína de origen microbiano (21).

Una vez degradados los nutrientes de los forrajes, la digestibilidad hace referencia a la cantidad de alimento que desaparece en el tracto digestivo o en un procedimiento de laboratorio debido a su solubilización o ataque por los microorganismos anaerobios ruminales. La digestibilidad de los forrajes permite estimar la proporción de nutrientes presentes en el alimento, que tienen potencial de ser absorbidos por el tracto digestivo (11). El conocimiento de la degradabilidad, la digestibilidad de los alimentos son fundamentales para establecer su valor nutritivo y por tanto, para la formulación de raciones para rumiantes (7). Aunque las determinaciones de la digestibilidad *in vivo* total, incluyendo la degradabilidad *in situ* o *in vivo* parcial (23), o de la bolsa de nylon son consideradas las más exactas, este es un proceso laborioso y costoso que requiere el empleo de altas

cantidades de alimento, uso de alta mano de obra y la disposición de instalaciones para su cuidado (9, 39), por lo tanto se han propuesto distintos métodos alternativos, entre ellos los procedimientos *in vitro* para la estimación de la digestibilidad (7), los que pueden realizarse cuando se dispone de pequeñas cantidades de muestra.

Los métodos *in vitro* que han sido utilizados más ampliamente desde su introducción en 1963 son el de Tilley y Terry (36) y el de Van Soest y colaboradores en 1966 (39), considerados los procedimientos más exactos para la predicción de la digestibilidad en rumiantes (17, 35). El método de Tilley y Terry se considera un método referente para calcular la digestibilidad en alimentos para rumiantes, el cual ha sido modificado y adaptado según el tipo de alimento a analizar (4), al igual que se han desarrollado y probado diferentes tampones de dilución para ajustar el pH del inóculo (18). Pese a su exactitud y a todas las modificaciones y adaptaciones, este método sigue siendo un procedimiento que consume mucho tiempo y trabajo, además cada alimento debe incubarse por separado, limitando el número de muestras a ser analizadas por corrida o tanda.

La búsqueda para hacer más eficiente, rápido y económico el proceso para estimar la digestibilidad, ha llevado al desarrollo del método *in vitro* de Goering y Van Soest (16), usando el equipo Daisy<sup>II</sup>-Ankom Technology (3), que permite la incubación simultánea de hasta 100 muestras diferentes, distribuidas en cuatro jarras (recipiente de vidrio de 4 l de capacidad), mantiene el calor uniforme y la agitación constante durante el procedimiento de incubación (12). Con este método, el material que

desaparece de las bolsas durante la incubación es considerado digerible (24). Es un método rápido, seguro, eficiente y económico (12) y los datos obtenidos de digestibilidad para distintos alimentos, tienen una alta correlación con los obtenidos por el método convencional de Tilley y Terry (36, 44) y con la técnica *in situ* o de la bolsa de nylon (28, 43, 45). Por otro lado, la degradabilidad *in situ* o de la bolsa de nylon, es un procedimiento que se utiliza de manera rutinaria en nuestro laboratorio desde hace varios años con resultados aceptables (6).

Debido a la falta de información en nuestro medio para forrajes de uso cotidiano en ganadería y teniendo en cuenta la importancia de contar con un método rápido y confiable que permita determinar la digestibilidad de forrajes tropicales de manera masiva en el laboratorio de Biotecnología Ruminal, se fijó como objetivo de este trabajo: estudiar la validez y precisión en el uso de la técnica de Van Soest *et al* (39) para la determinación de la digestibilidad *in vitro* en varios forrajes tropicales usando el incubador Daisy<sup>II</sup><sup>®</sup>- Ankom y su comparación con los estimados de digestibilidad, usando el método de la degradabilidad ruminal *in situ* o de la bolsa de nylon, propuesto por Ørskov y McDonald (27), efectuado de manera rutinaria en el laboratorio.

### Materiales y métodos

**Muestras.** Para este trabajo se utilizaron cuatro forrajes de origen tropical, tres gramíneas: heno de pasto angleton (*Dichantium aristatum*) de 60 días de rebrote, dos muestras de pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) de 29 y 49 días de rebrote tomadas de la misma pradera y la arbustiva de hoja ancha San Joaquín (*Malvaviscus penduliflorus*). Los forrajes se secaron previamente a 65°C/ 48 h y se procesaron en un molino Fritsch (Idar Oberstein<sup>®</sup>- Germany), a través de una criba 1 mm y posteriormente se pasaron a través de un tamiz de 10<sup>3</sup> µm (Test Sieve<sup>®</sup>- England). La composición química de los forrajes evaluados se presenta en la tabla 1.

Las determinaciones de proteína cruda (PC) y el contenido de fibra en detergente neutro (FDN) así como fibra en detergente ácido (FDA) se realizaron

siguiendo las normas de AOAC (1) y Van Soest *et al.* (39), respectivamente.

