

CENTRO DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA PARA LA ZONA TEMPLADA DEL INSTITUTO  
INTERAMERICANO DE CIENCIAS AGRICOLAS DE LA OEA

CENTRO DE INVESTIGACIONES AGRICOLAS "ALBERTO BOERGER" DEL MINISTERIO DE GANADERIA  
Y AGRICULTURA DEL URUGUAY

PROYECTO DEL FONDO ESPECIAL DE LAS NACIONES UNIDAS N° 80

# METODOS IN VITRO PARA DETERMINAR EL VALOR NUTRITIVO DE LOS FORRAJES

EDITADO POR  
OSVALDO L. PALADINES

0882 I5974m 1967

MONTEVIDEO  
1967

Digitized by Google



URUGUAY 543.0882 I 5974m 1967

**METODOS IN VITRO PARA  
DETERMINAR EL VALOR NUTRITIVO  
DE LOS FORRAJES**



Impreso en Montevideo, Uruguay  
1967

Todos los derechos reservados por el  
Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la O. E. A.  
Prohibida la reproducción sin permiso.

CENTRO DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA PARA LA ZONA TEMPLADA DEL INSTITUTO  
INTERAMERICANO DE CIENCIAS AGRICOLAS DE LA OEA

CENTRO DE INVESTIGACIONES AGRICOLAS "ALBERTO BOERGER" DEL MINISTERIO DE GANADERIA  
Y AGRICULTURA DEL URUGUAY

PROYECTO DEL FONDO ESPECIAL DE LAS NACIONES UNIDAS Nº 80

# METODOS IN VITRO PARA DETERMINAR EL VALOR NUTRITIVO DE LOS FORRAJES

EDITADO POR

OSVALDO L. PALADINES

JEFE PROGRAMA DE GANADERIA Y PASTOS

IICA, ZONA SUR

MEMORIAS DEL SIMPOSIO REALIZADO EN LA ESTANZUELA, URUGUAY  
DEL 4 AL 7 DE OCTUBRE DE 1966



FICA  
5612

## LISTA DE PARTICIPANTES

**NOEMI ABIUSSO**  
Instituto Nacional de  
Tecnología Agropecuaria  
Castelar, Argentina

**RONALD H. ALEXANDER**  
West of Scotland Agricultural College  
Auchincruive, Escocia

**ALICIA ARIAS**  
Centro de Investigaciones Agrícolas  
"Alberto Boerger"  
La Estanzuela, Colonia, Uruguay

**G. W. ARNOLD**  
CSIRO División of Plant Industry  
Perth, Australia

**JOHN V. BATEMAN**  
Instituto Interamericano de Ciencias  
Agrícolas,  
Turrialba, Costa Rica

**EDUARDO S. BELLO**  
Centro de Investigaciones Agrícolas  
"Alberto Boerger"  
La Estanzuela, Colonia, Uruguay

**GERARDO BLANCHOU**  
Escuela para Graduados, IICA  
La Estanzuela, Colonia, Uruguay

**ALBA BUZY**  
Escuela para Graduados, IICA  
La Estanzuela, Colonia, Uruguay

**HERNAN CABALLERO**  
Instituto de Investigaciones  
Agropecuarias,  
Santiago, Chile

**EDGAR L. CAIELLI**  
Nova Odessa, Est. de San Pablo,  
Brasil

**RAUL CAÑAS**  
Escuela para Graduados, IICA  
La Estanzuela, Colonia, Uruguay

**JOSE A. CARRAZZONI**  
Instituto Nacional de Tecnología  
Agropecuaria,  
Castelar, Argentina

**GILBERTO A. CENTENO**  
Universidade Rural do Sul  
Pelotas, Río Grande do Sul, Brasil

**DEREK T. CHAMBERS**  
FAO  
La Estanzuela, Colonia, Uruguay

**JORGE C. CONTI**  
Facultad de Agronomía y Veterinaria  
Buenos Aires, Argentina

**NEDO E. CRUDELI**  
Escuela para Graduados, IICA  
La Estanzuela, Colonia, Uruguay

**JOSE F. COELHO DA SILVA**  
Escola Superior de Agricultura  
Viçosa, Minas Gerais, Brasil

**ALBERTO DAVIDOVICH**  
Instituto de Investigaciones  
Agropecuarias,  
Santiago, Chile

**RAFAEL DE LUCIA**  
Centro de Investigaciones Agrícolas  
"Alberto Boerger"  
La Estanzuela, Colonia, Uruguay

**CELSO LEMAIRE DE MORAES**  
Escola Superior de Agricultura  
"Luiz de Queiroz"  
Piracicaba, San Pablo, Brasil

**OSCAR A. DOMINGO**  
Facultad de Agronomía y Veterinaria  
Buenos Aires, Argentina

**E. DONEFER**  
Department of Animal Science  
MacDonald College  
Prov. Quebec, Canada

**JORGE ESCUDER**  
Estación Experimental "Dr. Mario  
Cassinoni" Ruta 3, Km. 373,  
Paysandú, Uruguay

**DORA FERRADANS**  
Estación Experimental "Dr. Mario  
Cassinoni" Ruta 3, Km. 373,  
Paysandú, Uruguay

**ALBERTO R. FRONTERA**  
Instituto Nacional de Tecnología  
Agropecuaria  
Balarce, Buenos Aires, Argentina

**ANDREW L. GARDNER**  
Instituto Interamericano de Ciencias  
Agrícolas  
La Estanzuela, Colonia, Uruguay

**JOSE A. GOMIDE**  
Escola Superior de Agricultura,  
UREMG  
Vicosa, Minas Gerais, Brasil

**ERNESTO HAARDT W.**  
Facultad de Ciencias Pecuarias y  
Medicina Veterinaria  
Universidad de Chile  
Santiago, Chile

**PETER HIRSCH-REINSHAGEN**  
Facultad de Agronomía,  
Universidad Católica  
Santiago, Chile

**THOMAS H. KACHELE**  
Centro de Investigaciones Agrícolas  
"Alberto Boerger"  
La Estanzuela, Colonia, Uruguay

**HOWARD J. LARSEN**  
Facultad de Agronomía e Veterinaria  
Universidade Rio Grande do Sul  
Porto Alegre, Río Grande do Sul, Brasil

**LUIS LATRILLE L.**  
Estación Experimental Agronómica,  
Universidad de Chile  
Maipú, Chile

**JORGE LOPEZ**  
Instituto de Estudios Forrageiros  
Facultad de Agronomía  
Porto Alegre, Río Grande do Sul,  
Brasil

**JOSE A. LOPEZ HERNANDEZ**  
Estación Experimental Agrícola  
Tucumán, Argentina

**JOSE MADDALONI**  
Instituto Nacional de Tecnología  
Agropecuaria,  
Pergamino, Buenos Aires, Argentina

**JEROME H. MANER**  
Centro Nacional de Investigaciones  
Agropecuarias  
Bogotá, Colombia

**JUAN CARLOS MILLOT**  
Centro de Investigaciones Agrícolas  
"Alberto Boerger"  
La Estanzuela, Colonia, Uruguay

**JUAN CARLOS MONESIGLIO**  
Instituto Nacional de Tecnología  
Agropecuaria,  
Castelar, Argentina

**JULIAN MURGUIA**  
Plan Agropecuario  
Montevideo, Uruguay

**OSVALDO L. PALADINES**  
Instituto Interamericano de Ciencias  
Agrícolas  
La Estanzuela, Colonia, Uruguay

**JOSE JUAN PARODI**  
Instituto Nacional de Tecnología  
Agropecuaria,  
Castelar, Buenos Aires, Argentina

**RODRIGO G. PARRA**  
Instituto de Producción Animal  
Facultad de Agronomía  
Maracay, Venezuela

**JOHN L. PARSONS**  
Escola Superior de Agricultura  
"Luiz de Queiroz"  
Piracicaba, San Pablo, Brasil

**RENATO RODRIGUEZ PEIXOTO**  
Universidade Rural do Sul  
Pelotas, Río Grande do Sul, Brasil

**HORACIO PELENUR**  
Centro de Investigaciones Agrícolas  
"Alberto Boerger"  
La Estanzuela, Colonia, Uruguay

**CAMPBELL PERCIVAL**  
FAO  
La Estanzuela, Colonia, Uruguay

**PAULO J. QUEIROZ PRESTES**  
Facultad de Agronomía  
Porto Alegre, Río Grande do Sul, Brasil

**BISNOEDATH L. RAKTOE**  
Instituto Interamericano de Ciencias  
Agrícolas  
La Estanzuela, Colonia, Uruguay

**ARTURO E. RAGONESE**  
Instituto Nacional de Tecnología  
Agropecuaria,  
Castelar, Argentina

**WILLIAM F. RAYMOND**  
The Grassland Research Institute  
Hurley, nr. Maidenhead  
Berkshire, Inglaterra

**MANUEL RODRIGUEZ ZAPATA**  
Instituto Interamericano de Ciencias  
Agrícolas,  
Montevideo, Uruguay

**MARCOS ROJAS DE LA TORRE**  
Escuela para Graduados, IICA  
La Estanzuela, Colonia, Uruguay

**JUAN C. SCARSI**  
Centro de Investigaciones Agrícolas  
"Alberto Boerger"  
La Estanzuela, Colonia, Uruguay

**GUILLERMO SCHIERSMANN**  
Instituto Nacional de Tecnología  
Agropecuaria  
Concepción del Uruguay,  
Entre Ríos, Argentina

**CARLOS SOCIAS SCHLOTTFELDT**  
Instituto Interamericano de Ciencias  
Agrícolas  
Montevideo, Uruguay

**HERNAN SERRANO**  
Instituto Nacional de Tecnología  
Agropecuaria  
Pergamino, Buenos Aires, Argentina

**SIEGFRIED SIMPFENDORFER R.**  
Escuela de Agronomía  
Universidad de Concepción  
Chillán, Chile

**AUDREY STEVENSON**  
FAO  
La Estanzuela, Colonia, Uruguay

**CECIL W. STRUTT**  
FAO  
La Estanzuela, Colonia, Uruguay

**CEES VAN VELZEN**  
Gobierno de Holanda  
La Estanzuela, Colonia, Uruguay

**DANIEL VAZ MARTINS**  
Escuela para Graduados, IICA  
La Estanzuela, Colonia, Uruguay

**LUIS S. VERDE**  
Facultad de Agronomía  
Montevideo, Uruguay

**SONIA CHIFFLET DE VERDE**  
Facultad de Agronomía  
Montevideo, Uruguay

**EUGENIO E. VONESCH**  
Facultad de Agronomía y Veterinaria  
Buenos Aires, Argentina



## INAUGURACION

Palabras de Inauguración dirigidas por el Director Regional para la Zona Sur del Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA, Ing. MANUEL RODRIGUEZ Z.

Señores:

En Setiembre de 1962, el Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la O.E.A. suscribió un convenio con el Ministerio de Ganadería y Agricultura del Uruguay, para la implantación de un Centro Regional de Investigación y Enseñanza para la Zona Templada, con sede en el Centro Nacional de Investigaciones Agrícolas "Alberto Boerger", La Estanzuela - Uruguay.

La finalidad del Centro, es promover la cooperación entre los países de la zona sur de nuestro continente, para resolver problemas comunes a su desarrollo agrícola. Con este propósito, se consideró necesario impulsar la investigación y la enseñanza al nivel de postgrado, como medio para fortalecer las instituciones de desarrollo agrícola y coordinar los programas orientados al mejoramiento de la ganadería, las pasturas y los cultivos alimenticios básicos.

El Centro de Investigación y Enseñanza para la Zona Templada, cuenta con el valioso apoyo que le brinda el Gobierno Uruguayo a través de su prestigioso Centro de Investigación "Alberto Boerger", la Escuela para Graduados del I.I.C.A. que ha establecido un Curso de Postgrado en Pasturas y Ganadería y el Fondo Especial de las Naciones Unidas.

Esta ejemplar cooperación en el plano interamericano e internacional, es la que nos está permitiendo realizar reuniones periódicas como ésta, con el propósito de compartir conocimientos para acelerar el desarrollo de nuestros países que aspiran a un nivel de vida más elevado, acorde con nuestros recursos naturales y humanos. Es así como hace dos años se efectuó el Primer Simposio sobre "El Empleo de Animales en las Investigaciones sobre Pasturas" cuyo resultado fue objeto de una publicación de gran valor de consulta.

En este Segundo Simposio serán discutidos los problemas inherentes a la aplicación de los Métodos *in vitro* en la determinación del valor nutritivo de los forrajes, con el fin de facilitar la adecuada aplicación de valiosas técnicas para predecir la digestibilidad de los forrajes, aspecto fundamental para su mejor utilización.

Gracias a la cooperación que nos brinda el Proyecto 80 del Fondo Especial de las Naciones Unidas, nos es posible destacar hoy la participación de los Profesores W. F. Raymond, E. Donefer, G. W. Arnold y R. H. Alexander quienes nos harán partícipes de la experiencia recogida en los notables centros mundiales de investigación de Inglaterra, Canadá, Australia y Escocia y a quienes, expreso nuestro profundo agradecimiento por prestigiar este Simposio con su presencia.

Deseo en esta oportunidad llamar brevemente la atención a la importancia de la ganadería en América Latina, a cuyo mejoramiento están contribuyendo vuestras preocupaciones profesionales. América Latina, con su dotación de 213 millones de vacunos y 130 millones de ovinos, según los últimos datos estadísticos del período 1962-1964 de las Naciones Unidas, refleja un relativo estancamiento ganadero que tiende a hacer mayor la distancia entre el aumento de la población, que en el quinquenio 1960-1965 creció con un ritmo de 2,4 % anual y la producción agropecuaria la cual creció solamente a un ritmo de 1,6 % anual. Esto significa que, en América Latina disminuye la disponibilidad de alimentos per cápita y aumenta la proporción de la producción nacional dedicada al consumo, en desmedro de los saldos exportables. Esto ha llevado, entre otras consecuencias, a la necesidad de racionar el consumo de carne aún en los países mejor dotados. Frente a la fría verdad de las cifras, los técnicos tienen la gran tarea de cambiar el panorama negativo, para el bienestar de América Latina, por otro más próspero. Nos asiste la seguridad de que ello será posible. Las experiencias realizadas en el Centro de Investigaciones Agrícolas "Alberto Boerger" comprueban una vez más que, con un adecuado manejo de las pasturas y del ganado, es posible quintuplicar la producción animal que se obtiene en estos momentos por métodos tradicionales de explotación agropecuaria. Alcanzar esa meta ciertamente no es tarea fácil, pues es necesario conseguir también superar los factores económicos, sociales y estructurales que limitan las posibilidades potenciales que existen para grandes sectores ganaderos de América Latina.

Estos cambios son posibles, pero es urgente acelerarlos, para lo cual vuestra contribución profesional es indispensable.

Al inaugurar este Simposio en nombre del Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la O.E.A., agradezco una vez más la valiosa colaboración que nos han brindado las instituciones ya mencionadas. Aprovecho también esta oportunidad para agradecer al Ing. Agrónomo Julián Murguía, por su ayuda en las traducciones durante las conferencias.

Os deseo una grata permanencia en Uruguay y espero que ella contribuya a acrecentar los lazos de amistad entre nuestros países, base sólida de nuestro progreso y bienestar.

Octubre 4, 1966.

## CONTENIDO

	Página
INTRODUCCION .....	xvii
<b>APLICACION DE LAS TECNICAS DE DIGESTIBILIDAD IN VITRO. — W. F. Raymond .....</b>	<b>1</b>
Métodos de Laboratorio para Estimar la Digestibilidad de los Forrajes .....	5
Método de Digestibilidad <i>in vitro</i> de Dos Fases .....	7
Validez de los resultados de digestibilidad <i>in vitro</i> ....	8
Standarización del método <i>in vitro</i> .....	10
Rango de aplicación del método <i>in vitro</i> de dos fases ..	11
Estudios Experimentales con el Método <i>in vitro</i> .....	12
Efecto del pH del rumen sobre la digestión de la celulosa ..	12
Velocidad de digestión en los sistemas <i>in vitro</i> .....	15
Producción de ácidos grasos volátiles en el sistema <i>in vitro</i> .	17
Estudios de digestibilidad con especies forrajeras .....	18
Empleo del sistema <i>in vitro</i> en la prueba de variedades....	21
Producción de nuevas variedades de forrajes .....	23
Pastoreo selectivo en el campo .....	24
Digestibilidad de otros cultivos forrajeros .....	25
Digestibilidad de henos y ensilajes .....	26
Resumen .....	27
Agradecimiento .....	28
Literatura Citada .....	28
DISCUSION. — O. L. Paladines .....	30
<b>USO DE METODOS IN VITRO Y OTROS METODOS DE LA- BORATORIO PARA PREDECIR EL CONSUMO POTENCIAL DE ENERGIA DIGERIBLE DE LOS FORRAJES. — E. Donefer</b>	<b>41</b>
I. Introducción .....	43
II. Medidas del Valor Nutritivo de los Forrajes .....	43
	xi

	Página
III. Uso de Técnicas de Fermentación <i>in vitro</i> para Predecir el Consumo Potencial de Energía Digerible ..	47
IV. Otras Técnicas de Laboratorio, para Predecir el Consumo Potencial de Energía Digerible de los Forrajes ..	50
Literatura Citada .....	52
Apéndice .....	53
DISCUSION. — H. Caballero .....	55
EMPLEO DE TECNICAS <i>IN VITRO</i> EN ASOCIACION CON TECNICAS DE MUESTREO PARA MEDIR LA DIGESTIBILIDAD Y EL CONSUMO DE FORRAJES BAJO PASTOREO. — G. W. Arnold .....	61
I. Introducción .....	63
II. Medida de Consumo de los Animales en Pastoreo ....	63
1. Consideraciones generales .....	63
2. Medida de las heces fecales producidas .....	65
A. Colección total .....	65
B. Uso del óxido de cromo .....	65
C. Conclusiones .....	68
3. Técnicas de relación .....	68
A. Lignina .....	68
B. Sílice .....	69
C. Cromógenos .....	69
D. Muestreo de la dieta .....	69
4. Técnicas de los índices fecales .....	70
A. Sustancias indicadoras .....	70
B. Nitrógeno fecal .....	72
5. Técnicas <i>in vitro</i> .....	73
6. Comparación de las técnicas del índice fecal e <i>in vitro</i> .....	73
A. Evidencia experimental .....	73
B. Evaluación de las dos técnicas .....	77
7. Conclusiones .....	78
III. Factores que Influyen en el Consumo de los Animales en pastoreo .....	79
1. Consideraciones generales .....	79

	Página
2. Grado de aceptación del material vegetal y su efecto en el consumo .....	81
<b>IV. Problemas que se Encuentran en el Empleo de Animales con Fístulas del Esófago .....</b>	<b>83</b>
1. Consideraciones generales .....	83
2. Fuentes de error en la obtención de muestras representativas de la dieta .....	84
A. Variación diurna en la composición de la dieta .	84
B. Variación entre días y entre animales .....	85
C. El efecto de la edad, sexo, raza, especie y condición fisiológica del animal, sobre la composición de la dieta seleccionada .....	87
D. Experiencia previa del animal en pastoreo ....	88
E. Resumen sobre los errores de muestreo debidos a los animales .....	89
3. Recolección y preparación de las muestras .....	89
A. Pérdidas durante la recolección y preparación ..	89
B. Composición de las muestras del esófago comparadas con la composición del forraje consumido	92
 Literatura Citada .....	 92
 Apéndice .....	 96
<b>DISCUSION. — D. T. Chambers .....</b>	<b>98</b>
 <b>ESTABLECIMIENTO DE UN SISTEMA DE DIGESTIBILIDAD IN VITRO EN EL LABORATORIO. — R. H. Alexander .....</b>	 <b>101</b>
<b>I. Introducción .....</b>	<b>103</b>
1. Consideraciones generales .....	103
2. Consideraciones específicas .....	103
3. Objetivos de proyecto .....	104
A. Selección de un parámetro de medida .....	104
B. Problema básico .....	105
C. Alcance de los trabajos realizados .....	105

	Página
<b>II. Método</b> .....	106
<b>1. Descripción</b> .....	106
<b>2. Detalles del método</b> .....	107
<b>A. Fuente de inóculo</b> .....	107
a. Extracción y preparación .....	107
b. Efecto de la dieta del animal donante .....	109
c. Suplementación con Nitrógeno .....	110
<b>B. Preparación de las muestras de forraje</b> .....	112
a. Secado del forraje .....	112
b. Molido de las muestras de seca .....	112
i Selección del tamaño de criba .....	112
ii Equipo .....	113
c. Frecuencia y temperatura de secamiento ..	114
<b>C. Obtención de sub-muestras para el análisis</b> ....	116
<b>D. Inoculación y gaseado superficial con CO<sub>2</sub></b> .....	117
a. Equipo .....	117
b. Gaseado superficial de los tubos .....	120
c. Práctica actual .....	121
<b>E. Digestión</b> .....	122
<b>F. Controles de pH</b> .....	123
<b>G. Recobro de los residuos</b> .....	125
a. Alternativas posibles .....	125
b. Práctica seleccionada .....	126
c. Ventajas del método .....	127
d. Operación continua .....	128
<b>III. Discusión Sobre el Método</b> .....	128
<b>1. Efecto de las modificaciones</b> .....	128
A. Contribución de la fase de pepsina .....	128
B. Comparación directa de los métodos .....	130
<b>2. Posibles simplificaciones</b> .....	131
A. Eliminación del ajuste de pH a las 24 horas ...	131
B. Eliminación del ajuste de pH a las 48 horas ...	132
C. Eliminación de tubos de control .....	133
<b>IV. Determinación de la Precisión del Método</b> .....	134
<b>1. Errores en el laboratorio</b> .....	134

	Página
A. Procedimiento analítico .....	134
B. Medidas del tamaño del error .....	135
a. Consideraciones estadísticas y comparación de los errores con los publicados en la lite- ratura .....	135
2. Errores de predicción de los resultados <i>in vivo</i> ....	137
A. Forrajes conservados .....	137
B. Henos .....	138
C. Ensilajes .....	139
V. Conclusiones .....	142
Agradecimiento .....	143
Literatura Citada .....	143
Apéndice .....	145
DISCUSION. — J. V. Bateman .....	146
INDICE DE AUTORES .....	153
INDICE DE MATERIAS .....	155



## INTRODUCCION

Hace dos años, se realizó el Primer Simposio sobre problemas de la Evaluación de Forrajes. Como en esa oportunidad, hemos invitado ahora a un grupo distinguido de científicos de lugares muy variados, líderes todos ellos en sus campos de investigación, para que su vasta experiencia nos permita llegar a los estados más avanzados de la técnica.

Las técnicas *in vitro* han tenido un desarrollo muy rápido y amplio en los últimos años. La relativa sencillez de procedimientos, en comparación con las pruebas *in vivo* atraen la atención de los investigadores para un campo amplio de acción, desde la Fitotecnia a la Zootecnia. Sin embargo, el investigador experimentado sabe que, si bien atractivos y sencillos, también los métodos *in vitro* tienen amplias limitaciones.

Tal vez más importante aún que la necesidad de precisión y standarización de los métodos, es la comprensión adecuada de su significado y la habilidad para emplearlos, en los tipos de investigación que pueden hacer buen uso de ellos. Su aplicación indiscriminada, puede llevar a extrapolar indebidamente condiciones totalmente del laboratorio a resultados de campo.

Los dos aspectos de las técnicas, beneficiosos los unos y peligrosos los otros, decidieron el tema para este Segundo Simposio.

O. L. Paladines  
Octubre, 1966



# **APLICACION DE LAS TECNICAS DE DIGESTIBILIDAD IN VITRO**

**W. F. RAYMOND**  
**The Grassland Research Institute**  
**Hurley, Berkshire**  
**Inglaterra**



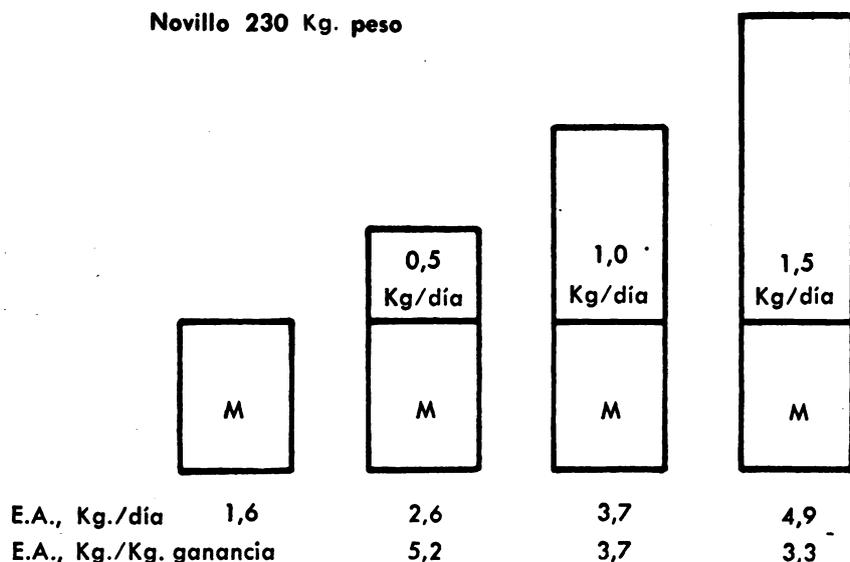
La literatura científica, contiene un número cada vez mayor de referencias al empleo de las técnicas de digestibilidad *in vitro* en las investigaciones sobre pasturas. Sin embargo, antes de discutir la aplicación de estas técnicas, debemos considerar primero el propósito que se sigue al medir la digestibilidad. Me parece especialmente importante discutirlo en relación con el desarrollo agrícola en América Latina, donde el número de problemas que se pueden estudiar son tanto mayores que los recursos científicos disponibles, de modo que, el énfasis se debe poner en esas investigaciones que tendrán el mayor impacto en la producción agrícola.

El objetivo principal de una agricultura basada en las pasturas, es la producción de productos de origen animal (carne, leche, lana y cueros) para uso humano. Este propósito se consigue, alimentando a los rumiantes (principalmente vacunos y ovinos) con pasturas. Desgraciadamente, la mayoría de los rumiantes que se alimentan en todos los países del mundo, son muy ineficientes en convertir el forraje a carne, leche, etc. En general, esto no se debe a la ineficiencia de los animales, sino al hecho de que no están ingiriendo suficiente alimento, es decir, están mal alimentados. Este problema se ilustra en la Figura 1. Antes de que un novillo de 230 kg. pueda ganar peso, debe primero recibir una dieta diaria de mantenimiento de 1,6 kg. de Equivalentes Almidón (E.A.). Solamente cuando el consumo sobrepasa esta cifra se consigue obtener alguna producción del animal. La característica esencial de la Figura 1, es que a medida que el consumo diario de alimento aumenta, no solamente aumenta la ganancia diaria de peso, sino también disminuye marcadamente la cantidad de E.A. necesario por cada kg. de ganancia de peso, en otras palabras, el animal convierte el alimento en forma más eficiente. Sin embargo, si observamos las ganancias promedio de peso de los animales en condiciones prácticas de explotación agrícola, encontramos que en muy pocos sistemas es mayor que 0,5 kg. por día. Cuando hay abundancia de alimento, las ganancias pueden ser mayores, pero estos períodos alternan con otros de escasez (sequía, invierno, etc.) y resultando en la línea irregular de aumentos, característica de la mayoría de las áreas de producción de ganado vacuno del mundo, con el resultado de que muchos animales tienen 4 a 5 años de edad antes de alcanzar el peso

---

En buena parte, el texto de este artículo se basa en el artículo "Studies of herbage digestibility by an *in vitro* method", publicado por W. F. Raymond y R. A. Terry, en *Outlook on Agriculture* 5(2):60-68. 1966.

de mercado. Estos animales, son muy ineficientes en convertir el alimento que consumen en productos de consumo humano; así, la Figura 1 indica que un novillo que gana solamente 0,5 kg. por día, usa sobre el 60 % del alimento consumido para su mantenimiento, y solamente 38 % para el objetivo principal, que es la producción.



**FIGURA N° 1.** Requisitos de alimento de un novillo de 230 kg. de peso vivo, para mantenimiento y diferentes velocidades de ganancia diaria de peso. Nótese el aumento en eficiencia de conversión del alimento a medida que aumenta la velocidad de ganancia de peso.

En mi criterio, entonces, el mejoramiento primario, no resultará de mantener *más* animales o en producir animales genéticamente *mejores* (a pesar de lo importante que esto puede ser en muchas áreas), sino en aumentar el consumo diario de nutrientes en los animales que se alimentan. Estos animales producirán más carne (o leche), cada día y por tanto convertirán el alimento más eficientemente. En la industria de animales no-rumiantes (cerdos y aves), se ha reconocido desde hace mucho tiempo, la importancia de la eficiencia de conversión del alimento; solamente ahora empezamos a darnos cuenta de que es igualmente importante para la alimentación eficiente de los rumiantes.

Así podemos ver que, para conseguir una alta eficiencia en los sistemas de alimentación con pasturas, es esencial el consumo diario

elevado de nutrientes por los animales. Una vez que sepamos como conseguirlo, será más valioso el producir e introducir mejores forrajes y fertilizarlos adecuadamente. Pero si estos forrajes mejorados se continúan ofreciendo a los animales ineficientes y de baja producción que se encuentran en la mayoría de nuestros sistemas de producción animal, se perderá la mayor parte de su ventaja potencial.

Este análisis simple dirige nuestra atención al consumo de nutrientes como un tema crucial de estudio; es útil considerar que:

$$\text{Consumo de nutrientes} = \text{Consumo de materia seca} \times \text{Digestibilidad} \times \text{Utilización (1)}$$

(La "Utilización" mide la eficiencia con la cual los nutrientes digeridos son empleados para el tipo de producción animal requerido, en términos de niveles de proteína, minerales, ácidos grasos volátiles del rumen, etc.)

En la mayoría de los sistemas de alimentación de rumiantes, el nivel de producción es bajo porque el consumo es bajo (los animales no consumen suficiente materia seca) y lo que consumen es de baja digestibilidad. Es en este aspecto que vemos la gran importancia de la digestibilidad de los forrajes, porque en general, los animales pueden tener consumo más alto de forrajes de alta digestibilidad que de forrajes de baja digestibilidad. En otras palabras, a medida que el forraje se hace más digerible, el consumo también tiende a aumentar, produciéndose como resultado un aumento marcado en el consumo de nutrientes digeribles.

Claramente, otros factores (como los incluidos en el Índice de Valor Nutritivo (I.V.N.), que será discutido por el Profesor Donefer, y el grado de aceptación y disponibilidad del alimento, que serán discutidos por el Dr. Arnold) ejercen un efecto también marcado en el consumo de nutrientes. Sin embargo, parece que un factor primordial en determinar el consumo de nutrientes en los forrajes, es su digestibilidad, de tal forma que, el conocimiento de la digestibilidad de los forrajes no es necesariamente un estudio de naturaleza académica. Estrechamente integrada con las investigaciones sobre producción de forrajes y alimentación del ganado, el estudio de la digestibilidad de los forrajes, puede jugar un papel esencial en el desarrollo de sistemas más eficientes de producción animal.

## METODOS DE LABORATORIO PARA ESTIMAR LA DIGESTIBILIDAD DE LOS FORRAJES

El único dato preciso sobre la digestibilidad de un alimento en particular, por un animal en particular, es aquel medido cuando el alimento es ofrecido a ese animal. En la práctica, sin embargo, el

número de alimentos que deben ser probados, es mayor que la posibilidad de medirlos en experimentos con animales y en muchos casos, la cantidad de alimento disponible es muy pequeña para realizar esas pruebas, de manera que se ha dedicado mucho esfuerzo a la investigación de métodos de laboratorio para estimar la digestibilidad de los forrajes, los cuales sean adecuados para examinar muestras pequeñas de muchos forrajes. A partir de estos valores de digestibilidad se puede derivar valores de Nutrientes Digestibles Totales, Equivalentes Almidón y Energía Neta. Las relaciones más frecuentemente estudiadas, son entre la digestibilidad de un forraje y su contenido de fracciones químicas, tales como proteína cruda, fibra cruda, celulosa y lignina (24, 27).

Si bien, se puede encontrar una relación más o menos cercana entre la digestibilidad, y por ejemplo, el contenido de lignina del forraje, a medida que la planta madura, la misma relación no es necesariamente válida para primeros crecimientos y para crecimientos posteriores de la misma especie y para diversas especies, como por ejemplo leguminosas y gramíneas (25). El grado de digestión que las plantas sufren en el rumen, no solamente depende del contenido de "fibra" química, sino también de la distribución física de ésta en la planta. Los métodos puramente químicos, no parecerían ser capaces de tomar en cuenta este factor, con excepción posible del análisis gradual (15).

Las limitaciones de los métodos químicos, han estimulado el interés en encontrar un método biológico, en el cual, la muestra de forraje sea digerida por los microorganismos del rumen, para introducir así tanto la composición química como la estructura física. A partir de los estudios realizados por Marston (20) y otros (26), se han propuesto hasta el momento muchas técnicas de "rumen artificial", las cuales varían en complejidad. Warner (35), ha indicado los problemas que se encuentran al tratar de simular los procesos que se producen dentro del rumen. La mayoría de los investigadores, parecerían dispuestos a aceptar técnicas que produzcan resultados similares a los obtenidos *in vivo*. Estas técnicas, deberían ser descritas como técnicas *in vitro*, antes que como técnicas de "rumen artificial". En ellas, una pequeña muestra molida del forraje (generalmente de 0,5 a 2,0 g) se incuba bajo condiciones controladas, con mezcla de microorganismos obtenidos del rumen de una oveja o novillo provisto con fistula del rumen. La determinación de la digestibilidad de la materia seca, materia orgánica o celulosa del alimento, se realiza a partir de los pesos de estos elementos en la muestra y el residuo decantado luego de la incubación. Los valores se corrigen para el residuo obtenido con el inóculo del rumen solo.

Recientemente, se comparó en 17 laboratorios de los Estados Unidos de Norte América (5), la digestibilidad de una serie de forrajes, empleando sus propias técnicas *in vitro*. La digestibilidad promedio después de 24 horas de incubación se extendió desde 40,0 a

63,9 % para la celulosa y de 38,7 a 53,3 % para la materia seca. A las 48 horas de incubación, la dispersión fue menor, pero todavía fue muy elevada. Una parte de las diferencias se podría atribuir al período de tiempo que transcurría, en cada técnica, entre la preparación del inóculo y la máxima actividad de digestión. Las diferencias en este tiempo se deben a la manera de preparar el inóculo del rumen (filtrado, lavado, centrifugado, etc.). Sin embargo, se puede atribuir también, a otros factores como el grado de control del pH y en algunos casos a diferencias en el gaseado con CO<sub>2</sub>. Estos resultados indican claramente que hay necesidad de standarizar las técnicas cuando se van a comparar los resultados de varios centros de trabajo.

### METODO DE DIGESTIBILIDAD *IN VITRO* DE DOS FASES

En tanto que, los métodos más efectivos de digestibilidad *in vitro*, han producido resultados muy cercanos a la digestibilidad *in vivo* de la celulosa, la digestibilidad de la materia seca y orgánica determinadas *in vitro*, han sido mucho menores que *in vivo*, especialmente con gramíneas y leguminosas de alto contenido de nitrógeno. Trabajos realizados en Hurley (31), sobre la digestión enzimática de las fracciones nitrogenadas de los forrajes, indicaron que ésta se realizaba en forma mucho menos efectiva, cuando era incubada con el inóculo del rumen que dentro del animal mismo. La digestión microbiana del rumen, en el animal, es seguida por la digestión enzimática del abomaso e intestino, con la cual, se destruye la mayoría de las proteínas del alimento y de las bacterias, que no fueran atacadas en el rumen. En el "rumen artificial", por el contrario, las proteínas no digeridas del alimento y los microorganismos, quedan en el residuo y son estimadas como parte indigerida, produciendo como consecuencia, una baja estimación de la digestibilidad. Como era de esperarse, las mayores diferencias se encontraron en gramíneas y leguminosas de alto contenido de nitrógeno. Se investigó por tanto, la posibilidad de seguir la digestión por los microorganismos del rumen con una digestión en pepsina ácida. Tilley y colaboradores (31) y Tilley y Terry (32), encontraron que la digestibilidad de la materia seca medida por este método de dos fases, coincidía en forma cercana con la digestibilidad de forrajes verdes, determinada *in vivo*. La relación encontrada en 148 forrajes, los cuales iban desde 47 a 83 % de digestibilidad, incluyendo leguminosas y gramíneas fertilizadas con varios niveles de nitrógeno, fue la siguiente (ver Figura 2):

$$\text{Digestibilidad in vivo de la materia seca} = 0,99 \times \frac{\text{digestibilidad in vitro de la materia seca}}{\text{de la materia seca}} - 1,01 \quad (2)$$

$$S_{y.x} = \pm 2,31^{(1)}$$

Detalles precisos de la técnica empleada en Hurley han sido publicados anteriormente (32). En resumen, una muestra de 0,5g del forraje seco se incuba con una solución buffer mezclada con el inóculo del rumen previamente filtrado, para retirar los materiales más groseros. La incubación se mantiene por 48 horas a temperatura de 38°C ajustando el pH, a intervalos entre 6,7 — 6,9. El sistema se mantiene anaerobio, por medio de una válvula simple que permite la salida de los gases de fermentación al mismo tiempo que impide la entrada de aire. El residuo indigerido después de las 48 horas de incubación, se centrifuga y lava para luego ser incubado a 38°C por 48 horas más, bajo pepsina ácida; finalmente, el residuo se filtra, lava, seca a 100°C y pesa. Se mantiene al mismo tiempo tubos de control, que contienen únicamente el inóculo del rumen y el buffer. El peso promedio del residuo de los controles se descuenta del residuo de las muestras, para determinar el peso de residuo debido a las muestras únicamente.

La digestibilidad se calcula entonces:

$$\text{Digestibilidad de la materia seca} = \frac{\text{peso de la muestra} - \text{peso corregido del residuo}}{\text{peso de la muestra}} \times 100 \quad (3)$$

Si se determina la materia orgánica o celulosa de las muestras y residuos, se puede calcular la digestibilidad de estos componentes.

Comparaciones realizadas recientemente por Armstrong y colaboradores (2), entre las predicciones del valor nutritivo de los forrajes por un método *in vitro* (modificado del método de dos fases de Hurley (1) y por la determinación química de lignina, indican que la desviación standard residual de la regresión, entre energía metabolizable y digestibilidad *in vitro*, fue de  $\pm 0,083$  comparado con  $\pm 0,134$  para la regresión, entre energía metabolizable y contenido de lignina de los pastos.

#### Validez de los resultados de digestibilidad *in vitro*

Debe reconocerse que el sistema de digestibilidad *in vitro* de dos fases, que se ha descrito, no simula exactamente la digestibilidad

(1) El error residual de la regresión no constaba en el artículo original y fue agregado por el Editor.

*in vivo*. Además, en vista de que el sistema fue desarrollado y probado primordialmente con forrajes verdes, las condiciones standard adoptadas pueden no aplicarse a toda clase de alimentos. Hay dos clases de errores que deben ser considerados: errores derivados de standarización inadecuada y errores provenientes del uso del método en alimentos inadecuados.

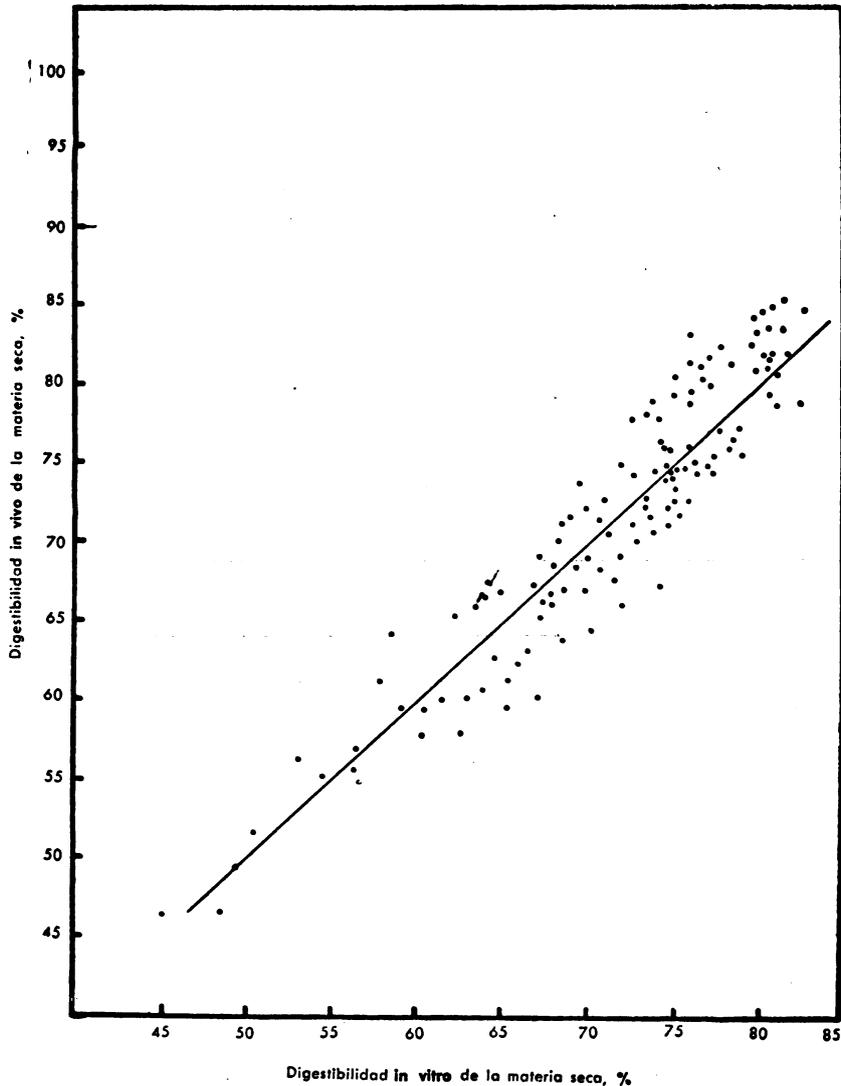


FIGURA N° 2. Relación entre las digestibilidades in vivo e in vitro de forrajes (32).

## Standarización del método *in vitro*

Este tema será discutido en mayor detalle en el artículo del Sr. Alexander, pero quisiera referirme aquí brevemente a nuestras experiencias en Hurley.

Tilley y Terry (32), estudiaron algunos factores que pueden afectar la constancia del método. Sus resultados indican que el grado de molienda de la muestra (excepción hecha del molido con molino de cilindros) y la temperatura de secado, hasta 105°C, tenían poco efecto. El control rígido del pH y la exclusión del aire, fueron importantes. Algunos investigadores han igualado cuidadosamente el régimen alimenticio de los animales donantes del inóculo, pero experimentos realizados recientemente, han demostrado que esta variable tiene relativamente poco efecto (véase Cuadro 1, pero también Cuadro 2). El método más conveniente en la práctica, es obtener licor del rumen de un animal alimentado con heno de calidad media. En este licor, las partículas grandes pueden separarse fácilmente y el inóculo no causa inconvenientes en la capacidad buffer del sistema *in vitro*.

CUADRO N° 1. — Efecto de la fuente de inoculante del rumen sobre la digestibilidad medida *in vitro*.

Digestibilidad *in vitro* de la materia seca cuando  
ovejuna donante recibía:

	Alfalfa, verde	Ryegrass, verde	Ryegrass, ensilaje	Gramínea, heno
	%	%	%	%
Muestra 1	75,3	76,1	76,8	75,8
Muestra 2	49,4	53,9	49,4	50,0

Se ha encontrado buena concordancia en análisis repetidos en diferentes momentos o en diferentes laboratorios (véase Cuadro 7). A veces se produce algo de variabilidad debida posiblemente a un mal inóculo del rumen; por esta razón, en cada grupo de muestras analizadas, se deben incluir muestras de digestibilidad alta y baja conocidas, para corregir los resultados.

En contraste a la constancia de los resultados que se encuentra *in vitro*, debe considerarse la variación encontrada en las determinaciones *in vivo*. La diferencia, se produce en parte por la variación

biológica normal entre animales experimentales, pero principalmente porque, en efecto, la digestibilidad *in vivo* no es constante. Así, según Blaxter (7), a medida que el nivel de consumo aumenta, la digestibilidad del alimento disminuye. Claramente, el método *in vitro* mide un atributo básico del alimento y no puede considerar los cambios en la digestibilidad, que se producen por cambios en el régimen alimenticio. A pesar de la concordancia de valores *in vitro* e *in vivo* obtenidos con la ecuación (2), esta relación no se puede emplear para estimar adecuadamente el grado hasta el cual, un animal particular digerirá un forraje consumido.

Por esta razón, Tilley y Terry (32) han preferido expresar sus resultados como digestibilidad *in vitro*, antes que poniéndolos en la forma *in vivo*. En muchos casos, los valores de digestibilidad son usados como valores relativos. La constancia en los resultados *in vitro*, la cual se discute más adelante, es prueba de la utilidad de este procedimiento. Cuando se predice la digestibilidad *in vivo*, a partir de los resultados *in vitro*, debe recordarse que, puede haber discrepancias mayores que el error indicado en la ecuación (2).

CUADRO N° 2. — Digestibilidad *in vitro* de muestras de pasto dulce (*P. laevipolium*) y ryegrass S.24, con diferentes inóculos del rumen y efecto de la suplementación con 6 mg. de nitrógeno como urea.

	Digestibilidad <i>in vitro</i> , cuando la oveja donante recibía:			
	Heno	Paja	Heno	Paja
	%	%	%	%
			+ N	+ N
Pasto dulce	47	26	47	46
Ryegrass S.24	74	61	74	73

#### Rango de aplicación del método *in vitro* de dos fases

Las condiciones para el análisis que han sido descritas, fueron aceptadas, porque daban estimaciones cercanas entre la digestibilidad de los forrajes *in vitro* e *in vivo*. Ahora sabemos que estas condiciones pueden no ser las más apropiadas para todos los alimentos de los rumiantes. Particularmente pueden tener diferente digestibilidad *in vivo* que *in vitro*, ciertos alimentos cuya digestión *in vivo* se realiza a pH del rumen significativamente diferente del rango esco-

gido para este método (6, 7 a 6, 9). En otros casos, el contenido de nitrógeno del alimento puede ser muy bajo, para permitir la digestión completa en el método *in vitro*, especialmente si el inóculo del rumen es también bajo en contenido de nitrógeno. Se midió la digestibilidad *in vitro* de los pastos *Panicum laevipolium* (pasto dulce obtenido en Sud Africa) que tiene baja digestibilidad y contenido medio de nitrógeno, empleando para la digestión inóculo del rumen de ovinos alimentados con heno (1, 5% N) o paja (0,5 % N). También se estudió en ese experimento, el efecto de agregar 6 mg. de nitrógeno en forma de urea a cada tubo (Cuadro 2). En los dos pastos, la digestibilidad *in vitro* fue igual a la obtenida *in vivo*, cuando se empleó el inóculo de heno; los valores no aumentaron con el agregado de urea, indicando así una cantidad suficiente de nitrógeno en los dos sistemas. Con el inóculo de paja, en cambio, la digestibilidad de los dos pastos disminuyó; la disminución fue importante en el pasto dulce, pero aumentó al nivel *in vivo* con la adición de urea. Estos resultados demuestran, la importancia de poner un nivel adecuado de nitrógeno en el sistema de fermentación y el efecto de la suplementación con nitrógeno, si el nivel es bajo. En vista de estos resultados, ahora se agregan 16 mg. de nitrógeno (en forma de urea) a la solución buffer de cada tubo en el sistema *in vitro* de Hurley. Una adición similar de nitrógeno se realiza en el sistema que describirá el Sr. Alexander. *In vivo*, el animal consigue un efecto más o menos similar, recirculando urea en la saliva. Sin embargo, en algunos forrajes sabemos que la recirculación no es suficiente, ya que se puede aumentar la digestibilidad *in vivo*, agregando suplementos nitrogenados a la dieta. En estos forrajes, es poco probable que el sistema *in vitro* dé resultados válidos.

## ESTUDIOS EXPERIMENTALES CON EL METODO *IN VITRO*

### Efecto del pH del rumen sobre la digestión de la celulosa

Se reconoce que el grado hasta el cual la fibra de un forraje es digerida *in vivo*, depende de la naturaleza de los otros componentes de la dieta. Particularmente, los suplementos que contienen carbohidratos fácilmente utilizables, reducen la digestibilidad de la fibra. A veces se ha querido explicar la menor digestibilidad, aduciendo a la digestión preferencial de los azúcares y el almidón del suplemento; pero, también la adición de estos suplementos causa una disminución en el pH del rumen (8), el cual puede estar asociado a la disminución.

Al establecer el sistema de digestibilidad *in vitro*, se seleccionó el rango de pH 6,7 a 6,9 por ser el representativo del pH del rumen

de ovinos alimentados con gramíneas. Posteriormente se ha demostrado que hay un rango mucho más amplio de pH *in vivo*; el pH del rumen de ovinos alimentados en Hurley con forrajes de alto contenido de hidratos de carbono solubles ha sido hasta el 5,5 poco tiempo después de ofrecido el alimento, y se ha encontrado pH tan altos como 7,0 en ovinos alimentados con heno de baja calidad. Se encuentran pH menores de 5,5 cuando se suplementa la dieta de forraje, con granos ricos en almidón, como por ejemplo maíz (8). Consecuentemente, se realizaron experimentos *in vitro* para determinar la digestibilidad de la fibra en muestras repetidas del mismo forraje que fueron incubadas a niveles controlados de pH entre 5,5 y 8,0. También se midieron las fracciones solubles y las digeridas por pepsina ácida; la suma de éstas, más la fibra digerida da la digestibilidad total de la materia seca, a cada nivel de pH. En la Figura 3, se muestran los cambios en la digestibilidad de una muestra de pasto ovillo (*Dactylis glomerata*) a diferentes niveles de pH. La digestibilidad

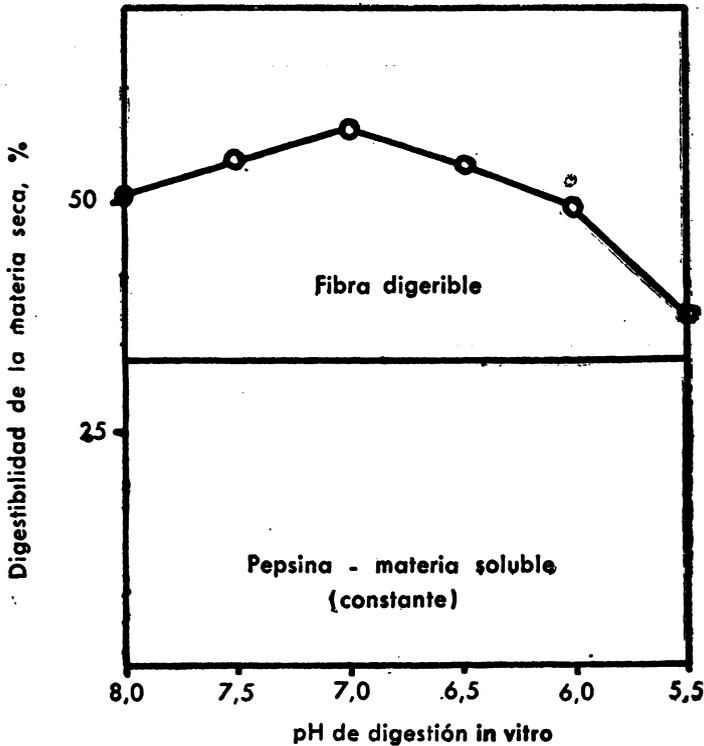


FIGURA N° 3. Porcentaje de fibra digerible en una muestra de pasto ovillo incubada *in vitro* a diferentes valores de pH (33).

de la fibra se redujo a pH mayores y menores que 6,8, la disminución fué más marcada a niveles inferiores de pH, los cuales coincidirían con los obtenidos cuando se alimenta con dietas que contienen hidratos de carbono fácilmente asimilables.

Otros experimentos han estudiado la celulosa digerida bajo diferentes tiempos de incubación y a diferentes niveles de pH (Cuadro 3). Después de 48 horas de incubación, la digestibilidad de la celulosa era menor a pH 6,0 que a 6,8, pero los valores fueron similares después de 96 horas de incubación y estaban de acuerdo en general con los valores obtenidos *in vivo*. Cuando se redujo el pH a 5,5, la digestibilidad de la celulosa fue menor incluso después de 96 horas de digestión (33).

CUADRO N° 3 — Celulosa digerida en muestras de ryegrass S.24 incubado *in vitro* a diferentes niveles de pH. Porcentaje de la materia seca (33).

Muestras	pH 6,8			pH 6,0			pH 5,5		
	24	48	96	24	48	96	24	48	96
	%								
1 ( <i>in vivo</i> 23%)	8	17	21	6	11	20	2	5	8
2 ( <i>in vivo</i> 21%)	8	16	19	5	10	17	1	5	7
3 ( <i>in vivo</i> 21%)	10	18	22	6	13	19	4	6	9
4 ( <i>in vivo</i> 21%)	10	19	22	6	11	18	3	5	6
5 ( <i>in vivo</i> 19%)	9	16	19	4	10	15	2	3	5

Debe aceptarse que la forma en que se realiza la digestión en el sistema *in vitro*, es diferente a la forma *in vivo*, especialmente en periodos prolongados de digestión, pero los experimentos nombrados demuestran que la velocidad de digestión, de la celulosa disminuye cuando el pH se aparta de 6,8. La digestibilidad de la celulosa disminuye particularmente, cuando el pH es bajo, lo cual puede ayudar a explicar la reducción en la digestibilidad *in vivo* de la celulosa, cuando los forrajes son alimentados con suplementos que conducen a niveles bajos de pH en el rumen.

Estos experimentos sirven también para demostrar que, no puede esperarse que los sistemas *in vitro* reproduzcan los valores obtenidos *in vivo*, pues necesitan standarizar sus niveles de pH, tiempo de incubación, etc. Así no parece muy factible que el método dé resul-

tados satisfactorios en forrajes ofrecidos con suplementos. Inclusive con forrajes solos, se pueden producir discrepancias cuando el pH del rumen *in vivo*, es apreciablemente diferente del pH establecido para el análisis *in vitro*.

#### Velocidad de digestión en los sistemas *in vitro*.

En los últimos tiempos, se ha puesto mucha atención a la velocidad con la cual se digieren los forrajes, por cuanto parece que ésta tiene un efecto importante sobre la cantidad de forraje que un animal es capaz de consumir. Así, Camplig (9) y Crampton *et al.* (11), han sugerido que el consumo voluntario, está controlado principalmente por la velocidad a la cual se produce la digestión de la fibra en el rumen y por la cantidad de fibra indigerida que debe atravesar el resto del sistema digestivo.

El método *in vitro* es una técnica fácil para estudiar la velocidad de digestión de varias fracciones químicas del forraje. Sub-muestras del forraje, son incubadas por tiempos diferentes con microorganismos del rumen y se determina por medio de una curva, la velocidad con la cual se realiza la digestión "completa". La Figura 4 (a) muestra la cantidad de celulosa que fue digerida después de tiempos de incubación que variaron entre 6 y 48 horas; se examinaron, muestras de forraje tierno (contenido bajo de celulosa) y maduro (alto nivel de celulosa) de ryegrass S.24 y pasto ovillo S.37. La cantidad de celulosa que fuera digerida en un momento dado fue muy similar para las dos muestras de ryegrass y pasto ovillo, a pesar de que la celulosa del ryegrass fue digerida un poco más que del pasto ovillo. Cuando se expresó la digestibilidad como porcentaje de la cantidad presente en la muestra al comienzo, la celulosa del forraje tierno fue digerida a un grado mucho mayor que del forraje maduro y la del ryegrass más digerida que el pasto ovillo (Figura 4 b).

El hecho de que se obtenía una cantidad más o menos constante de celulosa digerida, *in vitro*, sugirió la posibilidad de que la digestibilidad de la celulosa sea más bien un reflejo de la naturaleza del sistema (pH, temperatura, etc.), antes que represente alguna característica intrínseca del forraje; pero, en pruebas posteriores, con otras especies de forrajes, se ha obtenido un rango más amplio de pesos de celulosa digerida, que los que se presentan en la Figura 4a. Especialmente, se ha encontrado que el pasto timothy (*Phleum pratense*) contiene una cantidad apreciablemente mayor de celulosa digerible (25%) que el pasto ovillo o ryegrass. En pruebas con animales, el consumo de timothy es menor que lo esperado a partir de su digestibilidad; la posible asociación entre estos resultados está siendo investigada.

En estos estudios, se ha puesto el mayor énfasis en la digestibilidad de la celulosa, tal vez debería prestarse más atención a la fracción he-

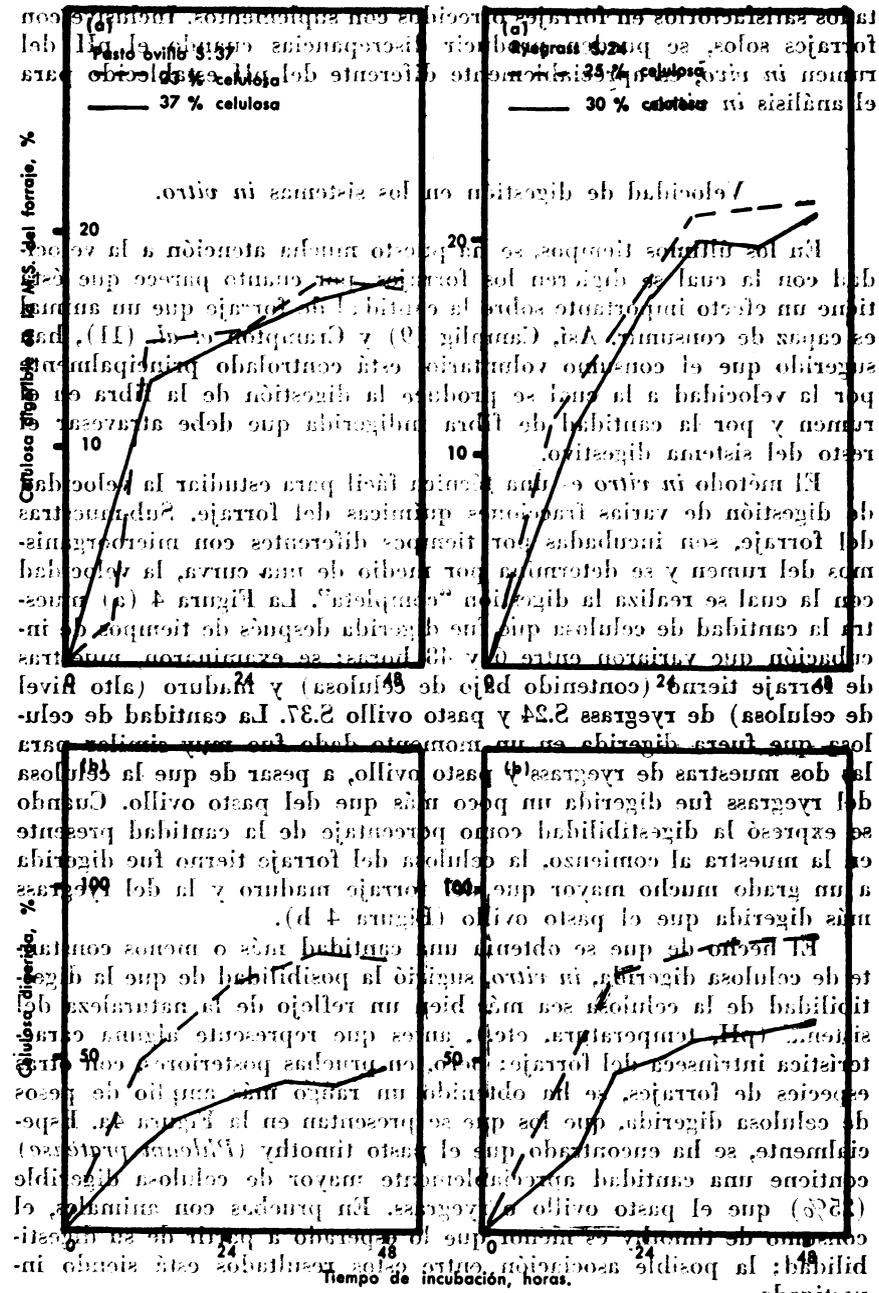


FIGURA N.º 4 (a). Peso de la celulosa digerida en muestras tiernas y maduras de yegras y pasto ovillo, expresado en porcentaje del peso de la celulosa digerida en el tiempo 0. (b). Porcentaje de la celulosa digerida en las muestras maduras de la

micelulosa. En gramíneas tiernas, hay una cantidad considerablemente menor de hemicelulosa que celulosa. A medida que el pasto madura, el contenido de hemicelulosa aumenta más rápidamente que el de celulosa, mientras la digestibilidad del pasto disminuye (con mayor) rapidez. Como resultado, la cantidad de hemicelulosa indigerible en la planta madura, puede ser similar a la celulosa indigerible (18, 33), debiéndose tomar este factor en consideración en cualquier teoría que trate de explicar el nivel máximo de consumo voluntario, a partir del "bulto" que forma el forraje.

### Producción de ácidos grasos volátiles en el sistema *in vitro*

Los ácidos grasos volátiles (acético, propiónico y butírico), son producidos durante la fermentación de los alimentos en el rumen y forman una fuente de mucha importancia en la provisión de metabolitos energéticos para el rumiante. Los ácidos grasos, son empleados con diferente eficiencia relativa para diversos procesos metabólicos y son además producidos en diferentes proporciones relativas, por diferentes alimentos. Por lo tanto, puede ser importante conocer las proporciones en que éstos son producidos por diferentes alimentos (7). Se ha sugerido que se empleen las técnicas *in vitro* para este propósito, pero su validez todavía no ha sido probada completamente.

El énfasis mayor, ha caído en las proporciones de ácidos acético y propiónico. Los alimentos fibrosos de baja digestibilidad, producen relaciones alrededor de 7:2, pero a medida que se aumenta a la ración suplementaria de alto nivel de hidratos de carbono, la relación se reduce llegando cada unidad cuanto la ración está formada basados solamente de concentrados (4). Al mismo tiempo, la digestibilidad de la dieta aumenta. Existen divergencias de esta tendencia generadas en las dietas de alta digestibilidad y forrajes de alto contenido de nitrógeno (por ejemplo, trébol blanco), pueden producir relaciones elevadas de acético:propiónico.

Los cambios en las proporciones de ácidos presentes en el rumen, parecen estar relacionados con el pH del rumen; la proporción de ácido acético, tiende a disminuir y la de propiónico a aumentar, a medida que se produce una caída en el pH del rumen y los ensilajes y trébol blanco que se anotaron arriba, producen niveles elevados de pH en el rumen. Experimentos realizados en Hurley, han indicado también que el pH del rumen tiende a disminuir con una disminución de la relación acético:propiónico, cuando aumenta el nivel de consumo de ciertos alimentos. No sugerimos que los cambios en la composición de los ácidos sean una consecuencia directa de los cambios de pH en el rumen, sin embargo, no parecería que un sistema *in vitro* de digestibilidad operado a un pH standard, pueda ser adecuado para la predicción de los ácidos que se producen *in vivo* en el rumen. Se puede esperar que

una disminución en el pH del sistema *in vitro*, conduzca a una disminución en la relación acético: propiónico como sucede *in vivo*. Esta situación se encontró en Hurley, cuando se fermentaron azúcares puros (Cuadro 4).

**Cuadro N° 4.** Proporciones molares de ácidos acético, propiónico y butírico, producidos de sustratos de sucrosa y xilosa, fermentados en el sistema *in vitro*, controlado a 3 niveles de pH.

	Acético	Propiónico	Butírico	pH
	% molar			
Sucrosa	48	34	18	6,0
	54	30	16	6,5
	56	29	15	7,0
Xilosa	49	34	17	6,0
	55	28	17	6,5
	58	28	14	7,0

Para obtener resultados válidos, el análisis *in vitro* debe realizarse al mismo pH que se encontraría *in vivo* con ese alimento y posiblemente inoculado con jugo del rumen, de un animal alimentado con el mismo alimento. En este caso, parecería más simple el hacer medidas de los ácidos grasos en el rumen *in vivo*, por lo menos hasta que se hayan desarrollado sistemas de "rumen artificial" más complejos, que simulen en forma más semejante los procesos dinámicos de digestión y absorción.

#### Estudios de digestibilidad con especies forrajeras

Por mucho tiempo se había sabido que la digestibilidad del forraje disminuye a medida que madura, pero recién en 1950 Homb (17) sugirió la posibilidad de predecir la digestibilidad a partir del estado de madurez. Posteriormente, Minson y colaboradores (21, 22), demostraron que cada variedad de forraje tiene una relación característica, entre el estado de madurez y la digestibilidad. La digestibilidad disminuye muy lentamente, en algunas variedades de ryegrass y pasto ovido, hasta que aparece la primera yema floral para luego disminuir más rápidamente. Las variedades de ryegrass

que se probaron (S.23 y S.24) fueron consistentemente más digeribles que las variedades de pasto ovido (S.37 y Germinal) cuando se cortaron en el mismo estado de crecimiento.

CUADRO N° 5. — Digestibilidad *in vitro* y proporción de partes de plantas de ryegrass S.24, cortadas en estados sucesivos de madurez (29).

Fecha de corte	Hoja lámina	Hoja vaina	Tallo	Flor	Planta entera
	%	%	%	%	%
Abril 27 ..	84 (70) *	88 (25)	— ( 5)	— ( 0)	85
Mayo 11 ... (emergencia floral)	83 (41)	82 (30)	85 (26)	— ( 3)	83
Mayo 19 ..	82 (34)	77 (18)	75 (37)	83 (11)	79
Mayo 29 ..	79 (21)	72 (14)	71 (48)	75 (17)	74
Junio 11 ..	78 (13)	68 (11)	64 (52)	71 (24)	68
Disminución en la digestibilidad/día	0,13	0,44	0,68	0,55	—

\* Porcentajes del peso seco total

Fue interesante notar que, la digestibilidad de estos forrajes determinada *in vitro*, dió un panorama igual al *in vivo* y en especial que las variedades de ryegrass fueron más digeribles que las de pasto ovido (Figura 5). Una coincidencia similar se ha encontrado con otras especies (29), lo cual ha permitido comenzar un estudio completo sobre las relaciones de la digestibilidad. El método *in vitro*, ha sido también de valor en el estudio de los mecanismos causales de esta distribución de la digestibilidad. Se ha determinado separadamente la digestibilidad *in vitro* de varias fracciones, lámina de la hoja, vaina de la hoja, tallo y flor, en plantas tomadas en estados sucesivos de madurez. Los resultados de un estudio de este tipo, se presentaron en el Cuadro 5. En la planta tierna, la lámina de la hoja, la vaina y el tallo son todos de alta digestibilidad, siendo los tallos tiernos, si algo, de mayor digestibilidad que las hojas. A medida que la planta madura, la digestibilidad de las hojas disminuye lentamente (<0,2 unidades/día) pero la digestibilidad de la vaina (0,4 unidades/día) y del tallo (0,7 unidades/día) disminuyen más rápidamente. Al mismo tiempo, aumentan las cantidades relativas

de vaina y tallo en la materia seca total de la planta. Como resultado de los dos factores, la digestibilidad de la planta entera disminuye, lentamente al principio, por la contribución mayor por parte de la hoja de digestibilidad declinante más lenta y luego más rápidamente, a medida que predomina la proporción de vaina y tallo, de digestibilidad declinante más acelerada. La última columna del Cuadro 5, que se calculó a partir de las proporciones y digestibilidades de las fracciones, sigue la distribución característica de la digestibilidad del ryegrass S.24, el cual se ve en la Figura 5.