**Tabla 1.** Proteína y composición de la fibra de los forrajes evaluados\*.

Forraje	PC (%)	FDN (%)	FDA (%)
Heno de angleton	4.9	73.3	33.2
Kikuyo 29	18.7	63.0	29.7
Kikuyo 49	13.3	69.6	31.0
San Joaquín	15.5	45.7	23.6

\* Valores como porcentaje de la MS

### Digestibilidad *in vitro*

Para la determinación de la digestibilidad aparente *in vitro* (DAIVMAS) y verdadera *in vitro* (DDVIVMS) se siguió el protocolo recomendado por el fabricante para el incubador Daisy<sup>II</sup><sup>®</sup>, (ANKOM Technology, Fairport, NY-USA) (3) (véase Figura 1), usando bolsas FN<sup>o</sup> 57 con un tamaño de poro de 25 µm y dimensiones de 5 x 4 cm fabricadas de poliéster/polietileno con filamentos extruídos en una matriz de tres dimensiones, en cada una las cuales se depositaron 0.25 g de muestra, para obtener un área efectiva por bolsa de 36 cm<sup>2</sup> lo que corresponde a una relación tamaño de la muestra y superficie de la bolsa de 14.4 mg/cm<sup>2</sup>; luego fueron selladas con calor para este propósito (3). En cada una de las cuatro jarras de digestión se incubaron al azar seis réplicas de cada forraje (25 bolsas/jarra), incluyendo una bolsa blanco –bolsa vacía y sellada sin muestra-, con el fin de generar el factor de corrección para el posible ingreso de partículas ó pérdida de peso de las bolsas. El procedimiento se realizó por duplicado, esto es dos corridas o tandas con una diferencia de tres días entre ellas, con el propósito de evaluar la precisión del equipo Daisy<sup>II</sup><sup>®</sup>, basado en (29).

El principio de funcionamiento del Daisy<sup>II</sup><sup>®</sup> consiste en establecer condiciones de incubación semejante a las condiciones *in vivo*, de tal manera que el procedimiento incluye soluciones compuestas por minerales, fuentes de nitrógeno y agentes reductores que ayudan a la anaerobiosis necesaria en el proceso. Por ello se emplearon las soluciones utilizadas por Goering y Van Soest (16). El inóculo ruminal necesario para el procedimiento (proporción 4:1 de solución medio de cultivo: inóculo ruminal) se recolectó de dos animales bovinos machos



Figura 1. Incubador Sistema Ankom Daisy<sup>II</sup>® (3)

de raza blanco orejinegro o BON (*Bos taurus*) fistulados al rumen, con peso vivo promedio de 483 kg y pastoreando la gramínea pará (*B. mutica*), con forraje en oferta de 12% de PC, 68% de FDN, 33% de FDA y DAIVMS de 61.6%. El líquido ruminal fue mezclado en igual proporción de cada uno de los novillos. La preparación de las soluciones tampón (1600 ml/jarra) se realizó en condiciones anaerobias permanentes, a las cuales se le agregó a cada una 400 ml de líquido ruminal previamente mezclado y filtrado por dos bolsas de nylon con tamaño de poro de 50  $\mu\text{m}$ .

Las muestras se incubaron por 48 h en el Daisy<sup>II</sup>® a una temperatura de  $39.2 \pm 0.5$  °C, con agitación circular constante que posee el equipo. Luego de la incubación, las bolsas se lavaron con agua fría, con el fin de detener la fermentación y se procesaron en el analizador de fibra Ankom 2000 (3), en el cual se someten los residuos de la incubación a una solución detergente neutra a 100 °C/1 h, tres lavados sucesivos con agua a 90 °C y secados en estufa de aire forzado a 105 °C/2 h; proceso que permite remover restos microbianos y algunos remanentes de fracciones solubles (41), para así finalmente obtener resultados en términos de DVIVMS (16); los que se consideran como estimados de la digestibilidad real de los alimentos (39). Cuando los resultados se expresan en términos de digestibilidad aparente *in vitro* de la materia seca (DAIVMS), este paso en solución detergente neutra se omite (16).

### *Digestibilidad o degradabilidad in situ*

En el protocolo se utilizaron dos animales bovinos de raza BON con peso vivo medio de 580 kg, fistulados al rumen y provistos de cánulas permanentes fabricadas con goma flexible (Bar-Diamond®, Inc. Idaho, USA) con cuatro pulgadas de diámetro interno. Los animales fueron sometidos a un sistema de alimentación en pastoreo libre con pasto pará (*B. mutica*), con 10.4% de PC, 65.3% de FDN y 37.9% de FDA, con agua y sal mineral a voluntad. Todos los procedimientos de campo y de laboratorio para efectuar los análisis de la degradabilidad *in situ* o de la bolsa de nylon, siguieron los pasos previamente estandarizados y descritos para condiciones del trópico (15).

De cada muestra de forraje se procesaron seis réplicas: tres por cada animal, molidos con un molino Fritsch (Idar Oberstein®- Germany), a través de una criba (1 mm) y posteriormente se pasaron a través de un tamiz de  $10^3$   $\mu\text{m}$  (Test Sieve®- England). De cada muestra se depositaron 5 g en bolsas de dacrón/poliéster para análisis *in situ* (ANKOM Co, Fairport, NY), con dimensiones de 10 x 5 cm y con un tamaño de poro de  $50 \pm 3$   $\mu\text{m}$ , atadas con una abrazadera plástica desechable para lograr un área efectiva por bolsa de 90  $\text{cm}^2$ , obteniendo una relación tamaño de la muestra y área de la bolsa de 18  $\text{mg}/\text{cm}^2$  (26, 15). Para garantizar su permanencia en la parte ventral del rumen se usó una cadena de hierro galvanizado con un diámetro de  $\frac{1}{4}$  de pulgada y de 1 m de largo, fijada al tapón de cánula ruminal con un hilo de nylon de 50 cm de longitud; al momento de la incubación en la parte ventral del rumen las muestras fueron sumergidas en agua limpia del grifo por 30 seg, con el propósito de ser prehidratadas y poder generar el factor de corrección por escape de partículas en el tiempo cero (15), e inmediatamente incubadas en el rumen por un período de 48 h; luego de esta incubación fueron extraídas del rumen, lavadas con agua corriente, secadas a 65 °C/48 h en una estufa de aire forzado y luego pesadas, previo enfriamiento en desecador. Posteriormente, los residuos de la degradación *in situ*, se procesaron en el equipo analizador de fibra Ankom® 2000 (3), para efectuar una extracción con detergente neutro a 100 °C/1 h y poder expresar