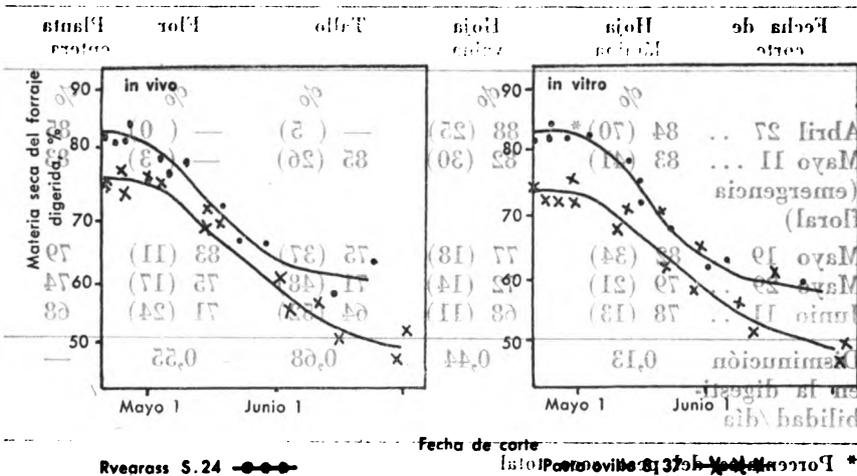


FIGURA N° 5. — Digestibilidad in vivo e in vitro de ryegrass S.24 y pasto ovillo S.37, durante el primer crecimiento.

Fue interesante notar que la digestibilidad de estas forrajes de terminada in vivo, dio un panorama más amplio y en especial el pasto ovillo S.37, demostró la misma tendencia básica, pero en cada caso se encontró que la digestibilidad de las fracciones del pasto ovillo era menor que la de su correspondiente en el ryegrass. Por tanto, se evidenció que la menor digestibilidad del pasto ovillo se debía a que todas sus partes eran menos digeribles que las de la digestibilidad del tallo era menor, como se podría haber esperado. Esta conclusión indicó la posibilidad de obtener variedades de pasto ovillo más digeribles, seleccionando como padres algunas plantas con las fracciones de hojas más digeribles. Esto se discutirá más adelante en el Cuadro 2. En la literatura informal presentados por Ditchard et al (23) y Terry y Tilley (29) sobre estudios detallados de la digestibilidad de fracciones de varias especies. Los dos grupos, han encontrado que la tendencia en la digestibilidad de algunas variedades de timothy es diferente del ryegrass y pasto ovillo, presentando una disminución sostenida pero de menor intensidad, en

La digestibilidad desde el estado más temprano de crecimiento. Esta distribución resulta de la mayor proporción de vainas que tienen las plantas; es muy notable la disminución en la digestibilidad en el crecimiento temprano, está dominada más por la vaina que por la hoja; en la planta más madura, la digestibilidad decrece en forma menor que la de los otros, porque hay una proporción mayor de vaina y poca proporción de hoja verdadera. En los estudios con leguminosas, también se han obtenido resultados interesantes. Se separaron los brotes tiernos y maduros de alfalfa en fracciones de hoja y tallo y en porciones de tallo de 15 cm. medidas desde la parte más alta del tallo. La representación gráfica de los resultados de digestibilidad (Figura 6) indica que las porciones correspondientes de tallo en los brotes tiernos y maduros de alfalfa tienen digestibilidad muy similar, el brote maduro de alfalfa tuvo menor digestibilidad porque contenía 30% más de tallo de digestibilidad muy baja, el cual estaba ausente en el brote más tierno.

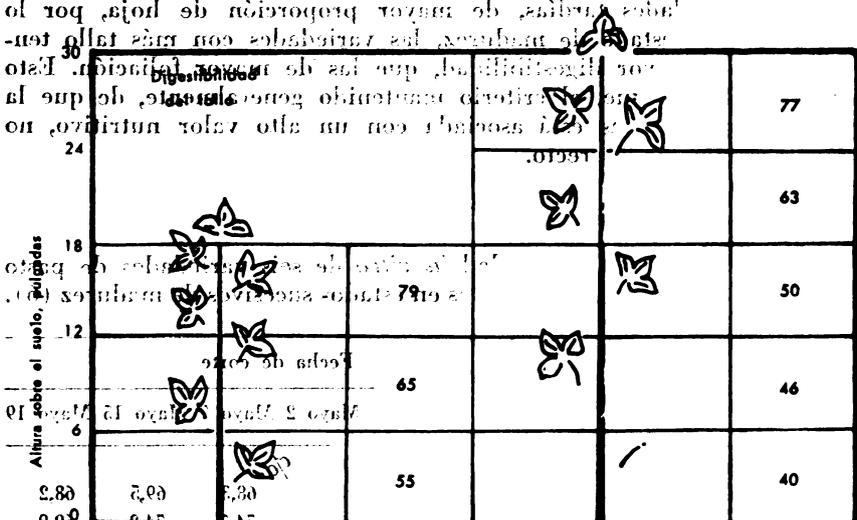


FIGURA No. 6. — Digestibilidad in vitro de diferentes fracciones del tallo de alfalfa tierna y madura (29).

Empleo del sistema *in vitro* en la prueba de variedades

Es completamente imposible determinar la digestibilidad, en experimentos con animales, de todos los cientos de variedades comerciales de gramíneas, leguminosas y otros forrajes, pero el análisis de digestibilidad *in vitro* ofrece un método práctico para

examinar el valor nutritivo potencial y determinar aquellos que merecen un estudio más detallado con animales. Evidentemente, las características agronómicas, como rendimiento total, persistencia, resistencia al frío y a las enfermedades, etc. deben ser consideradas primero. El examen cualitativo de digestibilidad *in vitro* (así como para el contenido de proteína, hidratos de carbono solubles, minerales, etc.), debe realizarse solamente en aquellas variedades que han probado ser satisfactorias agronómicamente. En vista de que un mayor número de variedades comerciales nuevas cumplen con los requisitos agronómicos, es importante disponer de alguna evaluación cualitativa intermedia de la digestibilidad.

El método *in vitro*, se empleó con este propósito por primera vez, en el Instituto Nacional de Botánica Agrícola en Cambridge (13). Estas pruebas, ya han establecido diferencias no sospechadas en la digestibilidad de variedades, particularmente dentro de especies de *Dactylis* (Cuadro 6). Fue de particular interés la conclusión de que, entre variedades comerciales de pasto ovillo, las variedades tempranas, de mayor proporción de tallo, eran en general más digeribles que las variedades tardías, de mayor proporción de hoja, por lo que al mismo estado de madurez, las variedades con más tallo tendían a tener mayor digestibilidad, que las de mayor foliación. Esto es indicación de que, el criterio mantenido generalmente, de que la abundancia de hojas está asociada con un alto valor nutritivo, no es necesariamente correcto.

CUADRO N° 6. — Digestibilidad *in vitro* de seis variedades de pasto ovillo cortadas en estados sucesivos de madurez (6).

Variedad	Fecha de corte					
	Abril 17	Abril 25	Mayo 2	Mayo 7	Mayo 15	Mayo 19
V. Kammekes, temprana	74,4	75,4	74,9	68,3	69,5	68,2
Scotia, temprana	75,3	79,3	78,0	74,7	74,2	69,9
Roskilde II, temprana	72,1	78,0	76,8	70,9	73,3	68,6
S.37, temprana	69,8	73,6	73,3	66,5	68,2	68,1
S.26, temprana	69,3	75,2	75,5	72,1	70,9	70,2
S.143, tardía	67,8	75,5	77,1	73,8	72,6	68,6

Los estudios que han encontrado diferencias en la digestibilidad, entre variedades dentro de especies de forrajes, no han sido todavía confirmados con experimentos de digestibilidad con animales, ni han

sido seguidos con experimentos de producción animal. Además, los datos de digestibilidad, deben interpretarse dentro de sistemas prácticos de alimentación, presentándose el problema de comparar variedades que tienen rendimiento y digestibilidad diferentes. Bajo condiciones de pastoreo, es posible que los efectos del manejo de las praderas sobre el rendimiento y la digestibilidad, sobrepasen las diferencias intervarietales en digestibilidad. Con un manejo a base de cortes, en cambio, se puede tomar en consideración el rendimiento de la pradera y la digestibilidad para decidir la fecha en que se debe realizar el corte, y en este caso, las diferencias en la digestibilidad pueden tener un significado real. Los resultados presentados por Minson y colaboradores (22), sobre seis especies diferentes de forrajes pueden servir para ilustrar el caso. Cuando las seis especies estaban en estado de digestibilidad del 70 % de la materia orgánica, su rendimiento por hectárea fue desde 3900 kg. de materia seca (pasto ovillo Germinal) hasta 6400 kg. (ryegrass H.1). Estos resultados permiten realizar alguna evaluación de la importancia relativa del rendimiento y la digestibilidad, en términos del propósito nutricional para el cual se requiere el forraje.

Ahora se ha hecho evidente otro problema relacionado con la evaluación de variedades (o especies): forrajes que tienen la misma digestibilidad en el primer crecimiento de primavera, pueden ser apreciablemente diferentes en la digestibilidad de los rebrotes subsiguientes. Así, Minson y colaboradores (22), demostraron que el ryegrass italiano S.22, tenía la misma digestibilidad que el ryegrass perenne S.24 en su primer crecimiento a principios de Mayo, pero los rebrotes tomados a través del verano, a intervalos de un mes, tenían 5 unidades de digestibilidad menos que el S.24. Recientemente, Thomson (30) demostró que las variedades de ryegrass italiano S.22 diploide y Tetila Tetrone tetraploide, tenían la misma digestibilidad en la primavera, pero que los rebrotes de las variedades tetraploides, son más digeribles que la diploide, más tarde en la estación.

Evidentemente que, los resultados de digestibilidad de las variedades de plantas forrajeras constituyen solamente un aspecto de la evaluación y deben ser interpretados en términos de rendimiento y distribución estacional del crecimiento, en relación con los requisitos nutricionales impuestos por sistemas individuales de alimentación.

### Producción de nuevas variedades de forrajes

Los trabajos sobre fitotecnia de plantas forrajeras, realizados en la Estación de Fitotecnia de Welsh, enfatizaron el concepto de que, la productividad animal elevada que se obtenía en ciertas praderas permanentes, se debía al elevado contenido de gramíneas macollantes, ricas en hojas, en contraste con las especies de mucho tallo, que

prevalencia en las praderas más pobres. Los resultados experimentales de Fagan y Jones (14) agregaron fuerza a este concepto, cuando encontraron que las variedades de mayor follaje, contenían más proteína cruda y menos fibra cruda que las de menor follaje. Se ha obtenido, sin embargo, muy poca confirmación con experimentos con animales de que las variedades de mayor follaje, al mismo estado de madurez, sean nutritivamente superiores que las de mayor tallo. Milson *et al.* (21) encontraron que el 30 de Mayo (1950), el ryegrass S.32 (65% de hoja) era 10.3 unidades de porcentaje más digerible que el ryegrass S.24 (29% de hoja), pero que al momento de emergencia de la primera yema floral (15 de Mayo y primero de Junio), respectivamente para el S. 24 y S.23, los dos pastos tenían la misma digestibilidad, a pesar de que en este estado, el ryegrass S.23 contenía 65% de hoja contra 54% del S.24. La razón para estos resultados, tal vez inesperados, se ha aclarado con el conocimiento de que en los pastos tiernos, el tallo y la vaina de la hoja tienen digestibilidad por lo menos tan elevada como las hojas, solamente cuando las plantas maduran, el tallo se vuelve menos digerible y en este caso, se puede esperar que las variedades de mayor follaje sean más digeribles (29). Los trabajos realizados de reciente por Bland y Dent (6) (Cuadro 6) han demostrado que una variedad de mayor tallo de pasto ovillo (Roskilde II) puede en efecto ser más digerible que otra de mayor follaje pero de igual tipo de madurez (S. 37) en este caso, tanto la hoja como el tallo de la variedad Roskilde, son más digeribles que la del S.37, en un mismo estado de madurez.

Estos resultados empezaron a demostrar, que en algunos casos, la selección para mayor follaje, podría conducir a seleccionar para una menor digestibilidad. Desde entonces, Cooper *et al.* (10) han encontrado diferencias en la digestibilidad *in vitro* entre clones (genotipos) de pasto ovillo S.37, cortados en el estado vegetativo. Cuando se emplearon como padres los clones más digeribles, la progenie tuvo una digestibilidad superior a la del promedio de la población original, pero parecían iguales en caracteres agronómicos, especialmente en el contenido de hojas. Este trabajo está todavía en marcha en Aberystwyth, pero ha indicado la posibilidad de seleccionar dentro de una población que sea ya satisfactoria en otras características, para mayor digestibilidad.

Producción de nuevas variedades de follaje

Pastoreo selectivo en el campo

Los trabajos sobre el pastoreo selectivo en el campo, sobre las variedades de plantas forrajeras, indican que el sistema *in vitro* puede ser de verdadero valor, es en estudios sobre el pastoreo selectivo de vacas y ovinos. No incluiré aquí una discusión de este tema ya que será considerado en detalle por el Dr. Arnold en el próximo año.

Digestibilidad de otros cultivos forrajeros  
 El presente trabajo se refiere a la digestibilidad de forrajes ofrecidos a ovinos y su digestibilidad *in vivo* (ha estado incluido el estudio de otros forrajes. En cada caso, la digestibilidad *in vivo* fue medida con ovinos y digestibilidad *in vitro* en muestras del mismo forraje, hechas a un 100% de digestibilidad. CUADRO N.º 8. Digestibilidad *in vivo* y *in vitro* de las partes altas y bajas de las plantas de...

CUADRO N.º 7. — Digestibilidad de la materia seca *in vivo* e *in vitro* de brassicas y plantas de maíz realizadas en dos laboratorios (16).

Cultivo	Fecha corte	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>
7.97	8.00	8.00	8.00
7.27	8.00	8.00	8.00
7.17	8.00	8.00	8.00
7.17	8.00	8.00	8.00

G.R.I.\* N.I.A.B.\*\*

	%	
Rábano forrajero	72,0	72,3
Col forrajera	81,2	85,9
Col rizada, mil cabezas (planta entera)	68,2	67,7
Col rizada, mil cabezas (tallo)	62,6	54,3
Col rizada, mil cabezas (hoja)	62,6	43,0
Col rizada, híbrido P.E.L.V.	62,6	79,0
Maíz, variedad temprana	10,10,61	72,5
Maíz, variedad media	10,10,61	72,5
Maíz, variedad tardía	11,10,61	76,9

\* Grassland Research Institute  
 \*\* National Institute of Agricultural Botany  
 Este tema será tratado por el Sr. Alexander en un artículo que aparecerá en el número de marzo de 1951. De la misma manera que nuestros resultados en Harney, él ha encontrado un buen acuerdo entre los valores de digestibilidad *in vitro* e *in vivo* para henos, pero menor acuerdo con los ensayos. Esto pareciera que el cuadro presenta los resultados obtenidos por Harris (16), con cultivos de brassicas. Se encontró un acuerdo en un rango amplio de digestibilidad de las plantas de maíz. El desacuerdo mayor, con el maíz, se debió probablemente al hecho de que las partes indigestibles de la planta por las quejas. El resultado *in vitro* se refiere a todo el tallo, como se tomó la muestra. Los resultados referidos, estimularon a su vez la...

tudio de variedades de brassica. Dent (12), informa sobre los resultados de digestibilidad *in vitro* de algunas variedades de col rizada, demostrando que algunas de ellas son mucho más digeribles que otras (Cuadro 8).

CUADRO N° 8. Digestibilidad *in vitro* de variedades de col rizada y de partes altas y bajas de sus tallos (12).

Variedad	Tallo alto	Tallo bajo	Planta entera
Híbrido P.B.I. ....	85,8	71,8	79,7
Stock comercial 3 ...	80,8	62,2	75,3
Stock comercial 13 ..	79,2	57,4	71,1
Mil cabezas .....	71,4	47,2	71,4

Los análisis del tallo, de las plantas de col rizada, indicaron el efecto dominante que este tiene en la digestibilidad de la planta entera; la superioridad del híbrido P.B.I. se debió principalmente a la mayor digestibilidad de la base del tallo. Los resultados de algunas variedades (16), fueron confirmados con pruebas con animales, pero esto hubiera sido impracticable en toda la gama de variedades que se probaron *in vitro*.

Por otro lado, los resultados obtenidos con maíz forrajero (Cuadro 7), indican que, el método *in vitro*, estimó en exceso la digestibilidad de esta planta, posiblemente porque el elevado contenido de almidón, produjo un pH *in vivo* diferente del que se empleó *in vitro*. Estos resultados, enfatizan el hecho de que es necesario confirmar los resultados *in vitro*, con experimentos con animales, en los primeros estados de las pruebas de forrajes.

#### Digestibilidad de henos y ensilajes

Este tema será tratado por el Sr. Alexander en mayor detalle. De la misma manera que nuestros resultados en Hurley, él ha encontrado buen acuerdo entre los valores de digestibilidad *in vitro* e *in vivo* para henos, pero menor acuerdo con los ensilajes. Esto parecería ser el resultado de cambios en la composición química y pérdidas que resultan del secado de las muestras en la estufa, durante la preparación de las muestras para análisis *in vitro*; tengo mucho interés en ver los resultados que el Sr. Alexander ha obtenido con el sistema *in vitro*, modificado para analizar muestras frescas de ensilaje molido.

## RESUMEN

Se han revisado, algunas de las formas en que los sistemas *in vitro* nos pueden ayudar a comprender el valor alimenticio de los forrajes y nos pueden ayudar en el desarrollo de sistemas de producción animal más eficientes. Debe dejarse bien en claro, que ellos no son un sustituto para los experimentos con animales; me parece que su papel principal es ayudarnos a decidir cuales experimentos con animales tienen la mayor posibilidad de éxito. Por ejemplo, cada año se prueban sobre 100 variedades de forrajes en Cambridge, un número mucho mayor que el que se podría probar con animales. Las pruebas *in vitro*, que se resumieron en el Cuadro 6, permitieron identificar un número pequeño de forrajes de digestibilidad insospechadamente alta. En el caso del pasto ovilla Roskilde II, su digestibilidad elevada ha sido confirmada en experimentos con ovinos, sin embargo, es muy poco probable que esta variedad de pasto ovilla hubiera sido probada con animales, si la selección previa por el método *in vitro*. Claramente, la primera evaluación de las variedades de plantas forrajeras, debe hacerse en base a sus características agronómicas, rendimiento, persistencia, resistencia a las enfermedades, etc. pero los procedimientos *in vitro*, muy posiblemente, pueden jugar un papel útil en las etapas siguientes de la selección.

Finalmente, quisiera comentar brevemente sobre la función relativa de los procedimientos *in vitro* y el procedimiento I.V.N., que será discutido por el Profesor Donefer. Los dos procedimientos nos ayudan a conocer más sobre el consumo de nutrientes, pero mientras la digestibilidad *in vitro*, mide solamente el término "digestibilidad" de la Ecuación (1), el I.V.N. es una medida conjunta de "digestibilidad" y "consumo". Esto significa que, mientras los estudios de digestibilidad darán mayor información sobre los mecanismos biológicos que toman parte (como es el caso del estudio sobre madurez del forraje descrito en el Cuadro 5), el I.V.N. puede dar una medida que tenga relación más directa con el consumo de nutrientes y el potencial de producción animal de los alimentos. Es más, yo creo que las dos medidas son complementarias porque, como lo indicará el Dr. Donefer, el I.V.N. está influenciado principalmente por las características de consumo de los alimentos, y la digestibilidad *in vitro* por sus características de digestibilidad. A pesar de que mi papel en este Simposio ha sido el discutir las técnicas *in vitro*, me parece adecuado agregar lo siguiente: para un laboratorio con *facilidades de análisis limitadas*, si hay que escoger entre establecer el sistema *in vitro* de digestibilidad o un sistema de predicción del I.V.N., creo que escogería primero el método del I.V.N., en parte porque el método de solubilidad con pepsina es tanto menos complicado que la técnica de digestibilidad *in vitro* descrita, pero también porque, en el balance total, creo que el concepto del I.V.N. (que considera el consumo y la digestibilidad), puede tener mayor aplicación inmediata a los problemas de incrementar la producción animal en América Latina.



16. 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.
17. HOMB, T. Norges Landbrukshogskole Foringsforsokene, Beretning 71. 1952.
18. JARIGE, R. y MINSON, D. J. Digestibilite des constituants du ray-grass anglais S24 et du dactyle S37 plus specialement des constituants glucidiques. *Annales de Zootechnie* 13(2):117-150. 1964.
19. LAMBOURNE, I. J., DERIAZ, R. E. y THOMSON, D. J. The use of oesophageal fistulated sheep in grazing studies (H. 357). *In Experiments in Progress* 17. Hurley, Grassland Research Institute, 1964. p. 63.
20. MARTSON, H. R. The fermentation of cellulose *in vitro* by organisms from the rumen of sheep. *Biochemical Journal* 42(4):564-574. 1948.
21. MINSON, D. J., RAYMOND, W. E. y HARRIS, C. E. Studies in the digestibility of herbage. VIII. The digestibility of S37 cocksfoot, S23 ryegrass and S24 ryegrass. *Journal of the British Grassland Society* 15(2):174-180. 1960.
22. ——— et al. The digestibility and voluntary intake of S22 and H.1 ryegrass, S170 tall fescue, S48 Timothy, S215 meadow fescue and germinal cocksfoot. *Journal of the British Grassland Society* 19(3):298-305. 1964.
23. PRITCHARD, G. I., FOLKINS, L. P. y PIGDEN, W. J. The *in vitro* digestibility of whole grasses and their parts at progressive stages of maturity. *Canadian Journal of Plant Science* 43(1):79-87. 1963.
24. RAYMOND, W. E. *In Recent advances in animal nutrition*. Vol. III, London, Churchill, 1965.
25. ——— *In* Mitchell, F. L. ed. *The growth of grasses and cereals*. London, Butterworth, 1965.
26. SHELTON, D. C. y REID, R. L. Measuring the nutritive value of forages using *in vitro* rumen technique. *In International Grassland Congress 8th, Reading, 1960. Proceedings*. Reading, 1960. pp. 524-528.
27. SULLIVAN, F. T. Evaluation of forage crops by chemical analysis. *A critical review*. *Agronomy Journal* 54(6):511-515. 1962.
28. TAYLER, I. G. y DERIAZ, R. E. The use of rumen fistulated sheep and the direct determination of nutritive value of ingested herbage in grazing experiments. *Journal of the British Grassland Society* 18(1):29-38. 1963.
29. TERRY, R. A. y TILLEY, J. M. A. The digestibility of the leaves and stems of perennial ryegrass, cocksfoot, timothy, tall fescue, lucerne and sainfoin as measured by an *in vitro* procedure. *Journal of the British Grassland Society* 19(4):363-372. 1964.
30. THOMSON, D. J. *Animal Production* 1965. In press.
31. TILLEY, J. M. A., DERIAZ, R. E. y TERRY, R. A. The *in vitro* measurement of herbage digestibility and assessment of nutritive value. *In International Grassland Congress 8th, Reading, 1960. Proceedings*. Reading, 1960. pp. 533-537.
32. ——— y TERRY, R. A. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *Journal of the British Grassland Society* 18(2):104-110. 1963.
33. ——— et al. Studies of herbage digestibility using the *in vitro* method (H. 475). *In Experiments in Progress* 16. Hurley, Grassland Research Institute, 1963. pp. 64-67.
34. VAN DYNE, G. M. y TORRELL, D. T. Development and use of the oesophageal fistula. *Reviews Journal of Range Management* 17(1):97-101. 1964.
35. WARNER, A. G. J. Criteria for establishing the validity of *in vitro* studies with rumen microorganisms in so-called artificial rumen systems. *Journal of General Microbiology* 14:733. 1956.

DISCUSION DEL TRABAJO PRESENTADO POR  
EL Sr. W. F. RAYMOND

Encargado de abrir la discusión fue el Dr. OSVALDO L. PALADINES,  
Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA,  
La Estanzuela, Uruguay

O. L. PALADINES:

Hemos tenido el privilegio de escuchar al Sr. W. F. Raymond, disertar sobre un tema en el cual es sumamente versado. El material contenido en su disertación, es buena prueba de la experiencia amplia que él y sus colegas de Hurley tienen en este campo de investigación.

El Sr. Raymond nos ha dado una imagen amplia de la utilidad de las técnicas *in vitro* y la forma como se pueden emplear, además, y esto lo considero muy importante, nos ha indicado algunas de las limitaciones de las técnicas. Creo que vale la pena hacer énfasis en el hecho de que, estas técnicas escapan al campo netamente químico y más bien bordean el campo de la microbiología, en el sentido de que emplean microorganismos para el trabajo de fermentación, sin embargo, la complejidad del sistema microbiológico del rumen, desafía la standarización de sistemas, principalmente, porque el operador puede controlar ciertas condiciones del animal, como la alimentación, el nivel de consumo de alimento, y puede también controlar algunas características físicas del medio de cultivo, como el pH, la temperatura de incubación, pero no puede controlar, ni determinar el tamaño de las interacciones entre los factores del animal y los factores físicos del método. Los resultados poco alentadores de la reciente comparación de resultados entre varios laboratorios de los Estados Unidos de Norte América y Canadá, es un ejemplo claro de esta limitación.

Sin embargo, debe estar claro en la mente de todos nosotros que los métodos *in vitro*, empleados en forma apropiada, sirven muy bien para medir la digestibilidad de los forrajes. Creo que vale la pena comentar sobre el concepto que están introduciendo los investigadores de Hurley y que nos describe aquí el Sr. Raymond, sobre la capacidad de los sistemas *in vitro* para medir la "cualidad básica" de digestibilidad del forraje, cualidad que, en este concepto, es inde-

pendiente del efecto individual del animal y de los factores de consumo. Su utilidad, por tanto, dependerá de la utilidad que esta "cualidad básica" de digestibilidad tenga en los estudios sobre forrajes, su aprovechamiento por los animales y la producción que se obtenga de ellos. El rango de aplicación disminuiría considerablemente, si la digestibilidad determinada *in vitro* no tuviera valor de predicción de la situación *in vivo*, pues dejaría al descubierto todo los efectos ambientales (incluyendo el nivel de alimentación) y los sistemas de preparación del forraje, sobre su digestibilidad y la productividad de los animales.

En nuestras comparaciones, en Estanduela, entre los valores *in vivo* e *in vitro* de 63 muestras de forrajes (incluyendo forrajes verdes, henos y ensilajes), hemos podido observar que la capacidad de predicción no es igual en todos los tipos de forrajes probados. Las relaciones menos precisas las hemos obtenido con los forrajes frescos (para gramíneas frescas,  $r = 0,75$  y leguminosas frescas,  $r = 0,80$ ), mejorando notablemente las correlaciones en los forrajes secos y en el ensilaje (heno,  $r = 0,91$  y ensilajes,  $r = 0,86$ ). Curiosamente, en cuatro muestras de concentrados, obtuvimos una correlación muy alta ( $r = 0,99$ ). En todo caso, la distribución de nuestras relaciones parece corroborar lo indicado por el Sr. Raymond, sobre la limitación de los métodos *in vitro* para predecir condiciones individuales de digestibilidad *in vivo*, en el sentido que las pruebas de digestibilidad de forrajes frescos fueron realizadas al nivel máximo de consumo de los animales y en ellas el consumo máximo era muy variable entre forrajes probados, de este modo, se puede suponer que el método *in vitro* no fue capaz de compensar el efecto diferencial sobre la digestibilidad, que tuvo el nivel de consumo.

Desde el punto de vista del Nutricionista o del Ganadero que trata de interpretar la respuesta obtenida con sus animales, a partir de la cantidad y calidad del alimento (forraje primordialmente) consumido, el valor de la técnica es muy limitado, si no está en capacidad de predecir el efecto *in vivo* que corresponde a la condición particular (animal, forraje y nivel de consumo) en que se realizó el trabajo. La limitación sería particularmente importante, al combinar las técnicas de muestreo por fístulas del esófago o rumen, en animales en pastoreo y la predicción de la digestibilidad del forraje consumido, porque no se puede asumir, que los animales están digiriendo el forraje que consumen al nivel de la "cualidad básica" que mide el sistema *in vitro*.

Finalmente, quiero hacer especial énfasis en algo que expresara, muy apropiadamente, el Sr. Raymond. Las diferencias encontradas por Cooper y colaboradores de Welsh Plant Breeding Station y las encontradas en el Instituto de Botánica Agrícola de Cambridge, han demostrado, en efecto, una situación interesante al separar variedades y aun clones de planta forrajeras por su digestibilidad. Me temo que, el estímulo de estos resultados produzca un entusiasmo excesivo

en nuestros Fitotecnistas, esperando crear variedades sobresalientes a partir de las características de digestibilidad. Para mantener la perspectiva real de las cosas, bien vale la pena recordar que en condiciones de explotación agrícola, particularmente en condiciones de pastoreo, las prácticas de manejo pueden tener un efecto mucho mayor sobre la digestibilidad y el consumo de forrajes que las diferencias entre clones, variedades y aun entre especies. Por ejemplo, en Estanzuela, el retraso de diez días en el pastoreo de primavera, en la mayoría de nuestras praderas, significa una disminución en la digestibilidad del forraje de 4 o 5 unidades de porcentaje, valor que está posiblemente aún por encima de las mayores diferencias que se pueden esperar entre forrajes a un mismo estado de madurez.

Para comenzar las preguntas, quiero presentar al Sr. Raymond, una que estoy seguro se encuentra en la mente de los participantes: sabemos que se han propuesto varias técnicas *in vitro*, y se han presentado pruebas parciales, por lo menos, para todas ellas; en su experiencia, cuales técnicas y por qué, deben emplearse y más aún, en qué momento de la investigación cree Ud. que se podría emplear cada una de ellas?

W. F. RAYMOND:

El Dr. Paladines me ha presentado una pregunta difícil de contestar. Creo que lo primero que se debe decir es que cada investigador piensa que su método es el mejor. Creo que debemos presentar y discutir ciertos principios básicos, que pueden ayudar en la comprensión del problema.

En la literatura se produce una división básica en dos grupos de técnicas (me refiero a la predicción de la digestibilidad y no a las estimaciones del consumo, a las cuales se referirá el Dr. Donefer más adelante). Un grupo de técnicas ha sido diseñado para predecir la digestibilidad de la celulosa; esto se realiza, por medio de la digestión con una mezcla de buffer y extracto del contenido del rumen. La concentración de celulosa se mide en la muestra antes y después de la incubación. Una vez obtenido este valor de digestibilidad de la celulosa, es preciso predecir la digestibilidad de la materia seca, materia orgánica o energía a partir de la digestibilidad de la celulosa. Esta última predicción constituye una relación estadística entre el parámetro predecido y la estimación. En nuestras pruebas, encontramos que la relación entre la digestibilidad de la celulosa y la materia seca no era tan estrecha como debía esperarse. Las predicciones eran buenas cuando se trataba de forrajes de bajo contenido de nitrógeno. Pero con forrajes de alto contenido de nitrógeno y alta digestibilidad, encontramos que la digestibilidad de la materia seca predecida, era mucho más baja que la digestibilidad *in vivo*. Es evidente que podíamos haber encontrado una ecuación

que se ajuste a esa relación, pero en ese caso, hubiéramos debido trabajar con una relación que no comprendíamos. Además, nos interesaba conocer las razones por las cuales la digestibilidad *in vitro* era menor que *in vivo*, en los forrajes de alto contenido de proteína. A esta altura de las investigaciones, el Dr. Tilley y el Sr. Terry, descubrieron que si se realiza la digestión *in vitro* solamente con el licor del rumen, la proteína del forraje es convertida a proteína bacteriana y como tal, permanece en su mayor parte, en el residuo indigerido. En el animal, esta proteína es más tarde digerida por enzimas que hacen la proteína soluble y absorbible. Por esta razón, los investigadores mencionados, incluyeron la segunda fase de digestión, en la cual, el residuo de la digestión con licor del rumen, se digiere con pepsina ácida. Con las muestras de baja digestibilidad y bajo contenido de proteína, la digestibilidad aumentó muy poco al incluirse la segunda fase; en cambio, con las muestras de alta digestibilidad y contenido elevado de proteína, la digestibilidad subió a un nivel mucho más alto. La segunda fase, fue entonces establecida, porque su inclusión elevaba la correlación entre la digestibilidad *in vitro* y la digestibilidad *in vivo*, determinada con un método standard. Esto es muy importante, porque como lo dijo el Dr. Paladines, la digestibilidad *in vivo* no es constante, habiendo de esta manera, obtenido una relación entre una técnica standard *in vitro* y una técnica standard *in vivo*; esta relación, sin embargo, no tiene que ser la misma, con la digestibilidad medida con otros animales y en otras condiciones.

Se han realizado cambios en la técnica propuesta. El Sr. Alexander describirá un sistema de dos fases, muy similar al empleado en Hurley, pero en el cual se han hecho cambios que permiten analizar un número elevado de muestras. Lo importante en los métodos, es que sean reproducibles en un mismo laboratorio y que estén en concordancia con los resultados obtenidos en otros laboratorios. Creo que la parte importante es que, se pueden aceptar cambios en las técnicas, si estos cambios no afectan los resultados obtenidos. Nos preocupa el empleo de técnicas diferentes, en diversos laboratorios que resultan en la obtención de resultados divergentes, porque en esta condición no podríamos estudiar la naturaleza general de los resultados. En el Reino Unido, hemos realizado comparaciones de los resultados obtenidos en diferentes laboratorios que emplean el método de dos fases, en algunos casos con modificaciones, y hemos encontrado excelente concordancia entre ellos. Si algún laboratorio produce resultados diferentes, sabemos que su método está errado. Creo que en América del Sur se debía hacer algo similar. Sugiero que se preparen muestras standard de digestibilidad *in vivo* conocida, para comprobar la concordancia entre diversos laboratorios.

En el último Congreso Internacional de Pasturas de Helsinki, se pudo ver que muchos laboratorios en todo el mundo están usando distintos tipos de técnicas *in vitro* de dos fases. Yo creo que la ten-

dencia general es el establecimiento de técnicas de dos fases, en las cuales se incluya una fase de digestión bacteriana seguida por una digestión enzimática, como la pepsina, o por un detergente (como se hace en los Estados Unidos), para remover la fracción protéica digerible.

Para terminar, quisiera comentar sobre la declaración del Dr. Paladines con relación a la inconstancia de los métodos biológicos. Hace tres años, se realizó un estudio entre algunos países europeos y el Reino Unido, para determinar las diferencias en el análisis de algunos componentes químicos de los forrajes. Las diferencias entre laboratorios, fueron muchas veces mayores que las diferencias entre las muestras; lo cual quiere decir, que la standarización de los métodos químicos no es tampoco suficientemente buena.

#### A. R. FRONTERA:

¿Pueden aplicarse los métodos *in vitro* en pasturas naturales?

#### W. F. RAYMOND:

Hemos establecido, que los métodos *in vitro* son válidos cuando se aplican a las especies individuales que se encuentran en las praderas naturales del Reino Unido y también cuando se aplican a las mezclas de especies que se encuentran en esas praderas. Es más, el método es de valor particular cuando se hacen estudios sobre la pradera natural, en la cual, la selección entre las especies presentes puede ser un problema de verdadera importancia nutritiva y en la cual, las técnicas *in vitro*, de acuerdo al sistema que será descrito por el Dr. Arnold, pueden ser valiosas.

#### H. CABALLERO:

Cree Ud. que para aquellos que se inician en las técnicas *in vitro*, para determinar la digestibilidad de los forrajes, sería más conveniente recomendar que obtengan previa o simultáneamente valores *in vivo* de digestibilidad? El establecer correlaciones entre los dos valores, daría mayor seguridad al investigador sobre la técnica que va a usar. Si se hace lo contrario, como se ha sugerido, se corre peligro, de que las técnicas *in vitro*, se conviertan en sólo técnicas de laboratorio sin relación ninguna con el animal y su producción.

#### W. F. RAYMOND:

Estoy completamente de acuerdo, en que las técnicas *in vitro* no son un sustituto para los experimentos *in vivo* y que el estable-

cimiento de un sistema *in vitro* en el laboratorio, no debe emplearse como una excusa para no instalar los equipos necesarios para pruebas *in vivo*. Sin embargo, el objetivo de las pruebas *in vitro*, es poder seleccionar entre un número grande de forrajes, número que no podría ser estudiado en experimentos con animales. Así se podría separar los forrajes que presentan más promesa (y como lo indicara antes, esto debe basarse primero en las características agronómicas y solamente después en la digestibilidad *in vitro* y en la medida del I.V.N.). Es importante que estos forrajes se prueben luego con animales, para comprobar los resultados obtenidos *in vitro*. En muchas especies de forrajes, hay suficiente información sobre su valor potencial y éstas, estoy de acuerdo, en que deben probarse tan pronto como sea posible en experimentos con animales, para medir la digestibilidad y el consumo voluntario.

#### J. LOPEZ:

1. El Sr. Raymond afirma que, sería necesario que alguien en América Latina produzca muestras "standard" de forrajes de alta y baja digestibilidad. Considerando las dificultades de producir estas muestras y las grandes diferencias ecológicas existentes entre los países de América Latina, por qué no usar muestras "standard" de otros lugares, por ejemplo, los Estados Unidos de Norte América o el Reino Unido?

2. Habría una manera de conceptualizar lo que sería una muestra "standard" para una determinada región geográfica?

#### W. F. RAYMOND

Lo siguiente contesta las dos preguntas: El cuadro 2, en el artículo, demuestra que la digestibilidad de un pasto del velt Sudafricano, medido con el método *in vitro* empleado en Hurley, fue muy similar al valor *in vivo* obtenido en Sud Africa.

Sin embargo, estoy de acuerdo en que es preferible emplear como standards, muestras de forrajes que tienen alguna relación con aquellos que crecen en la región. Parece razonable emplear diferentes standards para la zona sur de la América Latina de los que se empleen en el área del Caribe. Indudablemente que podrían conseguir standards de los Estados Unidos o Reino Unido, pero veo grandes ventajas en que estos se produzcan en sus propias regiones, porque se crearía un interés más personal en la precisión de las técnicas *in vitro* empleadas porque promovería los estudios *in vivo*, los cuales son una parte esencial de un programa de nutrición en desarrollo.

R. G. PARRA:

Qué efectos tiene la ausencia de protozoarios en los medios de fermentación *in vitro*, sobre la digestibilidad de la celulosa, niveles de ácidos grasos volátiles y concentración de amonio en el cultivo?

W. F. RAYMOND:

El hecho de que no se establezca una población normal de protozoarios en los sistemas de digestión *in vitro*, es un ejemplo de problemas que hacía resaltar en el artículo, es decir que, el sistema *in vitro*, no trata de reproducir las condiciones exactas de digestión *in vivo*, sin embargo, la buena concordancia entre valores de digestibilidad determinados *in vivo* e *in vitro*, indica que la ausencia de protozoarios, no ha tenido un efecto serio sobre la digestibilidad total. La ausencia de protozoarios, puede ser importante cuando consideramos los productos de digestión —ácidos grasos volátiles y amonio— los cuales, son posiblemente muy diferentes en un sistema *in vitro* que en el sistema dinámico *in vivo*.

R. R. PEIXOTO:

Es suficiente la determinación de digestibilidad de la materia seca *in vitro*, o se debe determinar la digestibilidad de la materia orgánica, sobre todo cuando se emplea como medida del valor nutritivo de los forrajes?

W. F. RAYMOND:

La medida a emplearse debe depender del objetivo del experimento. Es su objetivo determinar diferencias en la digestibilidad entre forrajes ó es el objetivo establecer niveles básicos de digestibilidad?, en ambos casos la digestibilidad de la materia seca, es generalmente adecuada, o es el objetivo medir el consumo de nutrientes por los animales? en este caso puede ser necesaria la digestibilidad de la materia orgánica o de la energía. En este caso también será necesario emplear standards, en los cuales se ha medido la digestibilidad de la materia orgánica o energía.

N. ABIUSSO:

Qué relación existe entre el residuo del líquido ruminal (blanco) y el porcentaje de digestibilidad obtenido?

**W. F. RAYMOND:**

El inóculo del rumen ha sido preparado de diferente manera por diferentes investigadores. Cuando se emplea el licor del rumen centrifugado, el inoculante contiene pocas de las partículas en las cuales están concentrados los microorganismos celulolíticos, de manera que el inoculante tiende a ser débil en actividad celulolítica, y la digestibilidad de la fibra es baja. Por otro lado, el licor del rumen no filtrado dará como resultado valores altos de digestibilidad de la fibra, pero introduce un valor muy alto del blanco. El objetivo, por tanto, es preparar inoculante del rumen, filtrándolo a través de muselina, el cual contenga suficientes partículas pequeñas, con sus organismos celulolíticos asociados, para digerir adecuadamente la fibra, pero que separe las partículas más gruesas, causantes de los valores elevados del blanco.

Esto quiere decir que el método exacto de filtración debe basarse en la experiencia, en relación con la dieta del animal donante, pero con el objetivo de asegurar una digestibilidad elevada de la fibra.

**B. L. RAKTOE:**

Parece que Ud. indicó que en el laboratorio se deben emplear relaciones que produzcan coeficientes de regresión cercanos a la unidad y que se deben desechar los métodos que establezcan coeficientes de regresión diferentes a uno. Cuál es la base teórica de esta opinión?

**W. F. RAYMOND:**

Hemos creído que una relación con coeficiente cercano a 1.0, es biológicamente más válida que una con el coeficiente menor a 1.0. Así, pensamos que el método *in vitro* de dos fases, toma en cuenta dos procesos distintos de la digestión de los rumiantes, en cambio que, el método de digestibilidad de la celulosa, toma en cuenta solamente una parte del proceso *in vivo*, de manera que los valores de digestibilidad de la materia seca obtenidos con este método, es posible que sean menos válidos biológicamente.

Probablemente, la mejor prueba de los métodos, se encuentra en la precisión relativa de las relaciones. Hemos encontrado que el método de dos fases produce estimaciones más precisas de la digestibilidad, en un rango amplio de alimentos, que cualquiera de los métodos de una sola fase.

#### L. VERDE:

1. Cuál es el valor de los carbohidratos solubles, para predecir la digestibilidad y el valor nutritivo de los forrajes?

2. El método original de Tilley y Terry, estudiaba solamente la digestibilidad *in vitro* de la materia seca, pero en su trabajo, el Dr. Raymond se ha referido a la digestibilidad de la celulosa. Ha habido alguna modificación última al método?

#### W. F. RAYMOND:

1. La porción digerible de un forraje, está formada de dos partes, el material soluble en pepsina ácida y la fibra digerible.

La fracción soluble en pepsina ácida está formada por proteínas solubles, ácidos orgánicos, minerales solubles, y carbohidratos solubles. Por tanto, el contenido de hidratos de carbono solubles, forman solamente una parte pequeña del total del material digerible. Como el contenido de carbohidratos solubles, no está relacionado con los otros componentes digeribles, (por ejemplo, el aumento en el contenido de proteína de un forraje, resultante de la fertilización con nitrógeno, puede producir una disminución en el contenido de carbohidratos solubles sin producir disminución en la digestibilidad), tampoco está relacionado con la digestibilidad total.

2. El método *in vitro* de Tilley y Terry fue desarrollado para que incluya dos etapas distintas. Esto permite calcular la digestibilidad de la celulosa, luego de la primera etapa de digestión, una vez que se ha separado el residuo del "rumen artificial" en la centrifuga; a partir del contenido de celulosa en el residuo, se puede calcular la digestibilidad de la celulosa en la muestra.

#### P. PRESTES:

Sería posible eliminar la segunda fase de la digestibilidad *in vitro*, usando como criterio la digestibilidad de la celulosa?

#### W. F. RAYMOND:

Respondiendo a una de las preguntas del Ing. Luis Verde indiqué que el material digerible de un forraje está compuesto de dos fracciones, una soluble en pepsina y la otra, fibra digerible (celulosa más hemicelulosa).

Las dos fracciones no son necesariamente relacionadas, por tanto, podemos tener dos forrajes con el mismo contenido de celulosa y celulosa digerible, pero en los cuales, el uno contenga un nivel

alto de material soluble en pepsina y el otro un nivel de esa fracción. Debido a esta diferencia, el primero tendría una digestibilidad mayor que el segundo, a pesar de que la digestibilidad de la celulosa sería la misma. Por tanto, la digestibilidad de la celulosa no es una medida adecuada de la digestibilidad de la materia seca de los forrajes.

En mi opinión, solamente cuando incluimos la segunda fase de digestión, podemos determinar estas diferencias en la digestibilidad de los forrajes.

#### J. GOMIDE:

1. Cuál es la opinión del Sr. Raymond, sobre el método de solubilidad de la celulosa en cuprietilen diamina para predecir la digestibilidad de los forrajes?

2. Si un laboratorio no dispone de muestras de forrajes "standard", de digestibilidad *in vivo* conocida, cree Ud. adecuado, de todas maneras, utilizar la técnica *in vitro*, por lo menos para comparar forrajes en su digestibilidad relativa?

#### W. F. RAYMOND:

1. Tenemos muy poca experiencia con este método, pero creo que sufre de las mismas limitaciones que la digestibilidad de la celulosa, sobre las cuales comenté en la respuesta anterior, en que se considera el material soluble en pepsina, el cual forma una parte importante del material digerible del forraje.

2. Estoy de acuerdo que un laboratorio no precisa muestras "standard" obtenidas de otros lugares, para establecer un método *in vitro* que permita estudiar problemas agronómicos; sin embargo necesitará muestras "standard" locales, para comprobar la precisión de corridas realizadas en diferentes días. Estas muestras no necesitan ser de digestibilidad *in vivo* conocida, ya que son empleadas solamente para comprobar la constancia del método. La necesidad de poseer muestras standard de digestibilidad *in vivo* conocida se presenta: a) cuando se quiere predecir valores *in vivo* a partir de los resultados *in vitro*; y, b) para que los valores obtenidos en diferentes laboratorios, que emplean los mismos "standards", sean comparables.



**USO DE METODOS IN VITRO  
Y OTROS METODOS DE LABORATORIO  
PARA PREDECIR EL CONSUMO POTENCIAL  
DE ENERGIA DIGERIBLE DE LOS FORRAJES**

**E. DONEFER**  
Department of Animal Science  
Macdonald College  
Province of Quebec, Canada



## I. INTRODUCCION

La importancia de desarrollar métodos *in vitro* y otros métodos de laboratorios precisos, para predecir el valor nutritivo de los forrajes, está indicado por el número elevado de laboratorios que, en muchos lugares del mundo, se encuentran actualmente trabajando en este problema.

Actualmente, el fitotecnista, que trabaja con cantidad limitada de material proveniente de pequeñas parcelas, no se satisface con el empleo del rendimiento o índices del contenido químico, como la única base para la selección de nuevas variedades. Se requiere actualmente, un método de laboratorio, el cual indique el valor nutritivo potencial de los forrajes, cuando son ofrecidos a los animales. Para el agrónomo, son también necesarias las técnicas de evaluación de forrajes, para determinar el efecto de diferentes factores de manejos de las plantas, sobre su valor nutritivo. El nutricionista, el cual está en último término interesado en la eficiencia de producción de leche, carne y lana por los rumiantes, requiere una técnica que le permita medir la contribución de las plantas forrajeras, a cubrir los requisitos nutritivos del animal. Las técnicas de laboratorio para la evaluación de forrajes, también pueden ser aplicables directamente al agricultor, en el sentido de que el análisis de su forraje disponible puede formar la base para un programa de alimentación, que le indicaría las cantidades y los tipos de suplementos que debe disponer para sus animales.

## II. MEDIDAS DEL VALOR NUTRITIVO DE LOS FORRAJES.

El valor nutritivo de un alimento debe ser medido en términos del nivel de producción de leche, carne o lana que se consigue cuando este es ofrecido al animal. Esta medida es difícil de conseguir en la práctica. Su dificultad se manifiesta en el tiempo y costo de estos experimentos, los cuales generalmente requieren cantidades elevadas de alimento. Los resultados de estos experimentos, también deben expresarse en alguna forma que indique la contribución nutritiva de los alimentos, sea que esta contribución se exprese como contenido de energía, de proteína o de algún otro nutriente requerido por el ani-

mal. En el caso de los forrajes, la contribución más importante a la nutrición de los animales, es como una fuente relativamente económica de energía. Esta energía está principalmente contenida en forma de carbohidratos complejos, los cuales requieren la degradación microbiana en el rumen para ser convertidos a formas utilizables por el animal (ácidos grasos volátiles). Existen varios sistemas para describir la contribución potencial de energía de los alimentos; la más significativa de todas, es de la "energía neta", la cual describe la cantidad de energía realmente disponible para el mantenimiento y producción del animal. Este sistema se originó a comienzos del presente siglo, con observaciones sobre la habilidad que tenían varios alimentos, para producir el engorde de novillos. El contenido de energía neta de los alimentos, puede determinarse directamente por medio de estudios de la composición del cuerpo o a través de estudios complejos, para los cuales se emplean calorímetros de respiración; en cualquier caso, el procedimiento es tan laborioso que existen resultados solamente para pocos forrajes. En vista de que, las técnicas de laboratorio para predecir el valor de los forrajes, deben ser basadas en datos originales obtenidos *in vivo*, no existen relaciones todavía que se hayan establecido para predecir el contenido de energía neta de los forrajes a partir de métodos *in vitro* o químicos.

A pesar de que la energía digerible no es una medida tan precisa como la energía neta, para propósitos prácticos es la medida de energía disponible de uso más común. La energía digerible es esencialmente la corrección de la energía cruda (calorímetro de bomba) de un alimento, por las pérdidas en las heces fecales (residuos no digeridos). El sistema de nutrientes digeribles totales (NDT), es sinónimo con la energía digerible, debiendo preferirse esta última porque se expresa directamente en términos de calorías y no envuelve el sistema de análisis complejo y ambiguo que se precisa en las determinaciones de NDT. Una característica común para todos los sistemas que describen el contenido de energía disponible de los alimentos, es que todos constituyen medidas de la concentración de energía, expresada como el número de calorías por kilogramo de alimento o por ciento de nutrientes digeribles. Las medidas de concentración de la energía son de valor limitado al describir los forrajes, porque no dan indicación del número de unidades de alimento, que pueden ser voluntariamente consumidas por el animal. Esto es de especial importancia con los rumiantes, ya que se ha demostrado que el consumo voluntario de forraje está directamente relacionado con el valor nutritivo (3, 8).

La importancia relativa de la concentración de energía digerible y el consumo voluntario, se ilustra en la Figura 7, para dos forrajes hipotéticos.

El forraje *A* tiene una concentración de energía digerible de 60 comparado con el valor de 50 para el forraje *B*. Estos valores, podrían representar el porcentaje de NDT, de materia seca digerible

o el porcentaje de la energía cruda de cada forraje la cual es digerida; esto es, que no aparece en las heces. Cuando los dos forrajes se ofrecieron *ad libitum*, en la misma prueba de alimentación en la cual se determinó el coeficiente de digestibilidad, los animales consumieron el doble del forraje A que de forraje B. El consumo voluntario, se puede expresar en gramos de materia seca consumida por animal y por día corregidos para el tamaño metabólico del animal (peso en Kg. elevado a la 0,75, ( $W_{Kg}^{0,75}$ )) y puede ser expresado con rela-

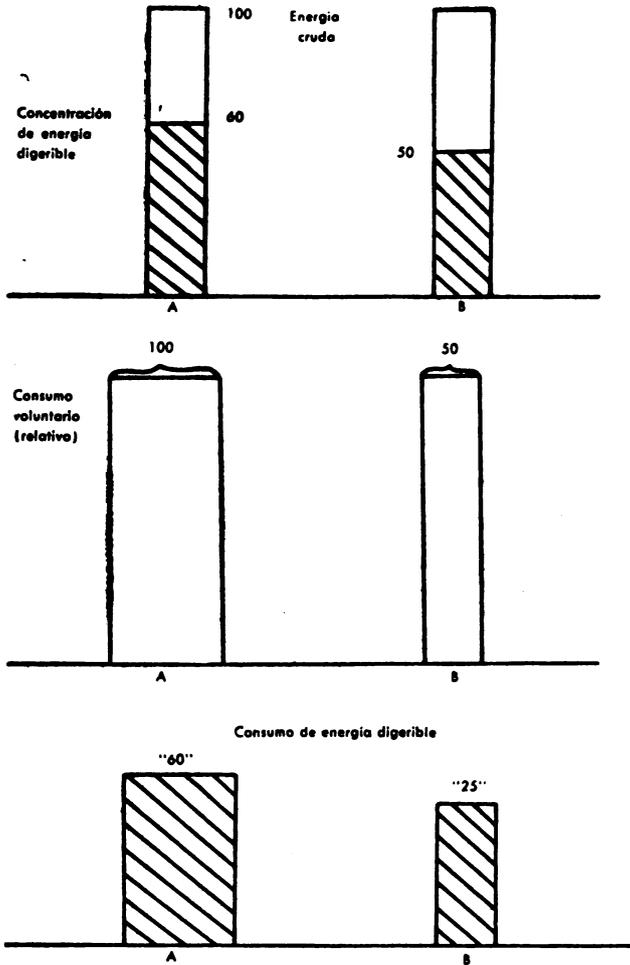


FIGURA N° 7.— Relación entre la concentración de energía digerible y el consumo voluntario.

ción a algún consumo standard. Crampton (8) propuso un consumo standard de 3 libras/100 libras de peso vivo, el cual fue después convertido a 80 gramos por unidad de tamaño metabólico para ovinos y de 140 gramos para ganado vacuno (10). Los consumos ilustrados en la Figura 1, representarían entonces, 100 % y 50 % del consumo standard para los forrajes *A* y *B*, respectivamente. Es lógico combinar los valores de concentración de energía y consumo voluntario (24) y producir un solo valor que, describa el consumo de energía digerible. En esta forma, para el forraje *A* el 60 % de la energía cruda consumida voluntariamente sería digerida por el animal, resultando en un índice combinado de "60" (0.60 x 100). En el caso del forraje *B* el 50 % de la energía cruda consumida es digerida y el índice de consumo de energía digerible por lo tanto "25" (0.50 x 50). Estos índices, que son esencialmente el índice de valor nutritivo (IVN) propuesto por Crampton y colaboradores (9, 10), demuestran la importancia de la medida del consumo voluntario, comparado con los de digestibilidad, cuando se considera el valor nutritivo de los forrajes. A pesar de que los forrajes *A* y *B* difieren solamente en 10 unidades de porcentaje en términos de la energía digerible, el forraje *A*, contribuye más del doble de la energía digerible para cubrir los requisitos nutritivos del animal.

En el Cuadro 9, se presentan los resultados de cinco forrajes, los cuales ilustran la importancia del consumo voluntario como criterio

CUADRO N° 9. — Características *in vitro* de algunos forrajes

FORRAJE	Energía Digerible (%)	Consumo Relativo (1)	Índice de Valor Nutritivo
<b>TREBOL ROJO</b> (TRIFOLIUM pratense)	67	106	71
<b>LOTUS</b> (LOTUS corniculatus)	63	99	63
<b>ALFALFA</b> (MEDICAGO sativa)	63	79	50
<b>BROMO PEREMNE</b> (BROMUS inermis)	60	71	43
<b>PASTO TIMOTHY</b> (PHLEUM pratense)	61	56	34

$$(1) \text{ Consumo relativo} = \frac{\text{g materia seca} / W_{\text{Kg}}^{0.75}}{80}$$

del valor nutritivo de los forrajes. Estos forrajes se diferenciarían poco, si la energía digerible fuese la única medida de valor de los forrajes; mientras que, la consideración del consumo relativo y sucesivamente del índice del valor nutritivo, demuestra grandes diferencias en el potencial nutritivo de estos forrajes para el animal. El consumo de energía digerible, puede expresarse directamente en términos de las kilocalorías de energía digerible consumida por unidad de tamaño metabólico (4), y el índice de valor nutritivo, puede ser convertido a esta medida como puede también ser expresado en términos del consumo de NDT (11).

Un problema que se presenta en las medidas del consumo voluntario, es la gran variabilidad que se observa entre animales cuando se les ofrece el mismo forraje; los coeficientes de variación superiores al 10 % no son raros (9). Hasta cuando se conozcan mejor los factores que influyen en la regulación del consumo voluntario de los rumiantes, posiblemente no se conseguirá mayor precisión. A pesar de que las medidas no son tan precisas como la digestibilidad, el consumo voluntario de los forrajes, cubre un rango mucho más amplio de valores, hecho que compensa parcialmente la mayor variabilidad inherente a su determinación.

### III. USO DE TECNICAS DE FERMENTACION *IN VITRO* PARA PREDECIR EL CONSUMO POTENCIAL DE ENERGIA DIGERIBLE

Se debe reconocer a H. E. Woodman y sus asociados de Cambridge (30), como los iniciadores de los estudios de técnicas *in vitro*, para determinar los factores que influyen en el valor nutritivo de los forrajes. Sus trabajos publicados hace más de 30 años, se referían al efecto de la lignificación de las plantas, en la inhibición de la disponibilidad de los nutrientes. También ellos trataron de relacionar la digestibilidad de la fibra cruda, determinada *in vivo* e *in vitro*. A pesar de que tuvieron poco éxito en establecer esta relación, su trabajo preparó el camino para los estudios que siguieron en los años posteriores. Hasta el año 1960, todos los intentos de desarrollar métodos *in vitro*, para la evaluación de forrajes, estaban dirigidos a la predicción de algún aspecto de la digestibilidad de estos forrajes (18, 27). Esto es natural, ya que los resultados sobre consumo voluntario de forrajes por animales, comenzaron a aparecer en la literatura únicamente después de la sugerencia de Cramp-ton (8), de que "se puede dar una calificación numérica práctica al valor alimenticio de los forrajes, expresando el consumo diario voluntario como porcentaje del consumo normal" o valor standard. Comenzando en 1956, se habían acumulado en nuestro laboratorio en el Macdonald College, muestras de forrajes que tenían digesti-

bilidad *in vivo* conocida y resultados sobre el consumo voluntario. Se decidió establecer estudios *in vitro* para explorar la posibilidad de predecir el consumo, por medio de técnicas de laboratorio. El tipo de sistema *in vitro* que se empleó, está basado en el que fuera desarrollado en la Estación Experimental Agrícola de Ohio, con el cual Bentley y sus colaboradores habían podido identificar el factor celulolítico presente en el licor del rumen. Nuestros estudios iniciales *in vitro*, incluyeron la determinación de la digestión de la celulosa, de forrajes conocidos, en varios períodos de tiempo (14), porque se había desarrollado la hipótesis de que el consumo voluntario de un forraje está limitado por la velocidad de digestión de la celulosa (8). Los resultados de estas pruebas con los forrajes descritos previamente (Cuadro 9), se presentan gráficamente en la Figura 8.

El examen de los resultados, indicó que existía un período de demora en el comienzo de la digestión de la celulosa, el cual parecía estar relacionado con ciertas especies de forrajes, las gramíneas demorando algunas horas más que las leguminosas. Esa diferencia en el comienzo de la fermentación, se refleja en el nivel de celulosa

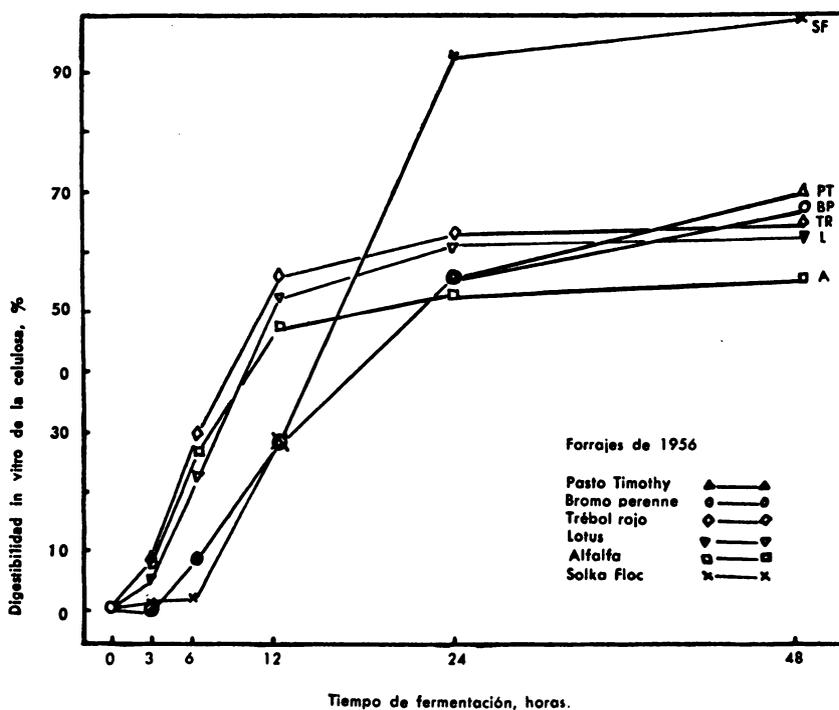


FIGURA N° 8. Velocidad de digestión in vitro de la celulosa, forrajes de 1956 y Solka floc.

digerida hasta 12 horas después; luego de las 12 horas, hay una igualación gradual de la cantidad de celulosa digerida hasta que, se adquiere una plataforma. El hecho de que la celulosa pura delignificada (solka floe), es digerida enteramente con el tiempo, sugiere el hecho de que la disminución en la velocidad de digestión de la celulosa después de 12 horas, se debe a la lignificación. Para determinar las relaciones que existían, entre la digestión de la celulosa *in vitro* y medidas *in vivo* del valor nutritivo de los forrajes, se calcularon coeficientes simples de correlación entre todas las posibles combinaciones de medidas *in vitro* e *in vivo*, para los nueve forrajes con información disponible. Como resultado de este análisis, se encontró una relación importante *in vivo* - *in vitro*. En esta oportunidad, se demostró por primera vez que el consumo voluntario o el IVN (el cual combina la digestibilidad y las medidas de consumo voluntario), estaban altamente correlacionados con la digestibilidad *in vitro* de la celulosa, durante los primeros períodos de fermentación. La Figura 9, ilustra la línea de regresión obtenida con la digestibilidad *in vitro* de la celulosa, después de 12 horas, comparado con el IVN de los forrajes. Cuando hubieron más muestras de forraje disponibles, los estudios *in vitro* fueron extendidos (15), obteniéndose una ecuación de regresión y coeficiente de correlación de

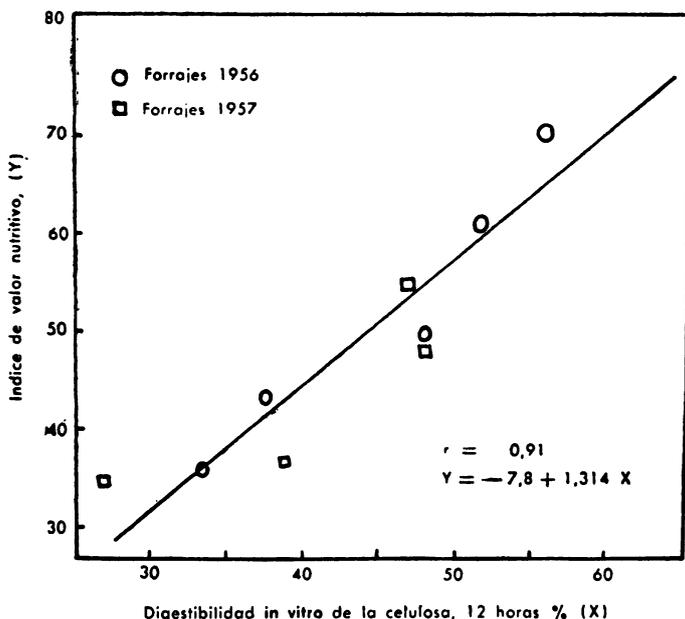


FIGURA N° 9. Regresión del índice de valor nutritivo en la digestibilidad *in vitro* de la celulosa a las 12 horas.

la misma magnitud, luego de incluir los nuevos datos. La relación *in vivo* - *in vitro* fue confirmada por Johnson y colaboradores (19), quienes demostraron que existía una relación estrecha entre el consumo relativo o el IVN con la digestión de la celulosa *in vitro* a las 12 horas. Esta relación disminuye en períodos posteriores de la fermentación; esta demostración fue realizada con un grupo de 11 muestras de forraje (gramíneas y alfalfa).

Un aspecto que ha surgido en la literatura y que ha afectado la interpretación de los resultados *in vivo* e *in vitro*, es la relación entre la digestibilidad y el consumo voluntario de los forrajes. Se ha generalizado que existe una relación directa entre el consumo voluntario de los forrajes y su digestibilidad (1, 4), la cual si fuera verdad, disminuiría la importancia de las medidas *in vivo* del consumo y de las técnicas *in vitro* que han sido desarrolladas para medir el potencial de consumo de los forrajes. La observación de los resultados presentados en varias publicaciones, indica que la relación entre la digestibilidad y el consumo es particularmente adecuada, cuando se comparan forrajes de la misma especie o tipo, a diferentes estados de madurez dentro de especies (21, 25), pero se vuelve menos importante y en algunos casos desaparece, cuando se comparan forrajes de tipos divergentes. Esta observación, ha sido muy bien documentada en artículos presentados al Noveno y Décimo Congreso Internacional de Pasturas (5, 13, 17, 22, 23, 26). El hecho de que la relación digestibilidad-consumo puede ser muy variable, presenta una razón de fuerza más para la adopción de un índice de valor nutritivo, el cual incorpore los dos criterios; y, por lo tanto, favorece el desarrollo de procedimientos *in vitro* de predicción, que puedan dar una estimación del potencial de los forrajes, en términos de energía digerible.

#### IV. OTRAS TECNICAS DE LABORATORIO, PARA PREDECIR EL CONSUMO POTENCIAL DE ENERGIA DIGERIBLE DE LOS FORRAJES

La complejidad y la variabilidad obtenida en los resultados, que está asociada con la operación de un sistema de fermentación *in vitro*, ha dificultado su uso en la prueba rutinaria de forrajes y por lo tanto, ha limitado su contribución a programas de mejoramiento de forrajes. Esta variabilidad, ha sido ilustrada en un estudio cooperativo realizado en los Estados Unidos de Norte América y Canadá, en el cual, 14 laboratorios diferentes condujeron pruebas de digestibilidad *in vitro* de la celulosa en los mismos forrajes. Los resultados de la incubación por 24 horas, variaron de 40 a 64 % (2). Inclusive, en los casos en que se han hecho esfuerzos para stan-

darizar las técnicas entre varios laboratorios, los resultados han variado considerablemente. Esta variabilidad, generalmente se acusa al hecho de que hay dificultades en standarizar la actividad de los microorganismos vivos del rumen.