los datos como degradabilidad o digestibilidad verdadera *in situ* de la materia seca (DVISMS) (16).

### Materia Seca (MS)

El porcentaje de MS de cada muestra se determinó usando una balanza de humedad de rayos infrarrojos (Precisa®) y siguiendo el protocolo estandarizado en el laboratorio (6) para el análisis de este tipo de muestras, con el fin de realizar los cálculos finales de digestibilidad.

### Análisis estadísticos

Los resultados fueron analizados mediante estadísticas descriptivas, para el análisis de varianza del incubador Daisy<sup>II</sup>®, se usó el procedimiento GLM del programa estadístico SAS (34), utilizando el siguiente modelo:  $Y_{ijk} = \mu + F_i + R_j + J_k + C_l + E_{ijkl}$ , donde:  $Y_{ijk}$  = variable de respuesta (DVIVMS);  $\mu$  = media general del experimento;  $F_i$  = efecto asociado al  $i$ -ésimo forraje ( $i = 1$  a 4);  $R_j$  = Efecto de la  $j$ -ésima repetición ( $j = 1$  a 6);  $J_k$  = Efecto de la  $k$ -ésima jarra ( $k = 1$  a 4);  $C_l$  = Efecto de la  $l$ -ésima corrida ( $l = 1, 2$ );  $E_{ijkl}$  = error experimental.

La comparación de medias se efectuó por el procedimiento Duncan; y las correlaciones y las regresiones con el procedimiento CORR y REG respectivamente del SAS (34). También se analizó la precisión del equipo Daisy<sup>II</sup>®, mediante la repetibilidad, definida como el grado de acercamiento entre resultados de análisis independientes, logrados con un mismo método, con una misma muestra, en un mismo laboratorio y analista, usando el mismo equipo y en intervalo de tiempo corto (29), medida por el coeficiente de variación (%), para ensayos de digestibilidad *in vitro* (33).

## Resultados

La composición química de los forrajes evaluados (véase Tabla 1), varió entre 4.9 y 18.7% para los forrajes angletón y kikuyo de 29 días, respectivamente; la pared celular fue mayor para el angletón y el pará, y menor para el san joaquín; la fracción más digerible de la fibra (FDA), fue similar para los cuatro forrajes en evaluación.

### Digestibilidad verdadera *in vitro* de la MS

La DVIVMS fue mayor para san joaquín (véase Tabla 2), seguido del pasto de kikuyo 29 y 49 días de rebrote y por último el heno de angletón. En todos los casos las desviaciones estándar para todos los forrajes son bajas y fluctuaron entre 0.69 y 2.67.

**Tabla 2.** Valores promedios de DVIVMS en cuatro forrajes evaluados.

Forraje	Promedio (%)*	n
Heno de angletón	89.78 ± 0.69 <sup>a</sup>	48
Kikuyo 29	84.32 ± 1.87 <sup>b</sup>	48
Kikuyo 49	82.03 ± 2.72 <sup>c</sup>	48
San Joaquín	59.61 ± 2.67 <sup>d</sup>	48

\* Superíndices con letra distinta, difieren significativamente ( $p < 0.05$ )

Cuando los estimados de DVIVMS de todos los forrajes, se analizaron en conjunto tratando de visualizar la precisión del procedimiento *in vitro* utilizando el incubador Daisy<sup>II</sup>® (véase Tabla 3), no se encontraron diferencias entre repeticiones ( $p > 0.05$ ). La semejanza de los estimados de DVIVMS entre repeticiones se evidenció para todos los forrajes evaluados, mostrando la precisión de los valores obtenidos con fluctuación entre 79.15 y 78.47% de DVIVMS, correspondiente a las repeticiones cinco y dos, respectivamente.

La tabla 4, ilustra los promedios obtenidos en los estimados de DVIVMS en cada una de las cuatro jarras usadas con el incubador Daisy<sup>II</sup>®. Los coeficientes de variación fueron bajos (lo que indicó una alta repetibilidad) en todos los forrajes y jarras (rango entre 0.22 y 3.03%); sin embargo, en los forrajes con mayor DVIVMS, se encontró menor variación (san joaquín y kikuyo de 29 días de rebrote), que los forrajes con menor digestibilidad (kikuyo de 49 días de rebrote y el heno de angletón).