Estos hechos han estimulado el desarrollo de procedimientos de laboratorio más simples, los cuales se puedan utilizar para la evaluación de forrajes. Estudios en esta dirección, en nuestro laboratorio en el Macdonald College, han resultado en el empleo de preparaciones enzimáticas (celulasa y/o pepsina) en procedimientos simples de digestión. Cuando se analizaron los resultados de estos estudios con 14 forrajes de valor nutritivo conocido, se encontró que no solamente las preparaciones de enzimas ofrecían una solución promisoría para la evaluación de forrajes, pero también, otros métodos simples de extracción con agua o búfferes, resultaron en correlaciones elevadas con el consumo relativo y el IVN (16). Extendiendo estos estudios, se determinó el porcentaje de desaparición de la materia seca con una solución de pepsina de 0,2 % en 0,075 N HCl, para un grupo de 49 forrajes, los cuales se originaron en nuestros campos y también de áreas geográficas muy diferentes (17). Con este grupo heterogéneo de muestras de forraje, se encontró la misma correlación ( $r = 0,95$ ) entre la desaparición de la materia seca con pepsina-HCl y el IVN determinado *in vivo*.

Dehority y Johnson (12), han descrito pruebas de solubilidad de la materia seca, basados en la extracción de forrajes con ácido sulfúrico normal. En 39 muestras de forraje, se encontró un coeficiente de correlación de 0.83 entre el IVN y su método de la solubilidad de la materia seca. En estudios posteriores, con un grupo mayor de forrajes, los mismos investigadores encontraron que, combinando los resultados de pruebas de digestibilidad *in vitro* de la celulosa, con aquellos obtenidos con el método de la solubilidad de la materia seca, las correlaciones con el IVN eran superiores a cualquiera de las dos pruebas separadas (20). Barnes (2), obtuvo un coeficiente de correlación de 0,91 comparando la desaparición *in vitro* de la materia seca producida por un buffer y solución de pepsina con el IVN de 12 forrajes. El mismo autor, pudo elevar la correlación a 0,94, usando una combinación de resultados con licor del rumen y el tratamiento de pepsina. Clancy y Wilson (7), empleando una modificación del método de la fibra con detergente ácido, desarrollada por Van Soest (29), obtuvo un coeficiente de correlación de -0,82 con el consumo voluntario de 60 forrajes.

Una nueva orientación hacia la predicción del consumo voluntario de los forrajes, ha sido el desarrollo de un método que, mide el efecto de la masticación física sobre el tamaño de las partículas (28). Los resultados de 14 muestras, estaban altamente correlacionados con el consumo voluntario expresado en gramos por día ( $r = 0,94$ ). Un procedimiento más sofisticado para medir la fibrosidad de los forrajes, mide la energía eléctrica necesaria para pul-

verizar una pequeña muestra de heno molido (6). Se encontró un coeficiente de correlación de 0,94 entre este índice de fibrosidad y el consumo voluntario de materia seca digerible de 25 muestras de forraje.

## LITERATURA CITADA

1. BALCH, C. C. y CAMPLING, R. C. Regulation of voluntary food intake in ruminants. *Nutrition abstracts and Reviews*, 32(3):669-686. 1962.
2. BARNES, R. F. The development and application of *in vitro* rumen fermentation techniques. *Proceedings of the 10th International Grassland Congress*. 1966.
3. BLAXTER, K. L. Energy feeding standards for dairy cattle. *Nutrition Abstracts and Reviews* 20(1):1-21. 1950.
4. BLAXTER, K. L. *et al.* The regulation of food intake by sheep. *Animal Production* 3(1):51-61. 1961.
5. CAMPLING, R. C. The voluntary intake of conserved grass by cattle. *Proceedings of the 9th International Grassland Congress*. 1965.
6. CHENOST, M. Fibrousness of forages: Its determination and its relation to feeding value. *Proceedings of the 10th International Grassland Congress*. 1966.
7. CLANCY, M. J. y WILSON, R. K. Development and application of a new chemical method for predicting the digestibility and intake of herbage samples. *Proceedings of the 10th International Grassland Congress*. 1966.
8. CRAMPTON, E. W. Interrelations between digestible nutrient and energy content, voluntary dry matter intake, and the overall feeding value of forages. *Journal of Animal Science* 16(3):546-552. 1957.
9. CRAMPTON, E. W. *et al.* A Nutritive Value Index for forages. *Journal of Animal Science* 19(2):538-44. 1960.
10. CRAMPTON, E. W. *et al.* A Nutritive Value Index for forages. *Proceedings of the 8th International Grassland Congress* 462-466. 1960.
11. CRAMPTON, E. W. *et al.* Caloric equivalent of the Nutritive Value Index. *Journal of Animal Science* 21(3):628-632. 1962.
12. DEHORITY, B. A. y JOHNSON, R. R. Estimation of the digestibility and nutritive value of forages by cellulose and dry matter solubility methods. *Journal of Animal Science* 23(1):203-207. 1964.
13. DEMARQUILLY, C. Factors affecting the voluntary intake of green forage by sheep. *Proceedings of the 9th International Grassland Congress*. 1965.
14. DONEFER, E. *et al.* Prediction of the Nutritive Value Index of a forage from *in vitro* rumen fermentation data. *Journal of Animal Science* 19(2):545-552. 1960.
15. DONEFER, E. *et al.* Prediction of the Nutritive Value Index of forages fed chopped or ground using an *in vitro* rumen fermentation method. *Journal of Animal Science* 21(4):815-818. 1962.
16. DONEFER, F. *et al.* Dry matter disappearance by enzyme and aqueous solutions to predict the nutritive value of forages. *Journal of Dairy Science* 46(9):965-970. 1963.
17. DONEFER, E. *et al.* The prediction of digestible energy intake potential (NVI) of forages using a simple *in vitro* technique, *Proceedings of the 10th International Grassland Congress*. 1966.
18. HERSHBERGER, T. V. *et al.* Use of the artificial rumen technique to estimate the nutritive value of forage. *Journal of Animal Science* 18(2):770-779. 1959.

19. JOHNSON, R. R. *et al.* Discrepancies between grasses and alfalfa when estimating nutritive value from *in vitro* cellulose digestibility by rumen microorganisms. *Journal of Animal Science* 21(4):892-896. 1962.
20. JOHNSON, R. R. *et al.* Relationships between "*in vitro*" measurements on forages and their nutritive value. *Proceedings of the 9th International Grassland Congress*. 1965.
21. LLOYD, L. E. *et al.* Effect of four maturity stages of timothy hay on its chemical composition, nutrient digestibility and Nutritive Value Index. *Journal of Animal Science* 20(3):468-472. 1961.
22. MILFORD, R. y MINSON, D. J. Intake of tropical pasture species. *Proceedings of the 9th International Grassland Congress*. 1965.
23. OSBOURN, D. F. *et al.* The relationship between voluntary intake and digestibility of forage crops, using sheep. *Proceedings of the 10th International Grassland Congress*. 1966.
24. REID, J. T. *et al.* Effect of growth stage, chemical composition, and physical properties upon the nutritive value of forages. *Journal of Dairy Science* 42(3):567-571. 1959.
25. REID, R. L. *et al.* Studies with Sudangrass. II. Nutritive evaluation by *in vivo* and *in vitro* methods. *Agronomy Journal* 56(6):537-541. 1964.
26. REID, R. L. y JUNG, G. A. Factors affecting the intake and palatability of forages for sheep. *Proceedings of the 9th International Grassland Congress*. 1965.
27. TILLEY, J. M. A. *et al.* The *in vitro* measurements of herbage digestibility and assessment of nutritive value. *Proceedings of the 8th International Grassland Congress*. 1960.
28. TROELSEN, J. E. y BIGSBY, F. W. Artificial mastication — a new approach for predicting voluntary forage consumption by ruminants. *Journal of Animal Science* 23(4):1139-1142. 1964.
29. VAN SOEST, P. J. Use of detergents in the analysis of fibrous feed. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. *Journal of the Association of Official Agricultural Chemists* 46(5):829-835. 1963.
30. WOODMAN, H. E. y STEWART, J. The mechanism of cellulose digestion in the ruminant organism. III. The action of cellulose-splitting bacteria on the fibre of certain typical feeding stuffs. *Journal of Agricultural Science* 22: 527. 1932.

## APENDICE

### PROCEDIMIENTO PARA MEDIR LA MATERIA SECA CON SOLUCION ACIDA DE PEPSINA (17)

El método siguiente se emplea en la determinación de la desaparición de la materia seca, como índice para determinar el IVN de los forrajes:

1. Secar una muestra de un gramo del material seco, finamente molido (malla 30 U.S.B.S.) a peso constante. Obtener el peso seco.
2. Transferir cuantitativamente la muestra seca a un tubo de centrifuga de 200 ml provisto de un tapón plástico de rosca (Pyrex 1261).
3. Agregar 75 ml de una solución del 0,2 % de pepsina (1:10.000) en HCl 0,075 N. (La solución pepsina-HCl se prepara en el momento

de usar, diluyendo 6,1 ml de ácido clorhídrico concentrado hasta completar un litro, con agua destilada, calentándola a 40°C, agregando 2 g de pepsina y revolviendo hasta que se disuelva completamente. Agregar varias gotas de alcohol isoamílico para reducir la formación de espuma).

4. Tapar los tubos de centrifuga herméticamente y asegurarlos a un agitador Moorman (A.O.A.C.). Colocar el agitador conteniendo 12 tubos, en una incubadora a 40° C por 24 horas.

5. Una vez terminado el período de incubación, sacar los tubos del agitador, sacudirlos y centrifugar durante 10 minutos a 1000 x g aproximadamente.

6. Volcar, bajo succión, a través de un crisol para filtrar (vidrio esmerilado de porosidad gruesa, Pyrex 32940) el líquido sobrenadante que contiene una pequeña cantidad de partículas sedimentadas. Transferir cuantitativamente el residuo del forraje al mismo crisol con agua destilada. Lavar dos veces el residuo del crisol con 25 ml de agua destilada cada vez.

7. Secar y pesar los crisoles. El porcentaje de materia seca desaparecida (MSD) se calcula restando el peso del residuo seco, del peso de materia seca del forraje inicial y dividiendo la diferencia por el peso de la materia seca inicial.

8. El índice de Valor Nutritivo (IVN) se obtiene con la siguiente ecuación:

$$IVN = 0,75 + 1,6 \text{ MSD } (\%)$$

## DISCUSION DEL TRABAJO PRESENTADO POR EL Dr. E. DONEFER

Encargado de abrir la discusión fue el Dr. HERNAN CABALLERO  
Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Santiago, Chile

### H. CABALLERO:

En este interesante trabajo presentado por el Dr. Donefer conviene destacar y puntualizar algunos conceptos emitidos y ampliar un poco más otros.

Primeramente, establece que estas técnicas "*in vitro*" son de utilidad para fitotecnistas, agrónomos, nutricionistas y aún aplicables directamente al agricultor, pero siempre que estén correctamente evaluadas y comprobadas.

El autor ha traspasado los límites del tema central de su trabajo para entrar en otras consideraciones de interés.

En lo que respecta a la medida del valor nutritivo de los forrajes, conviene puntualizar que: 1) los forrajes constituyen una fuente relativamente económica de energía para los ruminantes; 2) la energía digestible de un forraje, constituye una medida más conveniente que NDT; 3) el consumo voluntario de forraje, está directamente relacionado con el valor nutritivo del mismo; 4) la energía neta, siendo una medida más precisa que la energía digestible, tiene numerosas limitaciones en su aplicación y por el momento, no existe un método para predecir el contenido de energía neta de los forrajes a partir de los métodos "*in vitro*". Si ello pudiera lograrse constituiría un adelanto espectacular en este campo.

El IVN representa un adelanto considerable en la determinación del valor nutritivo de los forrajes ya que combina los aspectos de digestibilidad y consumo voluntario. Sin embargo, el autor hace hincapié en que la variación en el consumo voluntario de un forraje, es considerable y mayor que la digestibilidad, por lo cual deben tomarse estos valores con las limitaciones correspondientes.

Si esta variabilidad que se observa entre animales estabulados es grande, se comprenderá cuanto mayor es para el animal en pastoreo, donde intervienen otros factores tales como el clima o medio ambiente, la disponibilidad de forraje, la cantidad o concentración de excretas en la pastura, etc.

Volviendo al I.V.N., creo que conviene discutir sobre la necesidad de hacer intervenir en la fórmula "el forraje standard" y si ello fuese así, qué clase de forraje se utilizaría principalmente para esta determinación. En otras palabras, el consumo relativo podría reemplazarse simplemente por el consumo observado, pero expresado siempre por unidad de peso metabólico del animal.

En el tema central y principal de este trabajo y de acuerdo a la información expuesta por el autor, se deduce que "el consumo voluntario o el IVN, están altamente correlacionados con la digestibilidad *in vitro* de la celulosa a las 12 horas".

El autor finaliza dando a conocer una técnica "*in vitro*" específica para predecir el valor nutritivo de los forrajes y que consiste en utilizar solamente una solución de pepsina — ácida y medir la desaparición de materia seca.

Como puede apreciarse, esta técnica no utiliza medios o fases biológicas, no obstante el coeficiente de correlación con el IVN determinado "*in vivo*", alcanza a 0.95.

Aún más, en otros métodos en que se usó simplemente agua destilada, se obtuvieron correlaciones altas.

Todo esto nos está indicando que: 1) los métodos "*in vitro*" están muy lejos de representar o reproducir lo que realmente ocurre en el animal; 2) aún no comprendemos ni conocemos la verdadera razón de estas correlaciones, cuya explicación y verdad debe buscarse tanto en el animal, como en la planta misma, en la estructura física de esta, en sus componentes esenciales, en su fisiología y en fin, en su mecanismo metabólico de por sí complicado y cambiante.

Hasta que esto ocurra, las técnicas "*in vitro*" como tales para predecir el valor "productivo" de los alimentos tendrán limitaciones importantes. Aunque algunas técnicas han tratado de reproducir lo que ocurriría dentro del animal, otras han resultado relativamente efectivas como fruto de la simple casualidad, y sin tener un fundamento científico que nos proporcione una explicación completa y satisfactoria.

Los trabajos "*in vitro*", deben constituir un complemento en la investigación y por ningún motivo deben dejarse de lado los trabajos relacionados con la investigación pecuaria de producción propiamente tal.

En los trabajos "*in vitro*", deben preferirse aquellos métodos que son apropiados para cada condición, que sean simples y sin grandes complicaciones en su ejecución.

Para comenzar la discusión, quisiera preguntar al Dr. Donefer, si para determinar el índice de valor nutritivo, sería siempre necesario contar con los forrajes standard y determinar el consumo standard, para así conocer el consumo relativo, o si sería posible simplemente realizar una prueba en la cual midamos el consumo máximo y lo expresemos en unidades de tamaño metabólico.

#### **E. DONEFER:**

Me parece que hay un poco de confusión, en el concepto de la medida del consumo del forraje standard. Una parte de la confusión, creo que proviene de la descripción inadecuada que he hecho. No se asumió en ningún momento que debían determinarse los consumos standard, en cada caso, lo que quisimos hacer es justificar un nivel como el consumo voluntario que podía esperarse. Nuestros trabajos originales demostraron que la cifra de 80 g era razonable. Este valor ha sido comprobado con los resultados encontrados en 14 forrajes, en que el promedio de consumo de leguminosas salió 100, lo cual demostró que el consumo relativo standard escogido fue adecuado; pero el escogerlo, fue solamente cuestión de buen juicio. Este consumo máximo relativo, no se ha calculado nuevamente, simplemente hemos seguido usando las cifras.

#### **B. L. RAKTOE:**

No cree el Dr. Donefer, peligroso considerar las correlaciones elevadas obtenidas entre el I.V.N. y la extracción con agua destilada cuando no hay una explicación biológica lógica?

#### **E. DONEFER:**

Las posibles explicaciones para estas correlaciones elevadas, se publicaron en el Journal of Dairy Science 46(9): 965-970. 1963.

#### **C. PERCIVAL:**

Las correlaciones derivadas por Uds. entre I.V.N. y la digestibilidad *in vitro*, se basan en la variación de digestibilidad entre especies. Hasta qué punto se ajusta esta relación para predecir diferencias dentro de especies?

#### **E. DONEFER:**

Además de las especies incluídas en nuestras relaciones *in vivo* - *in vitro*, se incluyeron también varios estados de madurez y segundos cortes de las mismas especies.

#### **J. GOMIDE:**

Tiene el Dr. Donefer experiencia con el método de solubilidad de la celulosa en cuprietilén diamina? Nuestra experiencia indica

que la precisión del método, no es tan alta como lo sugirieron sus creadores. En algunos casos, en la misma muestra, hemos obtenido 80 % de solubilidad y en otros hasta valores negativos.

E. DONEFER:

No tengo experiencia con ese método.

H. CABALLERO:

Sería de valor medir la velocidad de paso de los alimentos, como observación adicional a la determinación de la digestibilidad y del consumo de los alimentos?

E. DONEFER:

Parecería que la velocidad de paso es uno de los factores que influye en la digestibilidad de los alimentos y su consumo. Su medida, es de interés en los experimentos en los cuales se quiere aprender algo más sobre estas relaciones. En determinaciones rutinarias, es de valor dudoso, ya que constituye solamente uno de los factores que influye en el valor de los forrajes.

A. DAVIDOVICH:

Sus correlaciones entre la digestibilidad *in vitro* de la celulosa a las 12 horas y el I.V.N. se basan en pruebas llevadas a cabo en jaulas metabólicas!

E. DONEFER:

Todas las observaciones *in vivo* se realizaron con animales en jaulas metabólicas. Los ovinos se acostumbran a las jaulas por un período de un mes, antes de ser colocados en las dietas experimentales.

J. MADDALONI:

Si no se dispone de una secadora de vacío para las muestras de forraje, por cuánto tiempo y a qué temperatura se puede hacer el secado de manera que no se produzcan pérdidas durante el secado?

**E. DONEFER:**

Para evitar cambios en la composición del forraje, se recomienda que el tiempo y la temperatura de secado sea la mínima. Las condiciones exactas deben determinarse en cada laboratorio.

**P. PRESTES:**

Qué diferencias existen entre el secado en la estufa y la leofilización (en secadora - congeladora)?

**E. DONEFER:**

Los factores que parecen afectar la solubilidad de las sustancias contenidas en los forrajes, están relacionadas con la temperatura de secamiento y el contenido de humedad de las muestras. Van Soest ha indicado, que el secamiento a temperaturas menores a 45°C no afecta la solubilidad. No se sabe si es preferible obtener las muestras secas por leofilización o por secado en estufa a baja temperatura, pero las condiciones de secamiento de las muestras se pueden probar en cada laboratorio, determinando los materiales solubles en las mismas muestras de forrajes.

**R. PARRA:**

Cree el Dr. Donefer que el secamiento completo de las muestras puede afectar los resultados obtenidos con la solubilidad en pepsina ácida?

**E. DONEFER:**

Parecería que no hay diferencia en el tratamiento con pepsina-ácido clorhídrico, si las muestras son secas al aire o si se secan bajo vacío a 100°C.



**EMPLEO DE TECNICAS IN VITRO EN  
ASOCIACION CON TECNICAS DE MUESTREO  
PARA MEDIR LA DIGESTIBILIDAD Y EL  
CONSUMO DE FORRAJES BAJO PASTOREO**

**G. W. ARNOLD  
Plant Industry Division  
C.S.I.R.O., Western Australia  
Nedlands, Western Australia  
Australia**



## I. INTRODUCCION

El empleo de animales en la evaluación de pasturas, fue examinado en el Simposio anterior. En él, el profesor Reid (55) consideró las técnicas disponibles para determinar el valor nutritivo de las dietas, indicando que ya que los animales pastorean en forma selectiva, una muestra de forraje cortada de una pastura, podría solamente por coincidencia representar el forraje seleccionado por el animal. Como resultado de este hecho, los "métodos de relación" (1) tenían un valor muy relativo para predecir el forraje consumido, hasta cuando comenzó el empleo de las fistulas del esófago. Torell (58) fue uno de los primeros en utilizar esta técnica con animales en pastoreo. Su empleo, permite la colección de muestras de la dieta consumida por los animales. La composición química y botánica de la dieta puede ser determinada directamente en las muestras. El consumo de nutrientes por el animal, puede entonces estimarse si se conoce el volumen de heces fecales excretadas.

El Dr. Donefer ha discutido el problema de predecir el consumo a través de las estimaciones de la digestibilidad por los métodos *in vitro*. En este artículo se considerará el empleo de las fistulas del esófago para estimar la dieta consumida por los animales en pastoreo. La predicción del consumo, a través de la digestibilidad *in vitro* determinada en las muestras, será comparada con los métodos de relación y de índices fecales. Se discutirán también, la obtención de muestras representativas con el empleo de animales fistulados y la precisión de algunos de los procedimientos para la obtención de las muestras.

## II. MEDIDA DE CONSUMO DE LOS ANIMALES EN PASTOREO

### (1) Consideraciones generales

No hay un método directo para medir el consumo de los animales en pastoreo. Se estima generalmente, como el producto del

(1) En este artículo se entenderá por "método de relación" al que emplea la concentración relativa del indicador en el forraje y las heces fecales para predecir la digestibilidad del forraje.

volumen de heces fecales producidas y la digestibilidad (estimada) del alimento consumido.

$$\frac{\text{Materia orgánica producida (F) x 100}}{100 - D}$$

$$100 - D$$

D = digestibilidad y F = heces fecales

Las técnicas de relación y de índices fecales, se usan frecuentemente para estimar la digestibilidad.

En la técnica la relación, la digestibilidad es determinada a través de la concentración de un indicador en las heces fecales y en la dieta consumida por el animal.

$$D = 100 - 100 \frac{\text{indicador en la M.O. del alimento, \% (X}_2\text{)}}{\text{indicador en la M.O. de las heces, \% (X}_1\text{)}}$$

El indicador ideal, debe ser totalmente indigerible e inabsorbible, no debe tener acción farmacológica en el sistema digestivo, debe pasar a través del sistema a una velocidad uniforme, debe ser determinado químicamente en forma fácil y finalmente debe ser de preferencia un constituyente natural del alimento.

Por medio de la técnica de relación se puede calcular la digestibilidad aparente de todos los nutrientes en la dieta.

$$\text{Coeficiente de digestibilidad aparente} = 100 - 100 \times \frac{X_1}{X_2} \times \frac{\text{nutriente en la M.O. de las heces, \%}}{\text{nutriente en la M.O. del forraje, \%}}$$

En el método de los índices fecales, la digestibilidad se calcula solamente a través de la concentración del indicador en las heces fecales. Este indicador no necesita ser totalmente indigerible, o enteramente de origen exógeno. Las sustancias que se emplean como índices fecales se relacionan frecuentemente al factor de consumo (100/(100-D)), o Alimento/Heces Fecales (relación A/F, mejor que emplear Digestibilidad (D) ya que este factor puede ser usado directamente para estimar el consumo del forraje). Las heces fecales, desde luego representan la fracción indigerible de la dieta. El consumo se calcula empleando la digestibilidad estimada, por la ecuación:

$$\begin{array}{l} \text{Consumo de Mate-} \\ \text{ria Orgánica} \\ \text{(CMO)} \end{array} = \frac{F}{100 - D} \times 100$$

La relación entre la fracción A/F y la concentración de nitrógeno fecal, se presentan en la Figura 10. El consumo de materia orgánica puede ser estimado directamente a partir de la excreción total del nitrógeno fecal. Las relaciones se establecen por medio de experimentos de alimentación, en confinamiento y pueden aplicarse a los animales en pastoreo, para la predicción del consumo o la digestibilidad.

## (2) Medida de las heces fecales producidas

### A) Colección total.

Se puede medir la producción de heces fecales de los animales en pastoreo, directamente por medio de la colección total. El método es relativamente simple en ovinos, pero es más difícil y más costoso, tanto en tiempo como en equipo, en vacunos. La medida puede realizarse sin error, cuando los animales están acostumbrados al uso de los arneses de colección, si asumimos que no existe ninguna pérdida de heces.

### B) Uso del óxido de cromo.

Se puede también estimar el volumen de heces fecales, por medio de la concentración de un indicador inerte en las heces, el cual se da en forma regular a los animales y el que no se encuentra regularmente en los excrementos. El óxido de cromo se emplea extensamente para este propósito. Se evita la colección total de heces, por medio de esta técnica, si se puede obtener una muestra representativa de las heces producidas. Para esto, es preciso que haya un recobro del 100 % del indicador.

$$\text{Volumen fecal producido} = \frac{\text{peso del indicador inerte ofrecido}}{\text{concentración en las heces fecales}}$$

Hay dos métodos que se usan para obtener muestras de las heces fecales: muestreo directo del recto y recolección de heces del suelo. En el primero, los animales a los cuales se les administra la dosis dos veces al día, son muestreados también dos veces al día; generalmente temprano en la mañana y tarde en la tarde. Las muestras del suelo se pueden obtener por medio de una muestra al azar o recogiendo todas ellas.

Hay inconvenientes serios para el uso del óxido de cromo (algunos otros indicadores son peores) debido al recobro bajo y a la variación diurna, imprevisible en la excreción. Algunos resultados de la literatura se resumen en el Cuadro 10. Es evidente que la cantidad del óxido de cromo que se administra al animal, se recobra completamente en las heces en muy pocas ocasiones. En algunas oportunidades se ha conseguido recobrar el 100 % (34, 35), pero las estimaciones del volumen de heces fecales producidas, tuvieron errores grandes. No parece posible estimar el volumen de heces fecales por este método, con un error  $\pm 10\%$  del verdadero volumen excretado. Con mayor frecuencia, se consigue un recobro incompleto del óxido de cromo y como resultado una sobreestimación de las heces fecales.

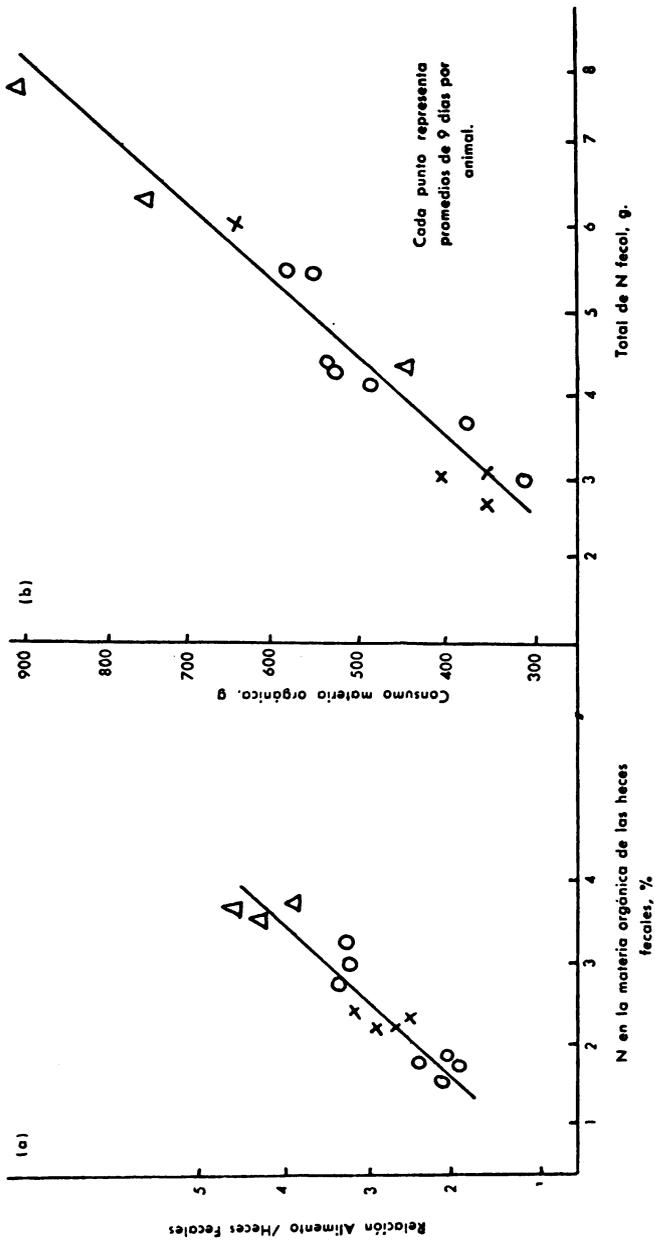


FIGURA Nº 10. — (a) Tendencia debida principalmente a la calidad del forraje,  
 (b) Tendencia debida a la variación en calidad del alimento y la producción individual de heces fecales.  
 ○ 6-20 Junio, × 30 Mayo-20 Junio; △ 10-18 Agosto; ○ 10-18 Julio.

CUADRO N° 10 — Uso del óxido de cromo para estimar el volumen de heces fecales.

Referencia	Forma de administración	Alimento	Especie	Dosis	Colección total. Recobro	Recobro por muestreo del recto.
21	En la ración	Heno grano	Vacuno	Diaria	% 99,1	am. pm. Peor recobro que colección total.
41	Cápsulas o papel	Pastoreo	Ovino Vacuno	Dos al día	91-102	errores más estables con el papel, peores con muestras del recto.
42	Cápsulas o papel	Pastoreo	Vacuno	Dos al día		errores menores muestreando del suelo
35	Cápsulas	Pastoreo	Ovino	Dos al día	101 ± 12	compuesta de 5-7 días muestreo del recto dió recobro 102 ± 14 %
59	Cápsulas eliminación lenta	Varios	Ovino	Pasando un día	64 - 94	
25	Cápsulas		Vacuno	Diario	96 - 103	
53	Cápsulas	Pastoreo	Ovino	Diario	97 - 102	excreción no uniforme que permita sistematizar colección del recto.
29	Cápsulas	Pastoreo	Vacuno	Dos al día	89 - 98	recobro a las 6 y 18 horas, 90 - 96.
34	Cápsulas	Pastoreo	Ovino	Dos al día	100 ± 8	
20	Cápsulas	Pastoreo	Ovino	Dos al día	93	no dió mejor resultado

La variación diurna de la concentración de óxido de cromo en las heces de los animales en pastoreo o estabulados es sumamente alta. En 1955 Raymond y Minson (53), encontraron que no había una excreción uniforme que permita establecer un sistema seguro, para

el muestreo del recto. Lambourne Rearden (35), encontraron que se puede estimar el volumen de heces fecales producidas por ovejas, con un error hasta del 14 %, recogiendo muestras del recto dos veces al día durante 5 a 7 días. Este error es demasiado grande, para su empleo en algo que no sea los tipos más crudos de investigación. Por ejemplo, un 15 % de error en una excreción promedio de 200 gms. y una digestibilidad de 75 % en la dieta, implica que el consumo puede ser estimado entre 410 a 690 gr, esto es un 68 % de diferencia. Este cálculo no deja margen para los errores en la estimación de la digestibilidad.

El método de recolección de heces fecales del suelo, está sujeto a errores menores (42), es fácil y rápido de realizar con el ganado vacuno, pero es más dificultoso con ovinos. Las heces pueden individualizarse si se administra a los animales partículas de polietileno de diferentes colores (50).

### c) Conclusiones.

En ovinos se debe realizar siempre colección total de heces; en ganado vacuno, la colección total es preferible; si se emplea el óxido de cromo es recomendable el muestreo del suelo. El volumen de heces fecales estimadas debe ser ajustada a un recobro standard de 95 % de óxido de cromo.

## 3) Técnicas de relación

Los métodos de relación y de índices fecales no son totalmente satisfactorios para estimación del consumo. La sustancia indicadora que se emplea en el método de relación debe ocurrir naturalmente en la planta, debe ser indigerible y permanecer inatacada en su paso a través del animal. Como indicadores se han sugerido a la lignina, sílica y a los cromógenos, pero no son satisfactorios.

### (A) Lignina

La lignina es difícil de determinar químicamente y ocurre en distintas formas químicas en diferentes especies y estados de crecimiento. Como resultado, las medidas del contenido de lignina son muy sensibles a la técnica analítica empleada. Repetidamente han aparecido publicaciones que indican que el ganado ovino y vacuno son capaces de digerir la lignina. En el Cuadro II se presentan algunos resultados obtenidos por Moon (comunicación personal).

**CUADRO N° 11. Digestibilidad de las fracciones de lignina. (Moon, comunicación privada).**

	Heno de pasto Timothy	Gramíneas verdes
N° de ovejas .....	2	4
Lignina insoluble en ácido, % .....	-0,1 ± 3,6	-4,3 ± 3,7
Lignina insoluble en ácido, % .....	21,3 ± 7,4	41,2 ± 3,2
Lignina total, % ....	10,9 ± 2,1	17,3 ± 2,5

**(B) Sílice**

Jones y Handreck (31) encontraron que el contenido de sílice en las heces fecales era un buen indicador de la digestibilidad de las dietas ofrecidas en forma de cubos. Las evidencias anteriores, que se encuentran en la literatura, son contradictorias. Recientemente, se encontró que el sílice es retenido en forma muy variable por el animal (49, 51). En condiciones de pastoreo, el sílice puede ser una de las contaminaciones más importantes de la dieta.

**(C) Cromógenos**

Los cromógenos se pueden extraer de las heces y del alimento con una solución acuosa del 85 % de acetona. Los pigmentos deben ser extraídos en un mínimo de luz. La concentración de los pigmentos aumenta después de la extracción. La lectura de los pigmentos se hace generalmente a 411 milimicrones. En general el procedimiento analítico es tedioso. En muchas especies de praderas naturales, el contenido de cromógenos es demasiado bajo para emplearlo (23).

**(D) Muestreo de la dieta**

Obtener una muestra de la dieta, es un problema muy difícil, del que participan todas las técnicas de relación. Es preciso obtener una muestra representativa de la dieta consumida por los animales que pastorean. Los métodos indirectos, como el de arrancar el forraje simulando el pastoreo (22) tiene limitaciones serias. El empleo de animales con fistulas del esófago debería eliminar este problema. Todo lo que necesitamos es un indicador de características adecuadas.

#### (4) Técnicas de los índices fecales

##### (A) Sustancias indicadoras

A pesar de que la concentración fecal de cobre, magnesio, sílice (49), una fracción disuelta de las heces (52), fibra cruda (54), celulosa (39), cromógenos (32, 40, 60) y nitrógeno (10, 32, 36, 40, 54), entre otros, ha sido examinada como indicadora de la digestibilidad, la concentración de nitrógeno es la que generalmente se prefiere.

Es adecuado discutir en este momento, la precisión con la cual se puede realizar la estimación del consumo, con el empleo de los índices fecales.

McManus y colaboradores (49) compararon recientemente el nitrógeno, cobre, magnesio y el sílice como sustancias indicadoras. Los resultados se presentan en el Cuadro 12. En este trabajo se emplearon 11 diferentes tipos de forrajes. Los forrajes estaban distribuidos desde uno extremadamente duro a otro muy verde y de alta digestibilidad, y fueron agrupados en tres clases. Los autores calcularon regresiones entre el consumo y la excreción total de los indicadores. Las relaciones más precisas se obtuvieron con el nitrógeno, como indicador fecal; la segunda relación de importancia fue la del magnesio fecal. Para el nitrógeno, la desviación standard residual fue de  $\pm 64$  g. El sílice actuó como un mal indicador del consumo. No se pudo derivar en ningún caso, ecuación única de regresión que se aplique a todas las clases de forrajes, inclusive cuando se empleó el análisis de regresión múltiple.

CUADRO N° 12. Comparación del Nitrógeno, Cobre, Magnesio y Sílice en regresiones del índice fecal  
(CMO = a + b FX)

Indicador	Relación F para diferencias en la inclinación entre alimentos	Relación F para desplazamiento vertical entre alimentos	DE dentro de alimentos	Correlación dentro de alimentos
			g	
N	1,09	4,91*	64,5	0,967
Cu	0,79	0,17	131,1	0,856
Mg	15,21**	44,96**	109,5	0,902
Si	—	5,89**	251,3	0,246

CMO = consumo de materia orgánica; F = heces fecales

\* P < 0,05; \*\* P < 0,01

Raymond y colaboradores (54), estudiaron los siguientes indicadores como índices fecales para un rango muy amplio de forrajes, fibra cruda, nitrógeno y cromógenos, expresados como concentración en las heces fecales. En el Cuadro 13 se presentan los errores de las estimaciones obtenidas. También en este caso, el nitrógeno fue la sustancia indicadora de preferencia.

Langlands y Corbett (40), compararon la fracción soluble de las heces y el nitrógeno como índices fecales. En el Cuadro 14 se

CUADRO N° 13. Errores standard de la estimación de digestibilidad (54).

Indicador	
Macerado de fibra cruda en la MO de las heces, % .....	± 5,96
Nitrógeno en la MO de las heces fecales, % .....	± 5,66
Unidades de cromógenos/g heces fecales .....	± 6,85

CUADRO N° 14. Coeficientes de correlación entre la relación alimento/heces fecales y el porcentaje de fracción disuelta de las heces y el porcentaje de nitrógeno en la materia orgánica fecal, (40).

Prueba	Fracción disuelta de las heces fecales	Contenido de Nitrógeno en las heces fecales
1	0,950	0,946
2	0,938	0,927
3	0,299	0,780
4	0,811	0,905
5	0,863	0,917
6	0,892	0,911
7	0,144	0,812
8	0,649	0,920
9	0,286	0,245

presentan los coeficientes de correlación entre la digestibilidad y la fracción disuelta de las heces fecales y entre la digestibilidad y el contenido de nitrógeno de las heces fecales de las nueve pruebas de digestibilidad empleadas. También, el nitrógeno fecal fue el método más preciso y de mayor confianza, en todos los alimentos. Con los dos métodos, se encontraron diferencias significativas entre las ecuaciones de regresión para los diferentes alimentos.

Mientras que en algunas situaciones (32), los cromógenos fueron menos precisos que el nitrógeno, en otras tuvieron igual precisión (26). Sin embargo, la simplicidad en la determinación del nitrógeno hace a este el indicador de preferencia.

## (B) Nitrógeno fecal

Desgraciadamente, no se ha podido establecer una regresión general entre la digestibilidad, la relación de alimento a heces fecales o el consumo y el porcentaje de nitrógeno o el total de nitrógeno en las heces fecales, que se aplique a todos los forrajes. Aparentemente la relación varía entre especies (10), épocas del año (27, 36), estado de desarrollo de la planta (10, 36) y posiblemente, con la nutrición de la planta. No todos estos factores operarán simultáneamente, en un medio ambiente determinado. Por el lado de los animales, la relación variará para cada especie de animales, para individuos (43) y para condiciones físicas y fisiológicas del animal, las cuales pueden ser muy importantes. Este último factor incluye el parasitismo y el nivel de consumo debido al estado nutritivo previo y a condiciones reproductivas.

Es necesario, por tanto, limitar el rango de forrajes a los cuales se aplican las regresiones. Para obtener alta precisión, puede ser necesaria una regresión que se limite a una sola especie de forraje, cortada en una época del año. A éstas se las conoce con el nombre de regresiones "locales". Considerando que los animales pastorean selectivamente, hay un riesgo considerable en el error que se puede cometer al aplicar las regresiones obtenidas con forraje cortado, para estimaciones de consumo en pastoreo. Este error, o extrapolación, es matemática y biológicamente inaceptable. El riesgo es particularmente elevado con regresiones locales. Se puede reducir el riesgo, usando una regresión general, la cual se haya derivado con un rango muy grande de forrajes, porque en esta forma, la posibilidad de incluir la dieta que el animal consume, dentro del rango de especies o de forrajes estudiados, es bastante razonable. Sin embargo, en este caso, la precisión de la estimación es menor. El error standard en la estimación del consumo de un individuo, a través de una regresión general, de esta naturaleza, fue de  $\pm 23\%$  (36). Arnold y Dudzinski (10), demostraron que la precisión de las estimaciones obtenidas

con regresiones generales, podrían mejorarse con el empleo de regresiones múltiples, en las cuales el volumen de heces fecales, se incluye como una variable independiente.

#### (5) Técnicas *in vitro*

En algunas oportunidades, no es posible derivar regresiones con el nitrógeno fecal, para dietas de animales en pastoreo. Frecuentemente, los animales seleccionan arbustos y materiales los cuales no pueden ser cortados para realizar pruebas de digestibilidad. En vista de esta limitación, se ha empleado un método alternativo para estimar el consumo. La digestibilidad se determina por uno de los métodos *in vitro*, en muestras recogidas por medio de fistulas del esófago; el volumen de heces fecales excretadas se mide por medio de la colección total (12, 37, 39).

Los errores en este método pueden derivarse del muestreo de la dieta, de la preparación de las muestras para el análisis y del método analítico.

Los errores de las dos primeras fuentes serán detallados más adelante. Tilley y Terry (57), obtuvieron un error standard de  $\pm 2,3$  unidades de porcentaje, al predecir la digestibilidad *in vivo* con su método de digestibilidad *in vitro*, el cual emplea dos fases. La constancia, en esta técnica, fue estimada en  $\pm 1,2$  unidades de porcentaje. Otros errores en la técnica analítica fueron discutidos por el Sr. Raymond. Finalmente también hay errores inherentes al uso de un rumen "standard" para todos los animales. Estos errores se reflejarán en la precisión de las estimaciones del consumo en animales individuales.

#### (6) Comparación de las técnicas del índice fecal e *in vitro*

##### (A) Evidencia experimental

Recientemente, Arnold y Dudzinski (12), compararon las estimaciones del consumo de materia seca obtenidas con las regresiones del nitrógeno fecal ( $CMO_F$ ) y de la digestibilidad *in vitro* de una muestra de la dieta ( $CMO_D$ ).

Bajo condiciones de alimentación estabulada, en las que se puede medir directamente el consumo y determinar los errores producidos, se encontró que el método del nitrógeno fecal era más preciso. Se utilizaron regresiones individuales para cada forraje, con el nitrógeno fecal, y una sola determinación de la digestibilidad *in vitro* del alimento consumido, para cada estimación del consumo. Esto es esencialmente lo que pasaría en el campo, en el cual un

cierto número de ovejas fistuladas o ganado vacuno fistulado, se emplearía para establecer una digestibilidad media, aplicable a todo el hato. El volumen de heces fecales excretadas, se mediría en los animales normales, los cuales formarían parte del estudio de consumo y productividad.

La digestibilidad *in vitro* se determinó en el mismo forraje en seis grupos sucesivos de muestras de manera que se pudo calcular el error de la técnica *in vitro*. En el Cuadro 15 se presentan las desviaciones standard residuales de las mejores y peores regresiones *in vitro* y para la predicción con el nitrógeno fecal. En trabajos similares, Langlands (37), encontró que el error de estimación de la digestibilidad era mayor con el método *in vitro*, que con el método fecal, cuando se empleaban regresiones locales.

CUADRO N° 15. Comparación de las desviaciones standard de las regresiones de consumo de materia orgánica en el consumo de materia orgánica por los índices fecales y consumo de materia orgánica por digestibilidad *in vitro*, (11).

Peor relación con <i>in vitro</i> .....	135
Mejor relación con <i>in vitro</i> ....	92
Nitrógeno fecal .....	89
Nitrógeno fecal + <i>in vitro</i> ....	82

El consumo de ovejas fistuladas secas, preñadas y en lactancia, se estimó por medio de los dos métodos y bajo variadas condiciones de pasturas. La regresión  $CMO_D = a + b CMO_F$  indicó que, para todas las condiciones fisiológicas y todas las pasturas, había una relación lineal entre las dos estimaciones del consumo. Las gradientes eran homogéneas y cercanas a la unidad. Sin embargo, se encontró una variación estacional en los valores de *a*, es decir, debida a las condiciones cambiantes de la pastura. (Figura 11). La mayor parte del efecto (hasta 8 %, dependiendo de la condición fisiológica), se debió a diferencias en el nivel de consumo, contenido de nitrógeno y digestibilidad de la dieta.

En otros experimentos, se comparó el consumo relativo de ovinos y vacunos, por medio de los dos métodos (Arnold, trabajo no publicado). Los resultados se presentan en el Cuadro 16. La estimación del consumo de los vacunos relativo al consumo de los ovinos, fue diferente en los dos métodos. No hubo una relación clara entre las diferencias en la estimación y el contenido de nitrógeno en la dieta y su digestibilidad.

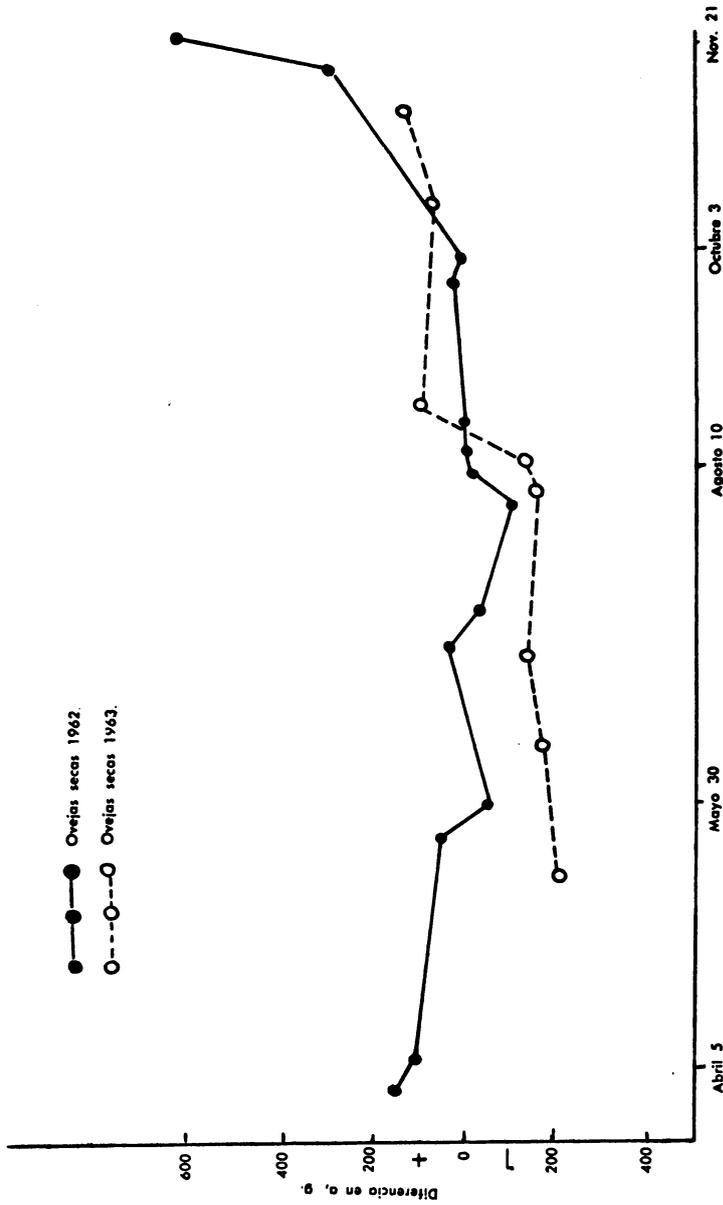


FIGURA Nº 11. Cambios estacionales en la intercepta de las ecuaciones CMO (in vitro)  $\equiv a + b$  CMO (NF).

CUADRO N° 16. Comparación de los métodos de nitrógeno fecal e *in vitro* en vacunos y ovinos.

					CMO vacuno/ CMO ovino, <i>in vitro</i>	NF vacuno/ NF ovino	Diff.
	Pastura		Digestib.	N heces	A	B	A - B
Serie 1	Falaris	Ovinos	% 56,8	% 2,86	11,5	10,9	-0,6
		Vacuno	56,5	1,94			
	Alfalfa	Ovinos	75,2	3,53	16,0	17,0	+1,0
		Vacuno	72,0	2,90			
	Ryegrass	Ovinos	67,9	3,21	13,6	14,4	+0,8
		Vacuno	56,6	2,14			
	Dactylis	Ovinos	54,4	2,04	14,3	13,0	-1,3
		Vacuno	55,5	1,59			
	Natural	Ovinos	59,0	1,83	10,8	10,5	-0,3
		Vacuno	55,5	1,16			
Serie 2	Falaris	Ovinos	76,5	4,10	12,8	10,0	-2,8
		Vacuno	76,5	4,08			
	Ryegrass	Ovinos	75,0	2,65	12,8	10,9	-1,9
		Vacuno	75,7	2,32			
	Dactylis	Ovinos	73,8	3,27	15,0	13,2	-1,8
		Vacuno	74,2	2,87			
	Alfalfa	Ovinos	77,5	4,19	12,9	13,3	+0,4
		Vacuno	74,7	4,03			
	Festuca	Ovinos	70,3	2,64	9,0	8,1	-0,9
		Vacuno	70,1	2,26			
Natural	Ovinos	68,7	2,32	10,0	6,8	-3,2	
	Vacuno	62,8	1,62				

CMO = consumo de materia orgánica; NF = nitrógeno fecal

Langlands (39), aplicó un cierto número de ecuaciones de regresión derivadas en el establo, las cuales relacionaban el Factor de Consumo con los índices fecales (nitrógeno, celulosa y fracción soluble de las heces), a animales en pastoreo, los cuales tenían fistulas del esófago. El autor, comparó las estimaciones de digestibilidad obtenidas con las ecuaciones, con aquellas que obtuvo por el método *in vitro*. Los animales en el establo fueron alimentados con el mismo tipo de pastura en la cual pastoreaban los animales fistulados. Los resultados fueron extremadamente variables y ninguna de las regresiones dio digestibilidad similares a la digestibilidad *in vitro* de los animales que pastoreaban. Sin embargo, cuando aplicó una regresión general del nitrógeno fecal, para predecir la digestibilidad, encontró una concordancia mucho mayor. Desde luego, pudieron existir errores en el método *in vitro*. A pesar de esto, los resultados ilustran el requisito básico del método de índice fecal, de obtener regresiones derivadas con material similar a aquel que los animales están consumiendo en pastoreo. Las regresiones locales fueron malas predictoras, pero la regresión general, predijo la digestibilidad con similaridad al método *in vitro*. El hecho de que hubo acuerdo, sugiere una concordancia razonable entre los dos métodos.

#### (B) Evaluación de las dos técnicas

Las pruebas realizadas en el establo, para comparar los dos métodos, son ventajosas para el método *in vitro*, porque en el campo se pueden producir errores adicionales de muestreo. Además, el método *in vitro* no permite la introducción del efecto individual en la eficiencia digestiva. Así mismo, cuando se emplean los métodos *in vitro* tampoco pueden tomarse debidamente en cuenta los efectos que tienen sobre la digestibilidad el nivel de consumo y la condición fisiológica del animal. En condiciones de pastoreo, si se emplea un valor promedio de digestibilidad, se ignora inmediatamente las diferencias en la selectividad. A pesar de ésto, no hay extrapolación de las condiciones conocidas del corral a las condiciones desconocidas del pastoreo.

Mientras que la mayor parte de los errores asociados con el empleo de los métodos *in vitro* en el campo, pueden ser predecidos a través de medidas realizadas en el establo, los errores similares para los métodos de nitrógeno fecal no pueden ser determinados. A pesar de que, la relación entre el consumo y el nitrógeno fecal, puede ser alterada bajo condiciones de pastoreo, la evidencia disponible hasta este momento parecería indicar que no lo es (15).

El problema de mayor importancia con el método del nitrógeno fecal, es el riesgo de la extrapolación. Como se indicara anteriormente, el riesgo se deriva de los muchos factores que influyen en la relación.

En forrajes con un contenido bajo de nitrógeno, es probable que el método del nitrógeno fecal sea menos eficiente. En este caso la proporción de nitrógeno consumido que es retenido, será relativamente más alto y por lo tanto, la relación CMO-NF varía más con forrajes individuales. Otro problema con ovinos, es el hecho de que la relación puede diferir, si el contenido de nitrógeno en el forraje está fuera del rango 8 a 45 g por día (30).

Las diferencias que se encuentran entre los dos métodos y que se deben al contenido de nitrógeno de la dieta, seguramente actúan corrigiendo solo al método del nitrógeno fecal, porque el nitrógeno no forma parte del método *in vitro*. En el método del nitrógeno fecal, el efecto del nivel de consumo sobre la digestibilidad está parcialmente considerado en la regresión; en cambio, si el nivel de consumo afecta la digestibilidad, con el método *in vitro* se pueden producir errores en las estimaciones, porque éste no considera el nivel de consumo. Así, es posible que se consiga una mejor estimación del consumo si se incluye en la regresión del nitrógeno fecal, términos para el contenido de nitrógeno de la dieta y su digestibilidad. También puede emplearse un término para el consumo, como por ejemplo el consumo por unidad de peso.

#### (7) Conclusiones

No puede recomendarse el método de relación, porque no se ha encontrado un indicador adecuado. El método del nitrógeno fecal, puede dar resultados adecuados, bajo ciertas condiciones. En lo que se refiere al método *in vitro*, requiere más examen y estudio. Sin embargo, como es el caso con el método de relación, este depende de la obtención de muestras representativas de la dieta. Este problema será discutido en la sección IV.

Debe recordarse que al hacer estimaciones de consumo en el campo, no se pueden determinar diferencias menores de 25 %. Dentro de lo posible, el método del nitrógeno fecal debe ser unido al empleo de animales fistulados, con los cuales se pueda determinar digestibilidad *in vitro* de la dieta y su contenido de nitrógeno, para incluir éstas, en las regresiones. Bajo condiciones extensivas de pastoreo, o bajo condiciones en las cuales no se pueden obtener regresiones del nitrógeno fecal, el método *in vitro* es el único que puede ser usado en la estimación de la digestibilidad y del consumo. La única otra posibilidad, en este caso, sería el empleo del método de relación, pero como se indicó anteriormente, no se ha encontrado todavía un marcador adecuado.

Se debe considerar cuidadosamente, la utilidad de realizar medidas de consumo en experimentos de pastoreo. Estas estimaciones se deben realizar posiblemente, solo cuando las diferencias que se observan en la producción de los animales, no pueden ser explica-

das simplemente en términos del rendimiento de las pasturas. Véase sección III.

Es necesario que se realicen más comparaciones entre el nitrógeno fecal y los métodos *in vitro*. Hasta este momento, lo único que puede decirse es que hay diferencia y que éstas no pueden ser atribuidas necesariamente a ninguna causa en particular. Tampoco sabemos cual de los dos métodos es mejor. Sabemos que las predicciones del consumo, realizadas por medio de las regresiones generales del nitrógeno fecal, para ovinos, en experimentos de larga duración deben ser capaces de explicar diferencias en la productividad de los animales (15, 17).

### III. FACTORES QUE INFLUYEN EN EL CONSUMO DE LOS ANIMALES EN PASTOREO

#### (1) Consideraciones generales

En una serie reciente de artículos (4, 5, 6, 11, 13), Arnold y sus colaboradores demostraron la influencia de varios factores propios de la planta y de los animales en el consumo de forraje por ovejas en pastoreo. Estos factores se resumen en la Figura 12. La satisfacción del apetito, el cual es determinado por la demanda momentánea de energía, depende de la respuesta favorable a la urgencia del hambre, es decir, depende del tiempo empleado en pastorear y de la velocidad de consumo. Hay interacciones importantes entre las condiciones de la planta, las condiciones del animal y otros factores del medio ambiente, particularmente el clima.

En general, existe una relación asintótica entre la cantidad de alimento disponible y la cantidad de alimento consumido por los animales. Pero, no hay una relación consistente entre una sola de las variables de la pastura y el consumo de los animales. La estructura de la comunidad vegetal es una determinante importante del consumo. De esta manera, el largo de las hojas y la densidad de la pradera son factores que afectan la velocidad de consumo, y juntos, son determinantes del rendimiento de la pastura. Si se mide simplemente el rendimiento de la pradera, sin describir su estructura física, puede no obtenerse ninguna indicación del tipo de consumo que se puede esperar.

El animal se encuentra cada día con condiciones cambiantes en su medio ambiente. La velocidad a la cual estos cambios se producen, está determinada en buena medida por la presión del pastoreo, relativa a la velocidad de crecimiento del forraje y como resultado, puede estar incrementando o disminuyendo. El animal, debe ajustar constantemente su comportamiento en pastoreo, a las condiciones cambiantes de la pradera.

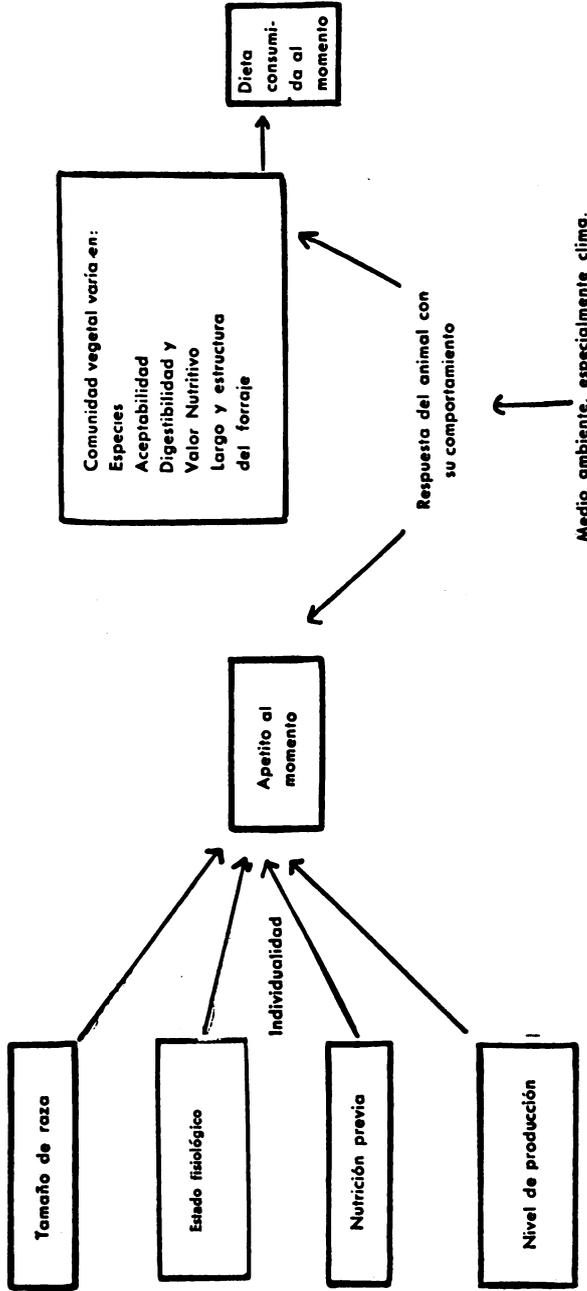


FIGURA Nº 12. Factores que afectan el consumo por los animales,

Arnold (1, 2, 4, 7, 11), examinó la relación existente entre el tiempo de pastoreo y la velocidad de consumo, bajo distintas pasturas. Si dos grupos de animales, o también en ese sentido si dos animales, tienen diferentes consumos, ellos deben comer por períodos diferentes de tiempo o comer a velocidades diferentes. La velocidad de consumo (expresada como el forraje consumido por hora de pastoreo), puede variarse tomando bocados más frecuentes o tomando bocados más grandes. Bajo muchas condiciones, los dientes incisivos centrales sólo, son capaces de cortar el forraje y por lo tanto, el largo del bocado está determinado por la longitud del forraje disponible. Cuando existe una abundante cantidad de forraje, el animal puede tomar bocados más grandes, si así lo desea y por lo tanto, se puede producir una variación más grande en la velocidad de consumo.

El tiempo durante el cual un animal puede pastorear durante un día está limitado por la fatiga y ésta limita también, la velocidad a la cual el animal consume el forraje; sin embargo, algunas condiciones fisiológicas pueden elevar o disminuir estos límites (7). Como resultado, bajo ciertas condiciones, particularmente cuando las praderas son de corto crecimiento, el animal no está en capacidad de aumentar su tiempo de pastoreo o la velocidad de pastoreo. En este punto, el consumo debe disminuir. La Figura 13 resume estas relaciones.

## 2) Grado de aceptación del material vegetal y su efecto en el consumo.

Recientemente, Arnold (8, 9) investigó la importancia que tienen la visión, el olfato, el tacto y el sabor sobre el pastoreo selectivo y el consumo de alimento por ovinos. El olfato, el tacto y el gusto están relacionados con el consumo selectivo (3, 9). Todas las plantas, tienen características físicas o constituyentes químicos, que producen estímulos favorables o desfavorables a estos sentidos. Es posible, que el animal cuando está pastoreando selectivamente, balancee los estímulos favorables y desfavorables de una especie, con aquellos de otras especies. Se producen cambios importantes en el grado de aceptación a especies o variedades dentro de especies, cuando uno de estos sentidos es afectado. También se pueden producir aumentos o disminuciones significativas en el consumo de especies puras, como resultado de perturbación en alguno de los sentidos. Todos los sentidos son importantes, cuando se consideran todos los tipos y estados de las pasturas.

En condiciones específicas, es decir por ejemplo para una especie en particular, en una época del año, uno de los sentidos es muchas veces el de mayor importancia, porque una característica individual de la especie está dominando su grado de aceptación.

Se podría postular que la producción de los animales en una pastura, podría ser baja en un momento dado, no porque la disponibilidad del forraje limita el consumo, sino simplemente porque el forraje es inaceptable. Se han encontrado ejemplos en medio ambientes particulares. Las especies de *Trifolium* y *Medicago sativa*, presentan un marcado cambio en el grado de aceptación y consumo, relativo al de los pastos, con las estaciones. En este caso, el estímulo importante parece ser olfatorio.

En un programa de investigación que está actualmente en marcha, se determinan los constituyentes químicos reconocidos por el gusto y el olor y se miden las curvas de concentración para esos constituyentes en los forrajes. Las indicaciones al momento, son de que las ovejas presentan respuestas olfatorias a un rango bastante

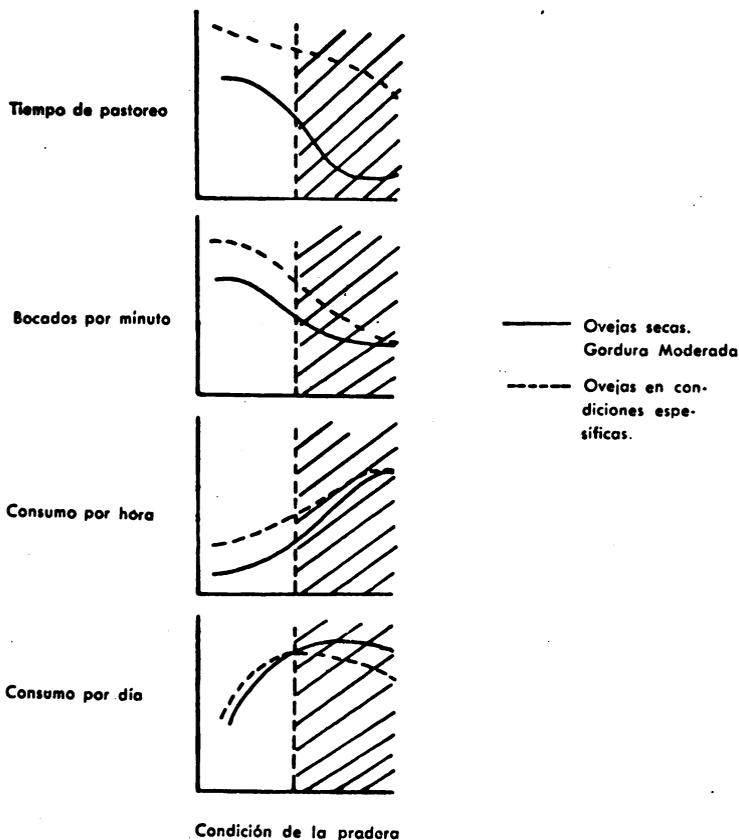


FIGURA N° 13. — Ajustes en el pastoreo de los animales y el mantenimiento del consumo bajo condiciones cambiantes de la pradera.

amplio de sustancias presentes en las plantas, que incluye aceites esenciales, ácidos orgánicos, ácidos aminados, aldehidos, cetonas y alcoholes. De la misma manera, el consumo de un alimento puede ser alterado considerablemente, por la adición de cantidades pequeñas de ciertos constituyentes de las plantas, por ejemplo, alcaloides, cumarinas, constituyentes fenólicos y ácidos orgánicos aminados.

Van Soest (64), encontró una relación entre la composición química, la digestibilidad y el consumo voluntario de forraje por los rumiantes. Su conclusión, fue que la composición química estaba más relacionada a la digestibilidad que al consumo voluntario. En algunas especies forrajeras, existe una relación bastante marcada entre el consumo voluntario y los componentes químicos; en estos casos, el índice de valor nutritivo (24) puede ser predecido con cierta precisión; en otros casos, no hay relación significativa entre el consumo voluntario y la digestibilidad o entre la composición química y el consumo voluntario. Van Soest (64), llegó a la conclusión de que en los forrajes de alta calidad, como la alfalfa y pastos tiernos, el balastro (ballast) es insuficiente para disminuir el consumo y que por tanto, otros factores son de mayor importancia. Se conoce muy poco sobre estos otros factores.

#### IV. PROBLEMAS QUE SE ENCUENTRAN EN EL EMPLEO DE ANIMALES CON FISTULAS DEL ESOFAGO

##### (1) Consideraciones generales

Van Dyne y Torell (63), hicieron una revisión general sobre el desarrollo y uso de las fístulas del esófago. En su revisión, se refirieron específicamente al uso en ovinos y vacunos. En vacunos, también se pueden obtener muestras directamente de la cardia del rumen de animales fistulados, en la misma manera que se hace con la fístula del esófago. La discusión que sigue, se aplica igualmente a las dos técnicas.

Consideraremos los problemas generales que se encuentran en los animales fistulados. Para ser de verdadero valor, los animales fistulados, deben ser normales respecto a su comportamiento y productividad. Los animales provistos con una fístula del esófago excesivamente grande, estarán sujetos a condiciones más desfavorables que aquellos con fístulas más pequeñas y no ganarán en peso ni consumirán en forma similar a los animales normales (16). Las fístulas impiden las contracciones normales rítmicas durante la deglución. Las ovejas que tienen fístulas de tamaño normal ganan de peso y pueden producir y criar corderos, tan bien como ovejas que no tienen fístula (16). Esto se aplica también el ganado vacuno. (Arnold, resultados no publicados).

El éxito en la colocación de fístulas del esófago, debe ser elevado, entre el 80 y 90%. Un grupo de 56 ovejas con fístulas del esófago, fue establecido en 1962. Estas ovejas tenían entonces, entre 1 y 3 años de edad. Hacia julio de 1966, el grupo se ha reducido a 24 ovejas. Las muertes en el grupo de animales fistulados fue de 14% por año, comparado con una normal, en condiciones de medio ambiente similar, del % 5 por año. Resultados de la misma magnitud, fueron encontrados por Leigh en trabajos realizados en Deniliquin bajo condiciones de secano, en un área semi-árida. Bajo condiciones adversas de alimentación con comida seca, ocurren muertes en ovinos fistulados por razones desconocidas; no sucede lo mismo con el ganado vacuno.

Si se toman muestras frecuentemente, el metabolismo del animal puede sufrir trastornos serios. Los períodos de colección de más de una hora pueden muy bien causar disfunción en el rumen (47). La pérdida de electrolitos en la saliva causa una respuesta nerviosa inmediata y como resultado, selectividad del animal por plantas ricas en sodio(5).