**Tabla 3.** Valores promedios de DVIVMS en seis repeticiones, incubador Daisy®

Repetición	Promedio (%)*	n
5	79.15 ± 12.04 <sup>a</sup>	32
1	79.14 ± 11.98 <sup>a</sup>	32
6	78.99 ± 11.38 <sup>a</sup>	32
3	78.93 ± 12.03 <sup>a</sup>	32
4	78.91 ± 11.77 <sup>a</sup>	32
2	78.47 ± 12.12 <sup>a</sup>	32

\*Superíndices con letra distinta, difieren significativamente ( $p < 0.05$ )

**Tabla 4.** Promedios y variación de la DVIVMS entre jarras, incubador Daisy<sup>II</sup>®\*

Forraje	Jarra 1	Jarra 2	Jarra 3	Jarra 4
San Joaquín	90.06 (0.44)	90.02 (0.58)	89.58 (0.61)	89.46 (0.22)
Kikuyo 29	83.08 (1.43)	85.62 (0.66)	83.93 (0.99)	84.63 (1.11)
Kikuyo 49	81.81 (1.80)	82.69 (0.99)	80.37 (3.06)	83.20 (1.85)
Angletón	57.70 (0.85)	60.32 (1.16)	58.72 (1.89)	61.69 (2.34)

\* Entre paréntesis coeficiente de variación (%)

Por otro lado, cuando a todos los forrajes se les estimó la DVIVMS en dos corridas o tandas diferentes con una diferencia de un día entre ellas, el análisis de la correlación (relación de los datos entre las corridas 1 y 2), fue altamente significativo ( $p < 0.01$ ), con un coeficiente de correlación alto ( $R^2 = 0.97$ ), presentando ambas corridas valores promedios semejantes (véase Tabla 5).

**Tabla 5.** Valores promedios de DVIVMS entre corridas, incubador Daisy<sup>II</sup>®

Corrida	Promedio (%)	n
1	79.26 ± 11.04*	96
2	78.60 ± 12.43*	96

\* Diferencia de estadística no significativa ( $p > 0.05$ )

La tabla 6 muestra los estimados de DVIVMS en dos corridas distintas con un día de diferencia efectuadas en el incubador Daisy<sup>II</sup>®, con su desviación estándar y coeficiente de variación en cada uno de los forrajes evaluados. Estos porcentajes de variación son bajos, evidenciando la buena precisión del equipo.

**Tabla 6.** Promedios y variación entre corridas para la DVIVMS de cuatro forrajes, incubador Daisy<sup>II</sup>®

Forraje	Promedio (%)*	CV (%)
San Joaquín	89.78 ± 0.49	0.54
Kikuyo 29	84.32 ± 1.27	1.51
Kikuyo 49	82.03 ± 1.91	2.33
Angletón	59.61 ± 1.81	3.04

#### Relación entre DVIVMS y DVISMS

Los estimados de la DVIVMS fueron mayores que los de la DVISMS, con diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ) para todos los forrajes (véase Tabla 7).

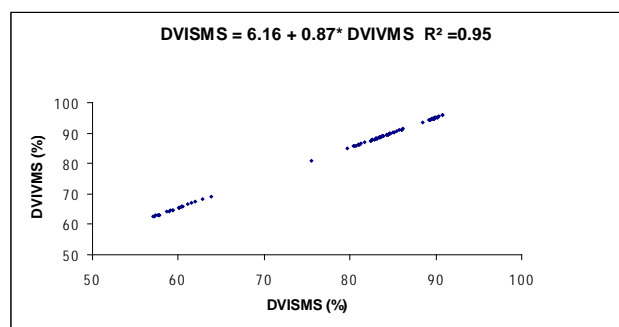
**Tabla 7.** Promedios de DVIVMS y DVISMS de cuatro forrajes\*

Forraje	DVIVMS (%)	DVISMS (%)
San Joaquín	89.78 ± 0.69 <sup>a</sup>	84.36 ± 0.14 <sup>b</sup>
Kikuyo 29	84.32 ± 1.87 <sup>a</sup>	77.94 ± 0.86 <sup>b</sup>
Kikuyo 49	82.03 ± 2.73 <sup>a</sup>	75.29 ± 0.91 <sup>b</sup>
Angletón	59.61 ± 2.67 <sup>a</sup>	53.68 ± 1.11 <sup>b</sup>

\* Superíndices con letra distinta, difieren significativamente ( $p < 0.05$ )

Cuando se efectuó la correlación entre DVIVMS y la DVISMS, fue altamente significativa ( $p < 0.01$ ), con un coeficiente de correlación alto ( $R^2 = 0.95$ ), a pesar de presentar varias unidades porcentuales de diferencia entre los promedios de la DVIVMS y la DVISMS para los todos los forrajes evaluados.

Al procesar estadísticamente la relación entre los datos obtenidos de la estimación de DVIVMS y los de DVISMS a través de regresión lineal (véase Figura 2), el coeficiente de determinación fue altamente significativo ( $p < 0.01$ ), mostrando una relación alta ( $R^2 = 0.95$ ;  $n = 96$ ) y la ecuación resultante fue:  $DVISMS = 6.16 \pm 0.06 + 0.87 \pm 0.04 * DVIVMS$ .

**Figura 2.** Relación entre DVIVMS y DVISMS.

#### Discusión

Los forrajes utilizados para evaluar y probar el Daisy<sup>II</sup>® poseen una composición química contrastante: desde gramíneas de buena calidad como el pasto kikuyo de 29 y 49 días de rebrote, hasta la gramínea de clima cálido de baja calidad como el angletón; se incluye la arbustiva forrajera san Joaquín de alta calidad (véase Tabla 1), valores que están dentro de los rangos comunes para forrajes tropicales (40).