## 2) Fuentes de error en la obtención de muestras representativas de la dieta

### A) Variación diurna en la composición de la dieta.

En el Cuadro 17 se resumen los resultados experimentales obtenidos hasta la fecha. Parecería que hay variación diurna, tanto en la composición botánica, como en la composición química de la dieta. Langlands (38), encontró una variación diurna definida para el contenido del nitrógeno. El contenido de nitrógeno en invierno aumentó rápidamente durante la mañana, hasta un pico aproximadamente a las 14 horas, y luego disminuyó ligeramente. La distribución no fue diferente entre ovejas, entre días o entre praderas.

Se podrían esperar variaciones diurnas, simplemente debido a diferencias en las áreas, dentro de un potrero, en las cuales los animales están pastoreando en diferentes horas del día. Asimismo, se podría esperar variación diurna en constituyentes químicos, tales como los carbonhidratos solubles, porque existen variaciones en el contenido de ellos en la planta misma. Para evitar este problema, Langlands sugiere que se obtengan muestras a horas del día escogidas al azar, en días diferentes, o de lo contrario, en momentos fijos cada día si la composición de la muestra representativa y de las muestras recogidas es similar. La obtención de muestras al azar, es criticable porque no permite tomar en cuenta la tendencia de las ovejas, para pastorear a horas específicas del día y la posibilidad de que se consuma a diferente velocidad en esas horas. Desde luego, es bien conocido que las ovejas pastorean a diferentes horas en las estaciones del año. Los tra-

bajos de Langlands sobre el nitrógeno, se realizaron en el invierno, cuando las ovejas pastorean más o menos continuamente durante el día. La distribución es muy diferente en el verano y la variación diurna en la dieta puede ser también diferente.

CUADRO N° 17. Variación diurna en la dieta seleccionada.

Referencia	Resultado
16	Diferencias no significativas en N, carbohidratos solubles y composición botánica.
33	El N y energía más alto en la tarde; no hubo diferencia en el extracto etéreo, celulosa y ceniza.
38	Variación diurna definida en N; cambios en el contenido de P pero sin forma definida.
56	Cambios en N y digestibilidad, pero sin forma definida.
61	Diferencias significativas en la composición botánica; algunas diferencias en el contenido de N.

(B) Variación entre días y entre animales

Existen variaciones significativas entre días y entre animales (ovejas o vacunos), en la composición química y botánica de la dieta seleccionada. Debe enfatizarse, el hecho de que esto se aplica a animales que están en pastoreo continuo y no a sistemas de pastoreo rotativo o en franjas, en los cuales se puede esperar grandes variaciones entre días y por cierto, grandes variaciones dentro de un día.

Arnold (16), encontró que la variación entre ovejas y entre días fue altamente significativa para el contenido de nitrógeno, pero no para el porcentaje de gramínea o el porcentaje de carbohidratos solubles. En estos últimos, la variación era demasiado grande para que existan diferencias consistentes. La variación en el contenido de nitrógeno, fue mayor entre ovejas que entre días. No se encontró interacción significativa entre ovejas y días. Langlands (38), encontró que la variación entre días y entre ovejas era similar para el nitrógeno y para la digestibilidad. Los valores para el nitrógeno fueron

de  $\pm 6,0$  y para la digestibilidad  $\pm 1,5$  unidades. Las ovejas seleccionaron individualmente entre ellas, en forma consistente, dietas diferentes durante períodos cortos. Esta variación, se muestra en forma detallada para un grupo grande de animales en la Figura 14 (5).

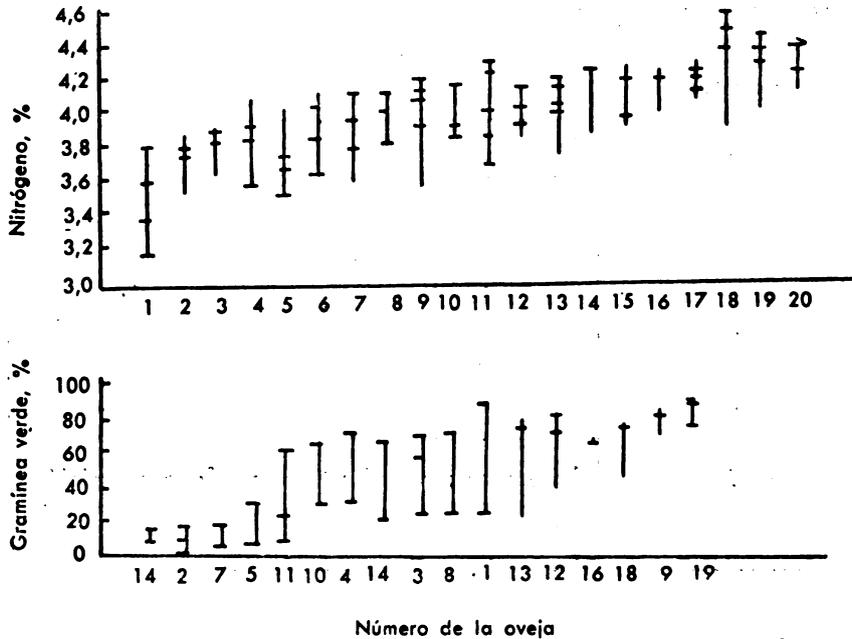


FIGURA N° 14. — Variación en la dieta seleccionada por ovinos

Un grupo de ovejas con fistulas en el esófago pastoreó un pradera la cual se esperaba que produciría una gran variación en la composición de la dieta entre animales. La pradera rindió 2800 kg/há. de materia seca, estando formada principalmente de gramíneas y trébol secos, pero conteniendo además, una pequeña cantidad de gramíneas verdes. La disponibilidad de forraje varió poco durante los siete días de la prueba, porque se mantuvo una carga animal baja. Se obtuvieron muestras de la dieta consumida hasta cinco veces durante el período de siete días.

Las líneas horizontales representan el porcentaje de Nitrógeno y gramínea verde en cada muestra. Las líneas verticales indican el rango de los valores en cada oveja, numeradas de 1 a 20. Las ovejas se arreglaron en la figura en orden ascendente de acuerdo a su porcentaje promedio de nitrógeno y gramínea verde.

Sin embargo, Leigh y Mulham (44), en sus experimentos con plantas de comunidad semi-árida, compuesta por muchas especies, encontraron variaciones grandes entre ovejas y días en la composición

botánica de la dieta. No encontraron ninguna tendencia diaria consistente en la selección de la dieta de una oveja, en períodos cortos.

En períodos largos de tiempo (meses o años) se encuentran todavía diferencias en la composición de la dieta entre animales (vacunos u ovinos), (61 y Arnold, resultados no publicados). Las diferencias están enmascaradas, por la contaminación con el suelo o con la saliva y se presentan solamente, cuando la composición de la dieta se expresa en términos de materia orgánica (61).

La gran variación entre animales en los constituyentes de la dieta, nos refiere a la determinación del número de animales, que se requieren para demostrar diferencias significativas entre tratamientos y también sobre el tamaño mínimo de las diferencias que pueden ser demostradas. El número varía con el constituyente de la dieta en estudio. Este problema ha sido estudiado por Arnold y colaboradores y Van Dyne y Heady (16, 61, 62).

(C) El efecto de la edad, sexo, raza, especie y condición fisiológica del animal, sobre la composición de la dieta seleccionada.

Ball y colaboradores (19), no encontraron diferencias significativas en la composición botánica o el contenido de nitrógeno, carbohidratos solubles, fibra normal ácida o digestibilidad de la dieta seleccionada por ovejas Border Leicester Merino preñadas o lactantes, que pastoreaban una pradera de *Phalaris tuberosa* y *Trifolium subterraneum*, bajo condiciones variables de carga animal.

Arnold (resultados no publicados), encontró solamente pequeñas diferencias, en la dieta seleccionada por vacas con fístulas en el esófago, lactando y secas, bajo diferentes condiciones de pasturas (véase el Cuadro 18). No hubo diferencia en la dieta consumida por vacas preñadas o secas. La dieta de las vacas lactando, tenía 5 % menos de nitrógeno y 7 % más de carbohidratos solubles que la de vacas secas. La digestibilidad de las dietas fue similar.

Arnold y Pahl (14), encontraron solamente pequeñas diferencias en los constituyentes de las dietas, cuando examinaron el efecto de la edad, sexo y raza en la selección de la dieta. Ovinos jóvenes (hasta la edad de seis meses) seleccionaron dietas de mayor contenido de nitrógeno y mayor digestibilidad y con un contenido menor de fibra, que la dieta seleccionada por ovejas mayores. No encontraron diferencias entre cruces de Border Leicester x Merino y Merino puro, o entre ovejas y capones. Estos experimentos se realizaron sobre una variedad bastante amplia de condiciones de pasturas. Es importante llamar la atención al hecho de que, para estos estudios, se emplearon animales con historias similares y criados desde su nacimiento en pasturas de tipo similar. El efecto de la edad radica en el grado de experiencia o en diferencias básicas en los hábitos de selección, que son debidos al estado nutritivo de

los animales. En ganado vacuno (Arnold, resultados no publicados) solamente se encontraron pequeñas diferencias después de los seis meses de edad.

**CUADRO N° 18.** Efecto de la lactancia sobre la dieta seleccionada por vacunos en pastoreo, (Arnold, resultados no publicados).

	Composición porcentual de la materia orgánica			
	Nitrógeno	Carbohidratos solubles	Fibra-ácido normal	Digestibilidad
Vacas secas . . . . .	2,62	6,78	46,7	68,5
Vacas lactando . . .	2,48	7,25	47,7	69,2
Lactando relativas a secas . . . . .	95	107	102	101

Los resultados discutidos hasta ahora, sugieren que no es necesario tener animales fistulados de la misma edad, sexo o raza, o de las mismas condiciones fisiológicas que los animales no fistulados. Se debe cuidar que no hayan animales adultos en un grupo y menores de 6 meses en otro. Asimismo, no se puede usar ovinos para determinar la composición de la dieta de vacunos y viceversa.

**(D) Experiencia previa del animal en pastoreo**

La selectividad puede ser alterada considerablemente por la experiencia previa de los animales (5, 3). Recientemente Langlands (38), encontró que la experiencia previa inmediata, en ovejas fistuladas, puede influir en el tipo de dieta seleccionada. Este investigador, trasladó por tres meses, ovejas a una pradera natural y después las regresó a la pradera cultivada original. El contenido de nitrógeno de la dieta de ovejas que venían de la pradera natural fue de 3,80 % y en las ovejas que habían permanecido en la pradera original fue de 3,33 %. En un segundo experimento, las ovejas que fueron transferidas de una pradera de ryegrass y trébol a una de Phalaris y trébol consumieron forrajes con una digestibilidad de 70,8 %, el cual contenía 3,44 % de nitrógeno, en tanto que el material consumido por el grupo control fue de 71,5 %

de digestibilidad que contenía 3,63 % de nitrógeno. Un error adicional puede producirse si es que las ovejas son ayunadas antes del muestreo (16). Los errores que se producen son pequeños pero de todas maneras deben evitarse (Cuadro 19).

CUADRO N° 19. Comparación de dietas seleccionadas por ovejas ayunadas y no ayunadas (16).

Constituyente	Pastoreo normal	Ayuno de una noche
Contenido de trébol seco, %	55,8 ± 5,0+	72,1 ± 5,0+
Contenido de nitrógeno, %	3,76 ± 0,08	3,68 ± 0,08
Contenido de fibra ácido-normal, % .....	43,6 ± 0,5	45,4 ± 0,5
Contenido de carbohidratos solubles, % .....	5,9 ± 0,3	3,5 ± 0,3*

\*P < 0,05 + desviación standard.

(E) Resumen sobre los errores de muestreo debidos a los animales

Cuando se usan animales fistulados, es necesario asegurarse que las muestras recogidas sean representativas de la dieta. Si los resultados obtenidos con ovejas fistuladas van a aplicarse a animales no fistulados, que están pastoreando conjuntamente con ellos, es esencial que las dietas sean similares. Esto se consigue asegurándose que los animales no son ayunados antes del pastoreo, que tienen la misma historia previa con respecto a su experiencia en el pastoreo y que las comparaciones no se realizan entre animales muy jóvenes y adultos. Se puede evitar la variación diurna en la dieta seleccionada muestreando por un cierto número de días, durante el período experimental.

(3) Recolección y preparación de las muestras

(A) Pérdidas durante la recolección y preparación

También se pueden cometer errores en la recolección y preparación de las muestras. Pueden haber pérdidas importantes en las fracciones solubles de la dieta, durante la colección y la pre-

paración (38, 18). La contaminación por medio de la saliva, elevará el contenido de algunos constituyentes químicos. Sin embargo, si se permite que la saliva drene libremente de la muestra, a medida que se va recogiendo, llevará consigo cierta cantidad de constituyentes solubles del forraje. Esto puede suceder particularmente en praderas jóvenes y muy verdes, en las cuales, las pérdidas de constituyentes solubles pueden ser elevadas.

Se pueden producir además otras pérdidas y cambios en ciertos constituyentes durante el secado de las muestras. En el Cuadro 20, se presentan las pérdidas que pueden ocurrir, en el contenido

CUADRO N° 20. Contenido de carbohidratos solubles en agua, en el bolo esofágico y la pradera, (18).

Tratamiento	Fresco	Seco al	Seco al	Seco en	Seco en	Pérdida durante colección
		aire, 3 h. 80°C	aire, 24 h. 80°C	estufa 3 h. 100°C	estufa 24 h. 100°C	
<b>Bolo esofágico</b>						
		%				
Falaris	12,07	10,37	10,17	8,62	8,40	10,5
Festuca	13,00	13,93	13,80	13,06	12,70	10,9
Trébol blanco	14,33	11,97	11,78	10,42	10,17	16,4
Promedio	13,10	12,09	11,91	10,70	10,42	12,6
Relativo	87,6	80,7	79,5	71,4	69,5	
<b>Pradera</b>						
Agropyron	10,8	11,8				
Falaris	10,6	10,5				
Ryegrass	12,0	11,4				
Festuca	12,8	15,4				
Trébol blanco	10,9	7,7				
Promedio	11,42	11,36				
Relativo	100	99,5				

de carbohidratos solubles de la dieta obtenida por ovejas con fistulas del esófago, pastoreando forrajes en estado tierno y verde. Del 10 al 16 % de los carbohidratos solubles se perdieron antes del procesamiento. En adición a esto, se produjo una pérdida del 6 % cuando las muestras fueron secadas, en lugar de ser preservadas en alcohol hirviendo. Este no es el caso con muestras de forraje cortado. Sin embargo, la técnica del alcohol hirviendo no ha

sido siempre exitosa, muchas veces se han obtenido valores mucho menores que con el método del secado. El secado con calor, produce una pérdida adicional del 10 % de los carbohidratos.

Langlands (37) encontró que en una gama bastante amplia de alimentos, si la parte sólida y líquida de la fracción recogida por la fistula, se analizaba para su digestibilidad *in vitro*, el valor promedio era alrededor de 1,6 unidades superior que el forraje con-

**CUADRO N° 21 Cambios en la composición química del forraje durante la colección con fistula del esófago.**

Referencia	Resultado
65	Contenido de ceniza aumentó 24 % con aumento de 5 % en Ca y 230 % en P.
45	La ceniza y energía aumentaron. El N no cambió.
16	Contenido de N y fibra no cambió.
18	Se pueden producir pérdidas grandes de carbohidratos solubles, lo cual debe aumentar el contenido de otros constituyentes en base a porcentajes.
28	Recobro de carbohidratos solubles bajo si se descarta la fracción líquida.
12	Poca diferencia en el N y Ca; aumento en la ceniza, Na y K; resultados sobre Vit. D variables, dependiendo del método de colección empleado.
46	No hubo diferencia en la proteína cruda, extracto etéreo, y fibra o Ca; aumento significativo en ceniza, P y extracto no nitrogenado.

sumido por las ovejas. Si no se tomaba en cuenta la fracción líquida, la digestibilidad era 3,3 unidades más baja.

Las pérdidas en el contenido del nitrógeno son pequeñas, o se balancean, por la adición del nitrógeno de la saliva.

B) Composición de las muestras del esófago comparadas con la composición del forraje consumido.

La composición botánica del material recogido en la fístula no debería ser diferente (48). Sin embargo, si la fístula es muy pequeña, las partículas grandes no pueden salir fácilmente.

El Cuadro 21 enseña los resultados obtenidos por varios autores, sobre los cambios en la composición química producidos durante la colección. Los métodos empleados en la colección y preparación no fueron indicados en todos los artículos incluidos, de manera que las diferencias entre autores, pueden ser debidas a los métodos empleados. Sin embargo, se observa que en general la contaminación por la saliva, aumenta el contenido de cenizas y particularmente el contenido de fosfato, sodio y potasio. El nivel de calcio no cambia. El nivel de nitrógeno, extracto etéreo y fibra cruda permanece sin cambio, pero, el contenido de energía y de extracto libre de nitrógeno generalmente aumenta.

#### LITERATURA CITADA

1. ARNOLD, G. W. The effect of the quantity and quality of pasture available to sheep on their grazing behaviour. *Australian Journal of Agricultural Research* 11 (6): 1034-1043. 1960.
2. ARNOLD, G. W. The influence of several factors in determining the grazing behaviour of Border Leicester x Merino sheep. *Journal of the British Grassland Society* 17 (1): 41-51. 1962.
3. ARNOLD, G. W. The diet of the grazing sheep. Factors affecting both the quantity and quality of herbage eaten by grazing sheep. Ph. D. Thesis, University of London. 1963.
4. ARNOLD, G. W. Factors within plant associations affecting the behaviour and performance of grazing animals. *Grazing in Terrestrial and Marine Environments*. pp. 133-154. 1964.
5. ARNOLD, G. W. Some principles in the investigation of selective grazing. *Proceedings of Australian Society of Animal Production* 5: 258-271. 1964.
6. ARNOLD, G. W. Responses of lambs to differing pasture conditions. *Proceedings of Australian Society of Animal Production* 5: 275-279. 1964.
7. ARNOLD, G. W. The grazing behaviour of sheep. *Wool Technology and Sheep Breeding* 10 (1): 17-19. 1964.
8. ARNOLD, G. W. The special senses in grazing animals. I. Sight and dietary habits in sheep. *Australian Journal of Agricultural Research*. 17: 521-529. 1966.
9. ARNOLD, G. W. The special senses in grazing animals. II. Smell, taste, and touch and dietary habits in sheep. *Australian Journal of Agricultural Research* 17: 531-542. 1966.
10. ARNOLD, G. W. y M. L. DUDZINSKI. The use of faecal nitrogen as an index for estimating consumption of herbage by grazing animals. *Journal of Agricultural Science* 61: 33-43. 1963.
11. ARNOLD, G. W. y M. L. DUDZINSKI. The behavioural responses controlling food intake of grazing sheep. X International Grassland Congress, Helsinki, Finland. 1966.

12. ARNOLD, G. W. y M. L. DUDZINSKI. Comparison of faecal nitrogen regressions and in vitro estimates of diet digestibility for estimating the consumption of herbage by grazing animals. *Journal of Agricultural Science* (In press). 1967.
13. ARNOLD, G. W. y M. L. DUDZINSKI. Studies on the diet of the grazing animal. II. The effect of physiological condition in ewes and pasture availability on herbage intake. *Australian Journal of Agricultural Research*. (In press). 1967.
14. ARNOLD, G. W. y P. J. PAHL. Studies on the diet of the grazing animal. VI. The effect of age and breed on diet selection. *Australian Journal of Agricultural Research*. (In press). 1967.
15. ARNOLD, G. W. et al. Studies in the wool production of grazing sheep. 1. Seasonal variation in feed intake, liveweight and wool production. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry*. 4: 392-403. 1964.
16. ARNOLD, G. W. et al. The use of sheep fitted with oesophageal fistulas to measure diet quality. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry* 4: 71-79. 1964.
17. ARNOLD, G. W. et al. Studies in the wool production of grazing sheep. 3. Changes in efficiency of production. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry*. 5: 396-403. 1965.
18. ARNOLD, G. W. et al. Studies on the diet of the grazing animal. I. Seasonal changes in the diet of sheep grazing on pastures of different availability and composition. *Australian Journal of Agricultural Research* 17: 543-556. 1966.
19. BALL, JUDITH et al. Studies on the diet of the grazing animal. V. The effect of physiological condition on diet quality. *Australian Journal of Agricultural Research*. (In press). 1967.
20. CHRISTIAN, K. R. et al. The estimation of faeces output of stall-fed sheep using chromic oxide marker. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 8 (3): 530-541. 1965.
21. CLANTON, D. C. Variation in chromic oxide methods of determining digestibility of hand-fed beef cattle rations. *Journal of Animal Science* 21 (2): 214-218. 1962.
22. COOK, C. W. y L. E. HARRIS. The nutritive content of the grazing sheep's diet on summer and winter ranges in Utah. *Utah Agricultural Experiment Station, Bulletin* 342. 1950.
23. COOK, C. W. y L. E. HARRIS. A comparison of the lignin ratio technique and chromogen method of determining digestibility and forage consumption of inert range plants by sheep. *Journal of Animal Science* 10: 565. 1951.
24. CRAMPTON, E. W. et al. A nutritive value index for forages. *Journal of Animal Science* 19 (2): 538-544. 1960.
25. ELLIOTT, R. C. and K. FOKKEMA. The use of chromic oxide for the estimation of faecal output in grazing ruminants. *Rhodesia Agricultural Journal* 57 (6): 439-444. 1960.
26. GREENHALGH, J. F. D. y J. L. CORBETT. The indirect estimation of the digestibility of pasture herbage. I. Nitrogen and chromogen as faecal index substance. *Journal of Agricultural Science* 55: 371-376. 1960.
27. GREENHALGH, J. F. D. et al. The indirect estimation of the digestibility of pasture herbage. II. Regressions of digestibility on faecal nitrogen concentration; their determination in continuous digestibility trials and the effect of various factors on their accuracy. *Journal of Agricultural Science* 55: 377-386. 1960.
28. GRIMES, R. C. et al. The botanical and chemical analysis of herbage samples obtained from sheep fitted with oesophageal fistulae. *Journal of the British Grassland Society* 20 (3): 168-173. 1965.

29. HARDISON, W. A. et al. Observations on the use of chromic oxide for estimating the faecal output of dairy animals. *Journal of Dairy Science* 42 (2): 346-352. 1959.
30. HUTCHINSON, K. J. Factors governing faecal nitrogen wastage in sheep. *Australian Journal of Agricultural Research*, 9 (4): 508-520. 1958.
31. JONES, L. H. P. and K. A. HANDRECK. The relation between the silica content of the diet and the excretion of silica by sheep. *Agricultural Science* 65: 129-134. 1965.
32. KENNEDY, W. K. et al. Comparison of faecal pigments and faecal nitrogen as digestibility indicators in grazing cattle studies. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 2 (3): 627-638.
33. KOTHMANN, M. M. Nutrient content of forage ingested in the morning compared to evening. *Journal of Range Management* 19: 95-96. 1966.
34. LAMBOURNE, L. J. Measurement of feed intake of grazing sheep. II. The estimation of faeces output using markers. *Journal of Agricultural Science* 48 (4): 415-425. 1957.
35. LAMBOURNE, L. J. y T. F. REARDON. The use of chromium oxide to estimate the faecal output of Merinos. *Australian Journal of Agricultural Research* 14 (2): 239-256. 1963.
36. LAMBOURNE, L. J. y T. F. REARDON. The use of chromium oxide and faecal nitrogen concentration to estimate the pasture intake of Merino wethers. *Australian Journal of Agricultural Research* 14 (2): 257-271. 1963.
37. LANGLANDS, J. P. Studies on the nutritive value of the diet selected by grazing sheep. I. Differences in composition between herbage consumed and material collected from oesophageal fistulae. *Animal Production* 8: 253-259. 1966.
38. LANGLADS, J. P. Studies on the Nutritive Value of the diet selected by grazing sheep. 2. Some sources of error when sampling oesophageally fistulated sheep at pasture. *Animal Production* (In press). 1967.
39. LANGLANDS, J. P. Studies on the nutritive value of the diet selected by grazing sheep. 3. A comparison of oesophageal fistule and faecal index techniques for the indirect estimation of digestibility. CSIRO, Pastoral Research Laboratory, Armidale, N.S.W. pp. 1-15.
40. LANGLANDS, J. P. y J. L. CORBETT. A study of the 'dissolved faeces fraction' method for the indirect estimation of herbage intake. *Journal of Agricultural Science* 63: 305-310. 1964.
41. LANGLADS, J. P. et al. Estimation of the faeces output of grazing animals from the concentration of chromium sesquioxide in a sample of faeces. I. Comparison of estimates from sample taken at fixed times of day with faeces outputs measured directly. *British Journal of Nutrition* 17: 211-218. 1963.
42. LANGLANDS, J. P. et al. Estimation of the faeces output of grazing animals from the concentration of chromium sesquioxide in a sample of faeces. 2. Comparison of estimates from samples taken at fixed times of day with estimates from samples collected from the sward. *British Journal of Nutrition* 17: 219-226. 1963.
43. LANGLANDS, J. P. et al. The indirect estimation of the digestibility of pasture herbage. III. Regressions of digestibility on faecal nitrogen concentration: effects of species and individuality of animal and of the method of determining digestibility upon the relationships. *Journal of Agricultural Science* 61: 221-226. 1963.
44. LEIGH, J. H. y W. E. MULHAM. Selection of diet by sheep grazing semi arid pastures of the riverine plain. I A bladder saltbush (*Atriplex vesicaria* Hew. Ex Benth). - Cotton Bush (*Kochia Aphyllia* R. Br.) Community. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry*. 6:460-467. 1966.
45. LESPERANCE, A. L. et al. Measuring selective grazing with fistulated steers. *Journal of Dairy Science*. 43 (11): 1615-1622. 1960.

46. LOMBARD, P. E. y A. VAN SCHALKWYK. Veranderinge in samestelling van voere tydens monsterneming met behulp van 'n slukdermfistel. S. Afr. Tydskr. Landbouwet. 6: 205-212. 1963.
47. McMANUS, W. R. An effect on the relationship between pH and volatile fatty acid and diversion of saliva from the actively fermenting rumen of sheep. *Nature* 184: 1572-1573. 1959.
48. McMANUS, W. R. Properties of roughage feedstuffs collected from oesophageal fistulas. *Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry* 1: 159-163. 1961.
49. McMANUS, W. R. et al. Prediction of herbage intake from nitrogen, copper, magnesium and silicon concentration in faeces. *Journal of Agricultural Science* (In press). 1967.
50. MINSON, D. J. et al. A method for identifying the faeces produced by individual cattle or groups of cattle grazing together. *Journal of the British Grassland Society* 15 (1): 86-88. 1966.
51. NOTTLE, M. C. Silica metabolism of the Merino sheep. *Australian Journal of Agricultural Research* 17: 175-182. 1966.
52. OWEN, J. B. A new method of estimating the dry-matter intake of grazing sheep from their faecal output. *Nature* 192 (4797): 92. 1961.
53. RAYMOND, W. F. y D. J. MINSON. The use of chromic oxide for estimating the faecal production of grazing animals. *Journal of the British Grassland Society* 10 (4): 282-296. 1955.
54. RAYMOND, W. F., et al. Studies in the digestibility of herbage. IV. The use of faecal collection and chemical analysis in pasture studies (b) Faecal index methods. *Journal of the British Grassland Society* 9 (1): 69-82. 1954.
55. REID, J. T. El Valor Relativo de los Resultados Agronómicos y con Animales en Investigaciones Sobre Pasturas. En Empleo de Animales en las Investigaciones sobre Pasturas. Simposio Estanzuela, pág. 31-60. 1964.
56. TAYLER, J. P. y R. E. DERIAZ. The use of rumen-fistulated steers in the direct determination of nutritive value of ingested herbage in grazing experiments. *Journal of the British Grassland Society*. 18 (1): 29. 1963.
57. TILLEY, J. M. A. y R. A. TERRY. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *Journal of the British Grassland Society* 18: 104-111. 1963.
58. TORELL, D. T. An oesophageal fistula for animal nutrition studies. *Journal of Animal Science* 13 (4): 878-884. 1954.
59. TROELSEN, J. E. Preliminary observations in the use of a sustained release pellet for administration of chromic oxide to sheep in digestibility studies. *Canadian Journal of Animal Science* 41: 71-77. 1961.
60. TROELSEN, J. E. Plant chromogens as an indicator in estimating the digestibility of forage crops by sheep. *Canadian Journal of Plant Science* 41: 732-739. 1961.
61. VAN DYNE, G. M. y H. M. HEADY. Dietary Chemical composition of cattle and sheep grazing in common on a dry annual range. *Journal of Range Management* 18 (2): 1965.
62. VAN DYNE, G. M. y H. F. HEADY. Botanical composition of sheep and cattle diets on a mature annual range. *Hilgardia* 36 (13): 465-492. 1965.
63. VAN DYNE, G. M. y D. T. TORELL. Development and use of the oesophageal fistula; A review. *Journal of Range Management* 17 (1): 7-19 1964.
64. VAN SOEST, P. J. Symposium on factors influencing the voluntary intake of herbage by ruminants: Voluntary intake in relation to chemical composition and digestibility. *Journal of Animal Science* 24 (3): 834-843. 1965.
65. WEIR, W. F. et al. Symposium on forage evaluation: VI. The use of the oesophageal fistula, lignin, and chromogen techniques for studying selective grazing and digestibility of range and pasture by sheep and cattle. *Agronomy Journal* 51: 235-237. 1959.

## APENDICE

Preparado por C. A. P. Boundy, División de Matemática Estadística, CSIRO, Perth Laboratorios, W. A.

Se sometieron a un análisis de componentes de la variancia los resultados experimentales obtenidos con ovinos y vacunos fistulados. El cuadro siguiente, presenta los coeficientes de variación de los componentes de la dieta. Los resultados para ovinos están basados en 131 grados de libertad. Los resultados para ganado vacuno en 110 grados de libertad.

<i>Componente de la dieta</i>	<i>Ovinos</i>	<i>Vacunos</i>
Nitrógeno .....	8,5	8,8
Carbohidratos solubles ...	21,4	22,5
Fibra ácido-normal .....	4,9	5,1
Fibra ácido-normal .....	4,9	5,1
Digestibilidad .....	5,2	4,0
Porcentaje de gramíneas .. (cuando la dieta contiene menos del 70 % de gramíneas).	11,3	12,6

El segundo cuadro, indica el número de animales necesarios para demostrar diferencias del 25 %, 50 % y 75 % en los componentes de la dieta, entre dos tratamientos, con significancia al nivel del 5 % de probabilidad. Comparaciones que envuelven más de dos tratamientos, requerirán un número diferente de animales, pero éstos no han sido todavía calculados.

**Número de repeticiones necesarias para una probabilidad 0,90 de obtener un resultado significativo al nivel de 0,05**

Componente de la dieta	Vacunos			Ovinos		
	Diferencia como proporción de la media					
	0,25	0,50	0,75	0,25	0,50	0,75
<b>Carbohidratos solubles</b>	35	10	5	30	9	5
<b>Fibra normal-ácida</b>	4	3	2	3	3	2
<b>Nitrógeno</b>	7	3	3	6	3	3
<b>Digestibilidad</b>	3	2	2	4	2	2

## DISCUSION DEL TRABAJO PRESENTADO POR EL DR. G. W. ARNOLD

Encargado de abrir la discusión fue el Sr. DEREK T. CHAMBERS,  
FAO — Fondo Especial de las Naciones Unidas Proyecto 121,  
La Estanzuela, Uruguay

### D. T. CHAMBERS:

Quiero agradecer al Dr. Arnold, por su interesante presentación, en la cual introduce, para nuestra discusión, el empleo de las fistulas del esófago.

La primera parte del artículo del Dr. Arnold ha sido muy útil en el sentido de que ha hecho resaltar un hecho que puede habérsenos olvidado o el cual hayamos querido ignorar. Este hecho es que con las técnicas disponibles actualmente, no podemos medir diferencias menores del 25 % en el consumo de los animales bajo pastoreo. Debemos aceptar, que con tan baja precisión, vale la pena detenerse a considerar si la medición del consumo es esencial. Debemos asimismo recordar que realizar esas medidas, requiere mucho tiempo y energía.

Hay algunos problemas, sin embargo, que demandan la medida de consumo de los animales en pastoreo. En esos casos, se puede recoger muestras por medio de fistulas del esófago y determinar la digestibilidad *in vitro*, obteniéndose una estimación más ajustada de la digestibilidad que con los índices fecales. Los resultados presentados por el Dr. Arnold, no demuestran la mejora que yo hubiera esperado, en la precisión.

Quisiera hacer un pequeño comentario sobre el ayuno de los animales fistulados, antes de la colección. Parecería que un cierto grado de ayuno o interferencia en el consumo, es necesario. El animal se perturba cuando se le saca la cánula y se le coloca la bolsa de recolección, de manera que es posible que no pastoree, durante el período de estudio, a menos que sienta hambre.

Finalmente, me gustaría recibir los comentarios del Dr. Arnold, sobre los errores que se pueden cometer por contaminación de las muestras con los líquidos regurgitados del rumen.

### G. W. ARNOLD:

Los animales bien entrenados, no detienen el pastoreo cuando se sacan los tapones de las fistulas del esófago y se colocan las bolsas de

recolección. Para evitar la suspensión del pastoreo o la rumia, las recolecciones se deben realizar a las horas en que, el hato o el rebaño tiene su actividad de pastoreo más intensa. Al encerrar los animales por dos o tres horas antes del pastoreo, seguramente no se afectará la selectividad en el consumo, pero se puede cambiar el lugar, dentro de la parcela, en que el animal estaba pastoreando.

L. VERDE:

¿Cuáles son los constituyentes químicos de los forrajes que producen selectividad en los animales?

G. W. ARNOLD:

La selectividad del animal, sobre el lugar en el cual realiza el pastoreo y de las especies o partes de las plantas que prefiere, está determinado principalmente por algunos sentidos. Existe una variedad amplia de constituyentes químicos de las plantas, que producen estímulos favorables o desfavorables para los sentidos del gusto y del olfato. Para cada constituyente, la respuesta dependerá de su concentración alrededor de la planta o dentro de la planta, si el sentido es el gusto.