#### Digestibilidad verdadera *in vitro* de la MS

Recientemente, una técnica simple para la incubación *in vitro* y la estimación de la

digestibilidad ha sido introducida (33), como alternativa al método tradicional de Tilley y Terry (39), ésta usa el incubador Daisy<sup>II</sup>® (Ankom® Tech. Co., Fairport, NY, USA). Dicha metodología permite la incubación simultánea de un alto número de muestras (hasta un máximo de 96 muestras por corrida o tanda de incubación) y además no afecta negativamente la precisión del valor obtenido (39).

Los estimados de la DVIVMS obtenidos usando el incubador Daisy<sup>II</sup>® empleado en este trabajo se pueden interpretar como estimaciones de la digestibilidad real de los forrajes (38). Puesto que el residuo resultante de la incubación *in vitro* durante 48 h, es una mezcla de forraje no digerido y de microorganismos ruminales y su paso posterior por detergente neutro solubiliza los microorganismos y los restos de contenido celular de los forrajes (39), de manera que el contenido de pared celular y el tiempo de la degradación de ésta, determina el valor de la digestibilidad *in vitro* del sustrato (7, 39).

La DVIVMS con el Daisy<sup>II</sup>® fue diferente ( $p < 0.05$ ) para los distintos forrajes (véase Tabla 2), coincidiendo con el orden de menor a mayor contenido de pared celular (%FDN) y de %FDA; se ha reportado (38), correlación significativa y negativa entre el contenido de pared celular y la digestibilidad, y más marcada cuanto mayor es el contenido de fibra. Además, se ha reportado disminución de la digestibilidad de los forrajes cuando su contenido de nitrógeno está por debajo de 11.2% (25), lo que es muy evidente para el caso del heno de angletón. Por otra parte, en nuestro medio para condiciones de clima frío de Chiquinquirá y Simijaca (30), se ha encontrado para el kikuyo una relación negativa entre la DIVMS y la FDN ( $R^2 = 0.75$ ) y la FDA ( $R^2 = 0.81$ ).

Para el kikuyo 29 y 49 a pesar de existir 20 días de diferencia en la edad de rebrote, la diferencia en DVIVMS de 2.3 unidades porcentuales es baja, aunque estadísticamente diferente ( $p < 0.05$ ), debido posiblemente a que el pasto kikuyo difiere en su comportamiento de la mayoría de los pastos tropicales, puesto que su composición química y digestibilidad no disminuyen tan drásticamente a medida que avanza su edad de rebrote, tal como lo hacen los pastos que crecen en zonas de clima

cálido. Se ha reportado (10) que la edad podría no estar relacionada tan íntimamente con su calidad como los factores ambientales (cantidad y calidad de radiación solar) y régimen de lluvias, que afectan la pared celular para forrajes de clima frío.

La radiación solar puede ser un indicador más preciso de la composición nutricional que la edad cronológica, puesto que la temperatura diaria promedio es la principal variable responsable de la composición química de este forraje (31, 32), porque a mayor temperatura mayor lignificación y mayor concentración de pared celular (46). Así en la sabana de Bogotá, muestras de kikuyo tomadas en zonas con menor altitud sobre el nivel del mar, presentan mayores contenidos de FDN, que muestras tomadas en regiones con mayor altitud a edades similares de rebrote (comunicación personal: J Carulla, Universidad Nacional, Sede Bogotá. Bogotá, Colombia, 2004). En África, de donde es originario el pasto kikuyo, se reporta una digestibilidad de 70.72 y 72.97% respectivamente, para el kikuyo usando el incubador Daisy<sup>II</sup>®, aunque no se reporta la edad de rebrote del forraje (12, 13).

#### *Precisión y repetibilidad de los estimados de la DVIVMS*

La semejanza entre las diferentes repeticiones para todos los forrajes en la estimación de la DVIVMS en el incubador Daisy<sup>II</sup>® (véase Tabla 3), evidencia su precisión, que lo hacen comparable a los valores de digestibilidad encontrados con procesos tradicionales (2), para muchos tipos de alimentos incluyendo forrajes de gramíneas, henos de gramíneas, leguminosas como la alfalfa y ensilajes (19) o concentrados y suplementos proteicos (24), e incluso partes de las plantas de gramíneas como hojas y tallos (45).

Con el uso del usando el Daisy<sup>II</sup>®, se ha reportado una precisión satisfactoria de la digestibilidad de la técnica *in vitro*, incluso mayor que el método de Tilley y Terry (24). En nuestro trabajo la variación, incluyendo todas las fuentes de variación (forrajes, repeticiones, jarras y corridas) fue de 2.58%, valor inferior a los encontrados entre 3.5 y 4.6% en la DVIVMS para el ryegrass italiano y la alfalfa (45) utilizando el mismo equipo. Cuando se evalúa

la digestibilidad de fracciones químicas de los forrajes como la FDN, las variaciones reportadas son mayores: 16.5% para henos de gramíneas (33). Lo que evidencia diferencias en la precisión dependiendo de la fracción química del forraje a evaluar.

La repetibilidad obtenida, entendida como la variación entre jarras fue entre 0.22 y 3.06% dependiendo del tipo de forraje (véase Tabla 4). En todos los casos a excepción de la jarra 3 en kikuyo 49, la repetibilidad encontrada fue mayor a la reportada (2.8%) en otro trabajo con el uso del Daisy<sup>II</sup>® en la evaluación de 19 henos (33).

La alta correlación ( $R^2 = 0.97$ ) y significativa ( $p < 0.01$ ) entre las corridas o tandas con diferencia de tres días en el incubador y para los cuatro forrajes, corrobora su precisión al igual que otras evaluaciones (29) (véanse Tablas 5 y 6). Se evidencia como el Daisy<sup>II</sup>® siguiendo la metodología de Goering y Van Soest (16), es un efectivo sistema para la estimación de la digestibilidad *in vitro*, que produce datos similares a metodologías tradicionales, permitiendo un proceso más rápido sin afectar negativamente la precisión (19).

#### *Estimación de la DVISMS y su relación con la DVIVMS*

La digestibilidad *in vivo* parcial utilizando la técnica *in situ* de la bolsa de nylon (23) de los alimentos está afectada por numerosos factores, destacándose el tipo de alimento, el nivel y frecuencia de ingestión, la especie animal y su estado fisiológico, tamaño de partícula del forraje, tamaño de la bolsa de nylon y su diámetro de poro entre otros (20, 33, 42). Sin embargo, la determinación *in vivo* es un proceso laborioso y costoso, que requiere el empleo de grandes cantidades de alimento, cuidados para los animales y mano de obra, por lo que se han propuesto algunas técnicas *in vitro* como alternativas para su estimación (7).

La DVIVMS en el digestor Daisy<sup>II</sup>®, en todos los forrajes fue superior a la estimada *in vivo* parcial con la técnica *in situ* o de la bolsa de nylon (DVISMS) (véase Tabla 7), lo cual difiere de lo reportado por otros trabajo (13) para el kikuyo, con valores de 80.73 y 72.97% para la digestibilidad *in vivo* e *in*

*Vitro*, respectivamente. Estas diferencias podrían deberse a los distintos diámetro de poro de las bolsas usados (20  $\mu\text{m}$  en la técnica *in vitro* con el Daisy<sup>II</sup>® y 50  $\mu\text{m}$  en la técnica *in situ* o bolsa de nylon), con el mismo tamaño de partícula (1mm) y por otra parte, a la diferente relación tamaño de la muestra/superficie de la bolsa (14.4 y 18  $\text{mg}/\text{cm}^2$ ) usadas en el Daisy<sup>II</sup>® e *in situ*, respectivamente. Se ha reportado incrementos en la digestibilidad y su variabilidad cuando se disminuye la relación tamaño de la muestra/superficie de las bolsa (37), afectando los estimados de digestibilidad por lo que es necesario controlarlos y estandarizados apropiadamente (35). Dependiendo de estos dos factores se facilita la colonización por los microorganismos ruminales y su digestión (42), limitando o favoreciendo el grado de ataque bacterial de los alimentos incubados intraruminalmente dentro de las bolsas (22). Sin embargo, el tamaño de los poros en las bolsas de incubación debería ser lo suficientemente grande para permitir la colonización microbiana de todos los fragmentos de las muestras de los forrajes y la normal velocidad de digestión de la fibra (14).

Con el equipo Daisy<sup>II</sup>®, se han probado bolsas con diferente apertura de poro para cuantificar la digestibilidad de la MS de diferentes forrajes y pastos (2). El tamaño de poro de la bolsa afectó la digestibilidad (mayor para apertura de poro mayor) y fue dependiente del tipo de forraje; sin embargo, encontró relación entre los valores de digestibilidad usando bolsa Ankom (25  $\mu\text{m}$ ) y las otras dos bolsas (50 y 30  $\mu\text{m}$ ), concluyendo que las bolsas del Ankom usadas con el Daisy<sup>II</sup>® suministran una mayor precisión en la predicción de la digestibilidad que las bolsas alternativas probadas.

En contraste en otro trabajo (43), se reporta mayor digestibilidad con la técnica *in situ* que la *in vitro*, usando como substratos la alfalfa y varias gramíneas, diferencias que fueron atribuidas a la menor concentración de microorganismos en la técnica *in vitro*, comparada con la concentración de microorganismos en el rumen. Esta referencia difiere de nuestros resultados (DVISMS menor que la DVIVMS), debidas posiblemente al uso de diferentes técnicas *in vitro*, así en la evaluación (43) se usaron tubos para la incubación *in vitro* en los cuales el substrato estuvo en contacto directo con la



mezcla de líquido ruminal y el tampón, en cambio en nuestro caso se usaron las bolsas Ankom del equipo Daisy, las que podría restringir el acceso de ciertos microorganismos (principalmente protozoos de tamaño grande) al interior de las bolsas y no pone en contacto directo al substrato con la mezcla de fluido ruminal (33). Adicionalmente, la dilución del fluido ruminal es distinta, 1:4 en nuestro caso y 1:5 en el trabajo de Varel y Kreikemeier (43), lo que podría traer concentraciones diferentes de microorganismos ruminales. Sin embargo, en el presente trabajo, a pesar de encontrar una diferencia media de 6.2% de la DVIVMS sobre la DVISMS, ambos mostraron una correlación significativa y alta, permitiendo predecir mediante una regresión la DVISMS con base en los estimados de DVIVMS usando el incubador Daisy<sup>II</sup>® ( $p < 0.01$  y  $R^2 = 0.95$ ) (véase Figura 1).

La técnica desarrollada en 1966 por Van Soest *et al.* (39) para estimar la digestibilidad, supone una alternativa al método de Tilley y Terry (32), lo que ha sido probado (8), al encontrar con 12 forrajes una correlación significativa y alta ( $R^2 = 0.97$ ) entre la digestibilidad obtenida con el incubador Daisy<sup>II</sup>® y la técnica convencional de Tilley y Terry y, más recientemente (45), se reportan relaciones significativas ( $R^2 = 0.3-0.95$ ) entre la DVIVMS usando el Daisy<sup>II</sup>® y la DVIVMS con el método de Tilley y Terry.

Finalmente, la utilización de los parámetros de la regresión lineal para estos cuatro forrajes permiten estimar la DVISMS con base en la DVIVMS, coincidiendo con lo obtenido por otros investigadores (8), quienes reportan ecuaciones

de regresión lineal significativas ( $p < 0.01$ ) y altas ( $R^2 = 0.86-0.89$ ) al evaluar once henos de diferentes gramíneas y leguminosas. De acuerdo con los resultados obtenidos con los forrajes en la presente evaluación, se evidencia al incubador Daisy<sup>II</sup>® como un aparato apropiado para estimar la digestibilidad aparente y verdadera, ya que produce alta repetibilidad y los datos están altamente correlacionados con los estimados de digestibilidad *in situ* utilizando la bolsa de nylon.

En conclusión, la técnica DVIVMS utilizando el incubador Daisy<sup>II</sup>® permite determinar la digestibilidad de forma rápida, precisa y sencilla comparado con los métodos convencionales; tal y como ha sido referenciado por otros trabajos, los resultados obtenidos en el presente trabajo los confirman. Así, la digestibilidad tanto aparente como verdadera medida en el sistema Daisy<sup>II</sup>® presenta una alta repetibilidad, consistencia y reproducibilidad, dadas las bajas variaciones entre muestras y corridas, haciendo el procedimiento más rápido, sencillo y económico. Es posible estimar la degradabilidad ruminal *in situ* verdadera con base en datos obtenidos *in vitro*. Sin embargo, para generalizar el uso del incubador Daisy<sup>II</sup>®, es recomendable evaluarlo empleando otras especies de forrajes tropicales y sus fracciones químicas.

### Agradecimientos

Los autores agradecen a la División de Investigaciones Medellín (DIME), de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, por la financiación del presente trabajo (código 030803685).

### Referencias

1. AOAC. Official methods for analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15<sup>th</sup> ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC. 1990.
2. Adesogan AT. Affect of bag type on the apparent digestibility of feeds in Ankom Daisy<sup>II</sup> incubators. *An Feed Sci Technol* 2005; 119:333-344.
3. Ankom Technology. Procedures for fiber and *in vitro* analysis [consultada: 16 noviembre, 2004] URL: [hpt://www.ankom.com/homepage.html](http://www.ankom.com/homepage.html).
4. Aufrere J, Michalet-Doreau B. Comparison of methods for predicting digestibility of feeds. *Anim Feed Sci Technol* 1988; 20:203-218.
5. Barnes R, Marten G. Recent developments in predicting forage quality. *J Anim Sci* 1979; 48:1554-1561.
6. BIORUM. Manual de procedimientos Parte II. Dinámica digestiva. Laboratorio de Biotecnología Ruminal. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. 2003

7. Bochi-Brum O, Carro D, Valdés C, González J, López S. Digestibilidad *in vitro* de forrajes y concentrados: efecto de la ración de los animales donantes de líquido ruminal. Arch Zoot 1999; 48:51-61.
8. Bochi-Brum O, López S, González J, Ovejero F. Determinación de la digestibilidad *in vitro* de forrajes: comparación entre el procedimiento Daisy-Ankom y la técnica convencional. ITEA 1997; 18:37-39.
9. Broderick G. Quantifying forage protein quality. In: Fahey G, Ed. Forage quality, evaluation and utilization. American Society of Agronomy Inc. Madison, WI. 1994.
10. Carpenter J, Guyton R, Cambell C, Ho-a E, Matsuyama D, *et al.* Effects of solar radiation and age of regrowth on nutrient composition, *in vitro* digestibility, yield and growth characteristics of alfalfa grown in a sub-tropical climate. J Dairy Sci 1997; 75 Suppl 1:158.
11. Church D, Pond W. Fundamentos de nutrición y alimentación de animales. México: Limusa; 1987.
12. De Figueiredo M, Mbhele A, Zondi J. A modification of the Daisy<sup>II</sup>-200 technique for the determination of *in vitro* dry matter digestibility. South Afri J Anim Sci 2000; 30 Suppl 1:49-50.
13. De Figueiredo M, Mbhele A, Zondi J, Majola W. A comparative study between the determination of dry matter digestibility *in vitro* and *in vivo*. South Afri J Anim Sci 2000; 30 Suppl 1: 47-48.
14. Ellis W, Matis J, Hill T, Murphy M. Methodology for estimating digestion and passage kinetics of forages. In: Fahey GC Jr, editor. Forage quality, evaluation and utilization. University of Nebraska, Lincoln USA. 1994.
15. Giraldo LA. Estandarización de la técnica de la biodegradación ruminal *in situ*, para evaluar forrajes tropicales. Rev Col Cienc Pec 1996; 9 Suppl:59-63.
16. Goering M, Van Soest PJ. Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). Washington. USA. 1979. Agricultural Handbook N° 379.
17. Goldman A, Genizi A, Yuzari A, Seligman N. Improving the reliability of the two-stage *in vitro* assay for ruminant feed digestibility by calibration against *in vivo* data from a wide range of sources. Anim Feed Sci and Techn 1987; 18:233-245.
18. Grant R, Mertens D. Development of buffer systems for pH control and evaluation of pH effects upon fiber digestion *in vitro*. J Dairy Sci 1992; 75:1581-1587.
19. Holden LA. Comparison of methods of *in vitro* dry matter digestibility for ten feeds. J Dairy Sci 1999; 82:1791-1794.
20. Huntington J, Givens D. The *in situ* technique for studying the rumen degradation of feeds: A review of the procedure. Nut Abst Review (Series B) 1995; 95:63-93.
21. Krause D, Denman S, Mackie R, Morrison M, Rae A. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology and genomics. Microb Review 2003; 27:663-693.
22. Lindberg J. Estimation of rumen degradability of feed proteins with the *in sacco* technique and various *in vitro* methods: A Review. Act Agric Scand 1985; 25 Suppl: 64-97.
23. López S. *In vitro* and *In situ* techniques for estimating digestibility. In: Dijkstra J, Forbes JM, France J, editores. Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism, 2<sup>nd</sup> ed. London: CABI Publishing; 2005. p.87-121.
24. Mabjeesh S, Cohen M, Arieli A. *In vitro* methods for measuring the dry matter digestibility of ruminant feedstuffs: comparison of methods and inoculum source. J Dairy Sci 2000; 83:2289-2294.
25. Minson DJ, Milford R. The voluntary intake and digestibility of diets containing different proportions of legume and mature pangola grass (*Digitaria decumbens*). Aust J Exp Agr Anim Husb 1967; 7:546-551.
26. Nocek J. *In situ* and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility: a review. J Dairy Sci 1988; 71:2051-2069.
27. Ørskov ER, McDonald I. The estimate of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighed according to rate of passage. J Agric Sci 1979; 92:499-503.
28. Robinson P, Campbell M, Fadel J. Influence of storage time and temperature on *in vitro* digestion on neutral detergent fibre at 48h, and comparison to 48h *in sacco* neutral detergent fiber digestion. Anim Feed Sci Technol 1999; 80:257-266.
29. Rodríguez N, Lorente A, Velásquez Y, González E. Confiabilidad del método slott modificado por laboratorios Heiga para la determinación directa de la creatinina. Rev Fac Farmacia 2001; 42:67-71.
30. Rodríguez D. Caracterización de la respuesta a la fertilización y calidad forrajera en los valles de Chiquinquirá y Simijaca (Estudio de Caso). Trabajo de grado en Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá 1999.
31. Schneider B, Flatt W. The Evaluation of feeds through digestibility experiments. Athens: The University of Georgia Press; 1975. p.259.
32. Sherrod L, Ishizaki S. Effects of stage and season of regrowth upon the nutritive value of kikuyo and pangola grass. Anim Sci 1966; 17:379-391.
33. Spanguero M, Boccalon S, Gracco L, Gruber L. NDF degradability of hays measured *in situ* and *in vitro*. Anim Feed Sci Technol 2003; 104:201-208.
34. SAS. SAS/STAT<sup>®</sup> User's Guide. (versión 8.2). SAS Publishing, Cary, NC, USA 2001.
35. Stern M, Bach A, Calsamiglia S. Alternative techniques for measuring nutrient digestion in ruminants. J Anim Sci 1997; 75:2256-2276.
36. Tilley J, Terry R. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. J Br Grass Soc 1963; 18:104-111.

37. Udén P, Van Soest P. Investigations of the *in situ* bag technique and a comparison of the fermentation on heifers, sheep, ponies and rabbits. J Anim Sci 1984; 58:213-221.
38. Van Soest P, Maraus W. Method for the determination of cell wall constituents in forage, using detergents and the relationship between this fraction and voluntary intake and digestibility. J Dairy Sci 1975; 58:704-705.
39. Van Soest P, Wine RH, Moore LA. Estimation of the true digestibility of forages by the *in vitro* digestion of cell walls. Proc. 10<sup>th</sup> Int. Grasslands Congress. Helsinki. Finnish Grassland Association. 1966; 438-441.
40. Van Soest P. Nutritional ecology of the ruminants. 2<sup>nd</sup> ed. Ithaca: Cornell University Press; 1994.
41. Van Soest P, Robertson J, Lewis B. Methods of dietary fiber, neutral detergent fiber and non-polysaccharides in relation to animal nutrition. J Dairy Sci 1991; 74:3583-3597.
42. Vanzant E, Cochran R, Titgemeyer E. Standardization of *in situ* techniques for ruminant feedstuff evaluation. J Anim Sci 1998; 76:2717-2729.
43. Varel V, Kreikermeier K. Technical note: comparison of *in vitro* and *in situ* digestibility methods. J Anim Sci 1995; 73:578-582.
44. Vogel K, Pedersen J, Materson S, Toy J. Evaluation of a filter bag system for NDF, ADF, and IVDMD forage analysis. Crop Sci 1999; 39:276-279.
45. Wilman D, Adesogan A. A comparison of filter bag methods with conventional tube methods of determining the *in vitro* digestibility of forages. Anim Feed Sci Technol 2000; 84:33-47.
46. Wilson J, Edinum B, Engels F. Temperate effects on anatomy and digestibility of leaf and stem of tropical and temperate forage species. Neth J Agric Sci 1991; 39:31-48.