Nuestros estudios están todavía en una primera etapa, pero hemos demostrado ya que pequeñas cantidades de ácidos orgánicos, ácidos aminados, compuestos fenólicos y alcaloides, pueden influir en el consumo. Nuestros trabajos están dirigidos a proveer a los fitotecnistas con criterios de selección. En cada especie bien podría ser que las causas de variabilidad entre razas de plantas sea diferente. De manera que cuando se presenta al animal con una serie de especies para seleccionar, él tiene que balancear los estímulos favorables y desfavorables a los sentidos del tacto, gusto y olfato, en cada especie.

J. GOMIDE:

¿Qué métodos de análisis de los carbohidratos solubles y en qué forrajes se realizaron las observaciones del Cuadro 18?

G. W. ARNOLD:

Empleamos el método de Deriaz (Journal of Science of Food and Agriculture 12 (2): 152-60. 1961), para carbohidratos solubles. Los valores anotados en el Cuadro 18 son para animales que pastoreaban una mezcla de *Phalaris tuberosa* - *Tifolium subterraneum*. Los valores son aproximadamente promedios para este tipo de praderas. El material pastoreado, es desde luego más bajo en carbohidratos solubles que el pasto total (véase referencia 18).

**J. LOPEZ:**

¿Cuál es el mecanismo biológico que forma la base del método del nitrógeno fecal?

**G. W. ARNOLD:**

No se conoce una base bioquímica sólida para explicar las relaciones entre el nitrógeno fecal y la digestibilidad. En proporción elevada, el nitrógeno fecal es de origen endógeno, y por tanto sería una función del nivel de consumo.

**M. ROJAS:**

¿Cree el Dr. Arnold de utilidad el empleo de la técnica del nitrógeno fecal para predecir la digestibilidad de la energía?

**G. W. ARNOLD:**

El método del nitrógeno fecal es útil en estudios de praderas mejoradas. Se requiere mucho trabajo para derivar las ecuaciones de regresión. Cuando no se dispone de estas ecuaciones, o cuando no se pueden calcular, la mejor posibilidad es determinar la digestibilidad *in vitro* del forraje, recogido con ovejas provistas de fístulas del esófago. Cuando se pueden emplear los dos métodos, su combinación da mejores resultados.

**O. L. PALADINES:**

¿No esperaría el Dr. Arnold cometer un error de estimación, al asumir que la dieta recogida por la fístula del esófago, corresponde a la dieta consumida por los animales no fistulados, en la misma medida que se podría cometer un error, al asumir que la dieta consumida pertenece al rango en que se derivaron las ecuaciones del índice fecal?

**G. W. ARNOLD:**

Hemos establecido que cuando el tamaño de las fístulas es adecuado, los vacunos y ovinos fistulados tienen la misma velocidad de crecimiento, producción de lana y pueden producir y criar sus progenies con el mismo éxito que los animales no fistulados. Los animales fistulados y no fistulados presentan la misma selectividad cuando se prueban en sistemas de cafetería. Por tanto, no se puede esperar ningún vicio en su uso como predictores del consumo de animales no fistulados.

**ESTABLECIMIENTO DE UN  
SISTEMA DE DIGESTIBILIDAD IN VITRO  
EN EL LABORATORIO**

**R. H. ALEXANDER  
Analitical Laboratory  
West of Scotland Agricultural College  
Auchincruive, Escocia**

101



## I. INTRODUCCION

### 1. Consideraciones Generales

El primer paso, en el establecimiento de una técnica de laboratorio debe ser un examen cuidadoso del trabajo a efectuarse. Algunos de los aspectos del trabajo que deben considerarse incluyen el número de muestras que deberán tratarse, la precisión requerida en el análisis y la naturaleza o tipo de material que va a analizar.

Una vez que se ha decidido en el método que se empleará, el próximo paso es realizar una revisión completa de la literatura y la selección de un procedimiento de análisis. Si el procedimiento, se demuestra promisorio cuando se lo prueba en comparación con otros, entonces se pueden introducir modificaciones que lo adapten a las necesidades específicas. Las modificaciones se deberán introducir solamente luego de asegurarse que los principios básicos en los cuales se basa el método original no han quedado invalidados. Una vez que el método ha adquirido su forma final, se debe medir el tamaño de los errores dentro de y entre corridas de las mismas muestras; y en los métodos que se emplean para predicciones, se debe comprobar también la precisión de la predicción.

### 2. Consideraciones Específicas

Los métodos *in vitro* que emplean licor del rumen, han sido más difíciles de establecer que los procedimientos convencionales.

Estos métodos envuelven conocimientos en las ciencias biológicas y químicas y por tanto la literatura, en una gama muy amplia de publicaciones, es dirigida a investigadores en muchos campos de acción. Así por ejemplo, la información publicada por Hungate (11) referente al manejo de licor del rumen en términos bacteriológicos, establece limitaciones de anaerobiosis muy difíciles de mantener cuando se emplea el licor del rumen, como un "reactivo" de laboratorio para un procedimiento rutinario *in vitro*.

Los métodos son generalmente demorados, limitados en el número de muestras por corrida y sujetos a errores relativamente grandes dentro de y entre corridas. Estos factores, interaccionan para volver

compleja la labor de investigación de los procedimientos analíticos, ya que, el elevado grado de error implica el empleo extenso de repeticiones, resultando en experimentos con números elevados de estimaciones. Así también, las posibles variaciones entre corridas hacen deseable el completar un experimento con una sola corrida, limitando el tamaño máximo de cada experimento.

Los métodos *in vitro* se emplean para predicción, teniendo por referencia valores *in vivo*, los cuales a su vez pueden tener errores. Por esta razón, Tilley y Terry (23), recomiendan que los resultados se comparen en términos de valores *in vitro*. Esta práctica, sin embargo, hace difícil la introducción de modificaciones, las cuales pueden alterar el plano de los resultados, complicando las comparaciones entre resultados en experimentos de larga duración.

Cuando se realizan incorrectamente muchas de las etapas del método, que envuelven el manejo de material biológico, tienen la característica de disminuir la digestibilidad. Estos factores son de naturaleza aditiva y no se compensan entre ellos, y por tanto producen errores elevados.

### 3. Objetivos de Proyecto

#### A) Selección de un parámetro de medida.

Hasta hace poco tiempo, para la evaluación de forrajes, se empleaban las relaciones de Watson y Horton (25), basadas en la proteína cruda, a pesar de que se sabía que los errores eran elevados (15).

En nuestro laboratorio, en el cual se debe cumplir con labores de asesoramiento e investigación, se creyó que la determinación de la digestibilidad de la materia orgánica *in vitro*, era el método más promisorio. Se reconoce que hay limitaciones en el empleo de la digestibilidad, como único parámetro para la evaluación de los alimentos. El valor nutritivo, cuando se mide con animales, dependerá además de la composición, naturaleza de los productos de digestión y del nivel de consumo (4). El factor más importante (aparte del consumo) en el valor de los alimentos, es la pérdida en las heces fecales (8, 16) y se creyó por eso que, simulando *in vitro* estas pérdidas, se podría obtener un método para la evaluación de forrajes verdes y conservados. Es muy importante el papel de la digestibilidad cuando se miden las pérdidas producidas por la conservación de forrajes. Los trabajos de Tilley y colaboradores (22), que demostraban una mejora notable sobre métodos más sencillos en las relaciones de digestibilidad medidas *in vitro*, estimuló el establecimiento de un método basado en sus conceptos.

## **B) Problema básico.**

Para que el trabajo de asesoría se beneficie con los procedimientos de investigación, ha sido la costumbre en nuestro laboratorio establecer sistemas de análisis con suficiente flexibilidad en el número de muestras, que permita acomodar en cada corrida un número variable de muestras para asesoría. Así, se estableció una capacidad de 100 a 120 muestras provenientes de proyectos de investigación y 25 a 35 muestras para asesoramiento a los productores. El número elevado, tiene la ventaja de que disminuye las pérdidas de espacio por inclusión de muestras standard, pero tiene la desventaja de que, aumenta la dificultad de mantener una operación continua. La continuidad, es evidentemente un factor esencial en un sistema de evaluación con propósitos de asesoría, en el cual debe disminuirse al máximo, el tiempo de espera.

El principal problema para aplicar un método de laboratorio es el número limitado de muestras que puede manejarse (9, 23). Por estas razones, se inició un proyecto dirigido a rediseñar el procedimiento *in vitro*.

## **C) Alcance de los trabajos realizados.**

Este artículo, informa sobre investigaciones realizadas para establecer un método *in vitro*, cuyo objetivo es la predicción de la digestibilidad de los forajes. Las metas de los trabajos realizados se resumen a continuación:

1. Expandir la capacidad del sistema a 300 muestras por semana.
2. Diseñar un método capaz de operar en forma continua, con ese número de muestras.
3. Diseñar y probar en operación, equipo especializado, pero relativamente simple que tendría por objeto reducir el tedio de las operaciones del análisis y reducir también la magnitud de los errores.
4. Estudiar los factores que influyen la estabilidad y la precisión y cuantificar el grado de control requerido.
5. Demostrar que las modificaciones introducidas, no invalidan los conceptos básicos del método original.
6. Estudiar algunas simplificaciones posibles del procedimiento, una vez conocido su efecto sobre la precisión de las observaciones; y,
7. Examinar en forma crítica, todos los conceptos de precisión del producto final obtenido.

## II. METODO

### 1. Descripción

El procedimiento que se describe, fue desarrollado a base del procedimiento propuesto por Tilley y colaboradores (22). Detalles de las modificaciones han sido publicadas anteriormente (1, 2, 3). Los pasos contenidos en el método se diagraman en la Figura 15.

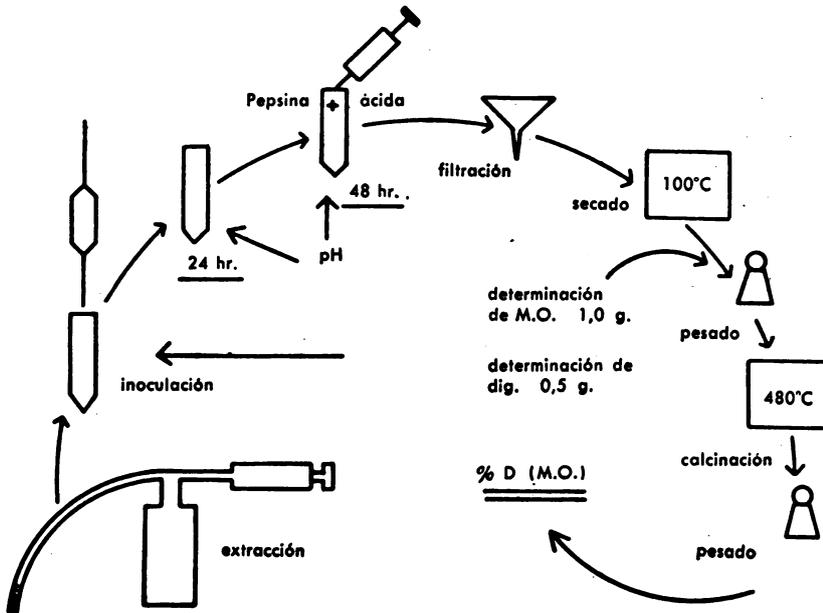


FIGURA N° 15. — Descripción del método

Se extrae un litro de licor del rumen, de cada uno de tres ovinos. Después de filtrarlo a través de muselina y saturarlo con  $\text{CO}_2$ , el licor del rumen se suspende (1 + 4) en buffer de McDougall (13). Se agrega luego 1 ml de una solución molar de sulfato de amonio por cada 50 ml de la mezcla de licor del rumen y buffer (12). La inoculación se realiza agregando 50 ml de la mezcla a cada tubo. Los tubos se gasean superficialmente con  $\text{CO}_2$ , se tapan con tapones provistos de válvulas Bunsen y se colocan en un baño de maría a  $38,5^\circ\text{C}$ . El medio de digestión se ajusta a pH 6,9, a las 24 horas, por medios electromé-

tricos y la fase de incubación con licor del rumen termina a las 48 horas, agregando HCl (20 % v/v). Después de ajustar electromé- tricamente el pH a 1,2, se agrega a cada tubo una solución acuosa de pepsina (0,12 g en 5 ml). Después de 48 horas de digestión en pepsina, los residuos se recobran por filtración a través de papel filtro de fibra de vidrio, en presencia de un auxiliar de filtración inerte (hyflo supercel), empleando para el propósito, equipo de diseño especial. Los residuos se secan a 100°C, se pesan, se calcinan a 480°C y se pesan nuevamente. La determinación paralela de la materia orgánica de la muestra, permite calcular el coeficiente de digestibilidad de la ma- teria orgánica, tomando en consideración el residuo orgánico de los tubos de control.

## 2. Detalles del Método

### A) Fuente de inóculo.

#### a) Extracción y preparación.

El licor del rumen se extrae por medio de un equipo portátil con- veniente (Figura 16) (2). Para evacuar el frasco (F) se emplea la jeringa (S) con su válvula (V); el licor del rumen atraviesa el tubo (A) hasta llegar al frasco. Durante esta operación, se mantiene cerrado el tubo (B). Cuando se producen bloqueos en el equipo, se abre el tubo (B), permitiendo la pérdida del vacío, y ayudando a liberar el material. Cada litro de licor del rumen se extrae en un frasco termo en 3 a 4 minutos. Empleando dos de esos extractores, se mantienen la demora entre extracción y comienzo del trabajo en el laboratorio, en menos de 15 minutos. Los frascos termo, son llenados completamente con licor del rumen y tan pronto se llega al labora- torio, se filtra el contenido a través de muselina. Se emplea licor fil- trado, para permitir una operación más sencilla en la preparación del inóculo y porque los resultados de otros investigadores, quienes han realizado comparaciones detalladas, demuestran que no hay diferencia entre el licor filtrado y otros métodos más complejos de preparar el inóculo (14, 23).

Luego de filtrado, el licor del rumen es saturado con CO<sub>2</sub> y añadido al buffer que ha sido previamente saturado con CO<sub>2</sub> y ajus- tado a pH 6,9. Luego de agregado el suplemento nitrogenado, se espe- ran 10 minutos para permitir standarización del tiempo.

Tilley y Terry (23) mencionan que es inevitable algún enfria- miento del licor, pero que se puede mantener la temperatura calen- tando el material de vidrio anticipadamente. Donefer y colaborado- res (10) calientan la solución buffer a 45°C, para compensar la dismi- nución de temperatura que se produce en la preparación del inóculo. Experimentos realizados en nuestro laboratorio, demuestran que el

tiempo de demora entre extracción e inoculación tiene más efecto sobre la actividad, que la temperatura. Así, una demora de una hora, con el licor y el buffer mantenidos separadamente a 38,5°C, los dos, dió resultados significativamente menores ( $P < 0,01$ ) que los obteni-

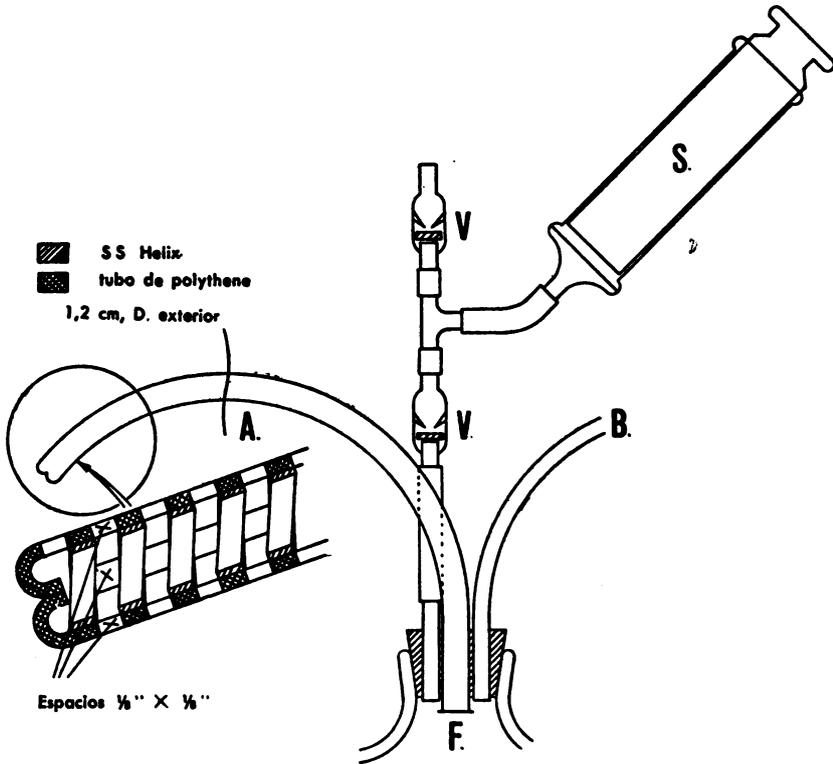
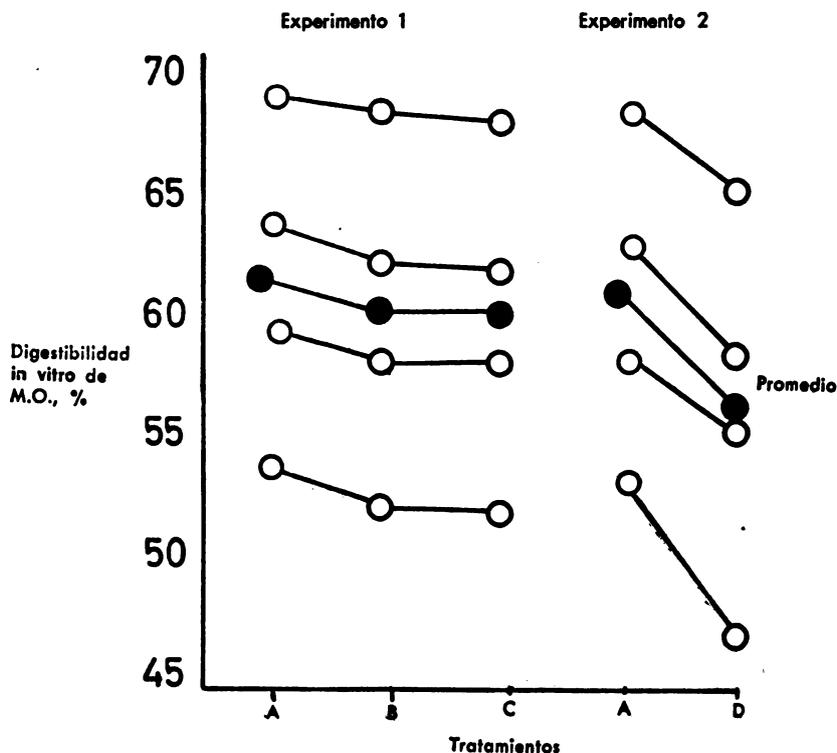


FIGURA N° 16. — Equipo para la extracción

dos en la práctica normal del laboratorio. El mismo tratamiento del licor del rumen, sin mantener la temperatura, dió también resultados significativamente diferentes ( $P < 0,01$ ) que los obtenidos en la práctica normal. La diferencia debida a la temperatura, sin embargo, no fue significativa (Figura 17).

El gaseado superficial en el lugar de extracción, es una práctica inconveniente y por esa razón se toma la precaución de llenar completamente el frasco en el cual se realiza la extracción del licor del rumen. Experimentos en los cuales se simuló el transporte, sacudiendo

por una hora un frasco insuficientemente lleno, tuvo un efecto significativo ( $P < 0,05$ ) en la actividad del licor del rumen (Figura 17). Hubo considerable variación entre muestras en su sensibilidad al tratamiento. La conclusión de estos experimentos es de que, es posible transportar el licor en un frasco lleno, pero que se deberá standardizar el tiempo.



A - Normal; B - 1 hr. de retraso a 38,5°C; C - 1 hr. de retraso, enfriado; D - Batido con aire por 1 hr. a 38,5°C.

FIGURA N° 17. — Digestibilidad in vitro de muestras incubadas con licor del rumen sometido a varios tratamientos.

#### b) Efecto de la dieta del animal donante.

Se encuentra un poco de confusión en la literatura, sobre el efecto de la dieta del animal en la actividad del licor del rumen. Quicke *et al.* (14) y Raymond y Terry (17), consideran que el efecto de la

dieta es pequeño, en tanto que Shelton y Reid (20), Baumgardt *et al.* (5) y Bezeau (7) concluyeron que era necesario un control rígido de la ración. Nuestro procedimiento reduce el efecto de la dieta, empleando heno de calidad media, picado en pedazos de 2,5 a 5,0 cm y mezclado en lotes de 1 a 2 toneladas.

c) Suplementación con Nitrógeno.

El efecto de la calidad de la ración se estudió, alimentando ovinos donantes a nivel constante de consumo, una ración diferente cada semana y analizando una serie de seis muestras con el licor del rumen producido como resultado del séptimo día de alimentación de cada ración. Las raciones fueron alimentadas, primero en orden decreciente y luego creciente, de calidad (Cuadro 22). Se encontró un efecto marcado al emplear licor sin suplemento de nitrógeno. El rango de diges-

CUADRO N° 22 — Raciones alimentadas en semanas sucesivas para probar el efecto de variar la ración sobre el licor del rumen.

Semana	Ración N°	Proteína cruda %	Fibra cruda %	Digestibilidad <i>in vitro</i> de M. O.
1	1	18,05	25,9	68,2
2	2	15,75	28,2	63,3
3	3	13,55	30,4	61,9
4	4	10,70	32,0	59,9
5	5	8,15	35,8	54,5
6	6	5,95	40,9	46,3
7	6	5,95	40,9	46,3
8	5	8,15	35,8	54,5
9	4	10,75	32,0	59,9

teibilidad promedio de la materia orgánica *in vitro* fue de 59,2 a 54,5 % encontrándose una correlación significativa con la proteína cruda de la ración ( $P < 0,01$ ,  $r = 0,88$ ) (Figura 18).

La práctica normal, es suplementar el licor del rumen con solución de sulfato de amonio, en la manera que se describió anteriormente. En estas condiciones, el efecto de la dieta se eliminó en buena parte, obteniéndose una variación en el promedio de digestibilidad de 59,7 a 57,5 y una correlación no significativa entre digestibilidad de la materia orgánica y la proteína cruda de la dieta. (Figura 19).

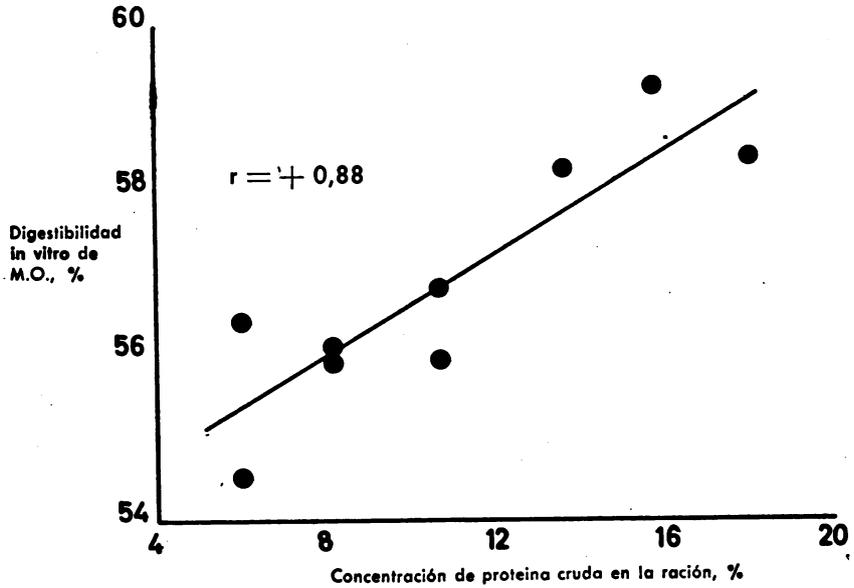


FIGURA N° 18. — Digestibilidad in vitro del promedio de seis muestras, incubadas con licor del rumen proveniente de dietas con diferente nivel de proteína cruda (licor sin suplemento nitrogenado).

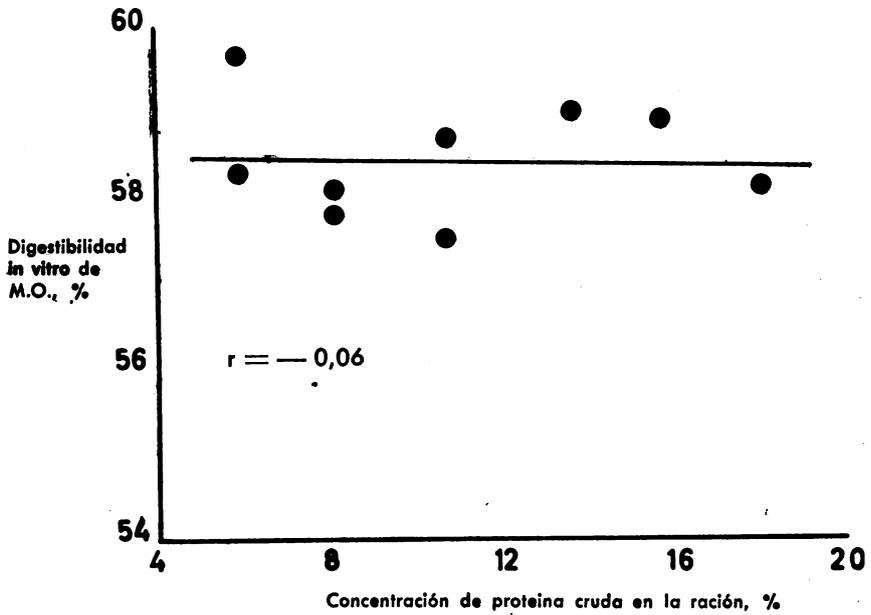


FIGURA N° 19. — Digestibilidad in vitro del promedio de seis muestras, incubadas con licor del rumen proveniente de dietas con diferente nivel de proteína cruda (licor con suplemento nitrogenado).

Se ha demostrado (2), que la suplementación con nitrógeno elimina el efecto del volumen de licor del rumen empleado y que el error analítico es menor. En esta serie de pruebas, se produjo una reducción pequeña en el error analítico (promedio general), siendo la reducción significativa ( $P < 0,05$ ) en el rango de 8 a 11 % de proteína cruda en la ración. El error standard de una sola determinación se redujo de  $\pm 0,80$  a  $\pm 0,64$ . En raciones con contenido de proteína cruda superior a 15 %, el nivel de error aumentó cuando se agregó el suplemento nitrogenado; por lo tanto, se debe tener cuidado si se asocia la suplementación nitrogenada con ese tipo de raciones.

A pesar de que los resultados presentados indican que la variabilidad en la calidad del forraje, a nivel uniforme de consumo, no afecta los resultados cuando se realiza en presencia de suplemento nitrogenado, la práctica de picar y mezclar el forraje se continúa por la facilidad en el manejo del alimento, por la reducción en el desperdicio del forraje debido a selección y para facilitar el control del consumo de los animales.

## B) Preparación de las muestras de forraje.

Los métodos *in vitro*, en los que participan etapas biológicas, han sido desarrollados por su superior habilidad para responder a los factores que controlan la digestibilidad, sean éstos el resultado de diferencias entre variedades, diferencias en madurez o de condiciones producidas por los métodos de conservación. De esta manera, parecería necesario, en estos métodos, tener mayor cuidado en la preparación física de las muestras. Por estas razones, se estudiaron detenidamente los efectos de temperatura de secamiento y frecuencia de secado y molido.

### a) Secado del forraje.

Antes de los trabajos *in vitro*, la costumbre era secar las muestras a 100°C durante la noche, en una estufa de aire forzado. Tilley y Terry (23), indican que este procedimiento no tiene efecto sobre la digestibilidad, basando sus comparaciones en resultados de digestibilidad *in vitro* de materiales secados en la estufa y secados en secadora-congeladora. La práctica de secado, se ha mantenido, en vista de los resultados arriba indicados.

### b) Molido de las muestras secas.

#### i. Selección del tamaño de criba.

Una muestra de heno de calidad media, se molió en cribas de 2,45 mm, 1,6 mm y 0,6 mm de diámetro. Los resultados (Cuadro 23) indican que el molido grueso, reduce la digestibilidad *in vitro* y eleva el error standard de estimación en forma significativa ( $P < 0,01$ ).

CUADRO N° 23. — Digestibilidad *in vitro* y error standard de la observación, en muestras molidas con cribas de tres diámetros.

Tamaño de criba	Digestibilidad M. O., <i>in vitro</i>	Error standard de una estimación
mm	%	%
2,45	50,07	0,709
1,60	50,53	0,702
0,60	53,78	0,353

Los resultados obtenidos, indican la necesidad de emplear una criba de diámetro constante y suficientemente pequeño para reducir al máximo los errores de muestreo.

ii. Equipo.

Se encontró que moler hasta ese grado de fineza, era una tarea tediosa en el molido Christy y Norris común, por lo cual se introdujo modificaciones al molino (Figura 20). La modificación básica es

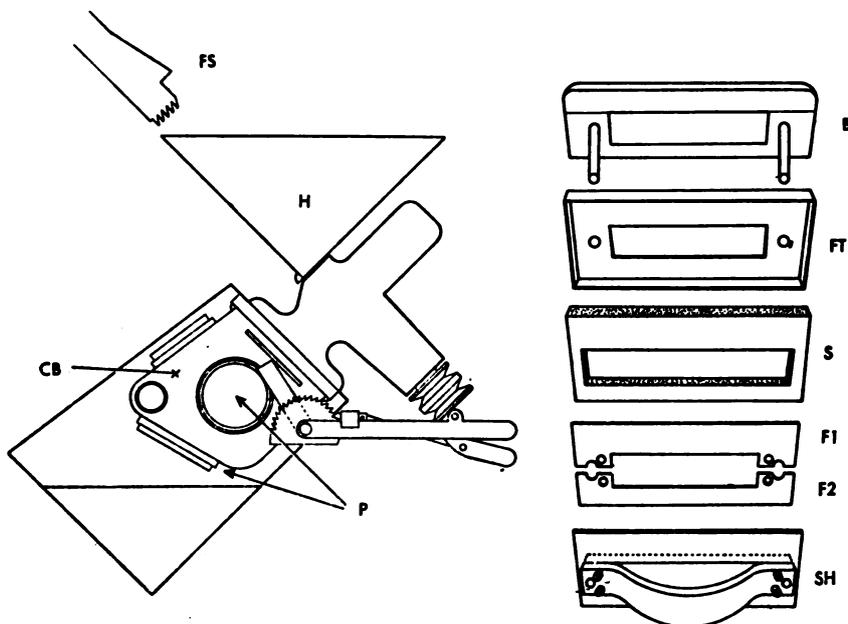


FIGURA N° 20 — Molino de Laboratorio Christy y Norris 8", modificado.

similar a la que se realizó en Hurley (18), en el hecho de que se coloca dentro de la caja de recolección (CB) una bolsa de nylon (P) en lugar de la bolsa de tela.

La caja metálica de recolección se mantiene contra la cara del molino por medio de una palanca (L) provista de un trinquete. El empaque de goma (S) asegura el cerrado efectivo. El empaque es asegurado a la base del molino (B) en el recipiente con borde (FT) por medio de los bordes F1 y F2, que se retienen en la caja de la criba (SH). La acción conjunta de la posición diferente del molino (M), el recolector grande (H) y el empleo de una pieza para empujar el alimento (FS), resultan en una mayor velocidad de paso del material a través del molino. El efecto más importante, sin embargo, es que las pérdidas de molienda se reducen de 8,1 g a 0,8 g / 100 g de materia seca.

### c) Frecuencia y temperatura de secamiento.

Se estudió la posibilidad de que el secamiento repetido de las muestras secas, produzca disminución en la digestibilidad de la materia seca, porque es nuestra costumbre mantener las muestras secas en bolsas de papel, en forma que puede absorberse hasta 14 % de humedad, durante el almacenamiento. Este problema se investigó tomando sub-muestras, de cuatro muestras secadas previamente a 100°C y molidas; las sub-muestras fueron secadas nuevamente a 100°C y molidas; las sub-muestras se secaron por segunda vez a 100°C y de ellas se pesó el material necesario para las estimaciones de digestibilidad y para medir la concentración de materia orgánica de las muestras. El sobrante de las sub-muestras se colocó sobre agua, en un recipiente cerrado y se dejó por 24 horas, luego se secó (100°C) y tomó nuevas muestras para digestibilidad. Este proceso se repitió hasta un total de cuatro secamientos.

Los resultados promedios de digestibilidad de tres de estos experimentos, se presenta en la Figura 21. Los resultados indican que, el secado repetido produce una disminución progresiva y significativa ( $P < 0,05$ ) de la digestibilidad medida *in vitro*. Al mismo tiempo, se realizaron los análisis de Kjeldahl de las cuatro muestras de uno de estos experimentos. Los resultados demuestran que, las estimaciones no son afectadas por el proceso de secamiento.

Tilley y Terry (23) informaron que, el secamiento de las muestras sobre 100°C no afecta su digestibilidad a menos que la temperatura suba a 125°C. Se investigó nuevamente este aspecto, encontrándose que en las muestras previamente secadas (100°C) y molidas, que eran resecadas a 110, 115 y 129°C, la digestibilidad *in vitro* disminuía solamente en el caso de las dos últimas temperaturas (Figura 22). En promedio, el efecto de tratamientos (temperatura) fue significa-

tivo ( $P < 0,05$ ) y las muestras variaron mucho en su sensibilidad a la temperatura. El cambio en el contenido de materia orgánica que se produjo como resultado de estos tratamientos fue pequeño, pero de todas maneras, los resultados se calcularon en la materia orgánica

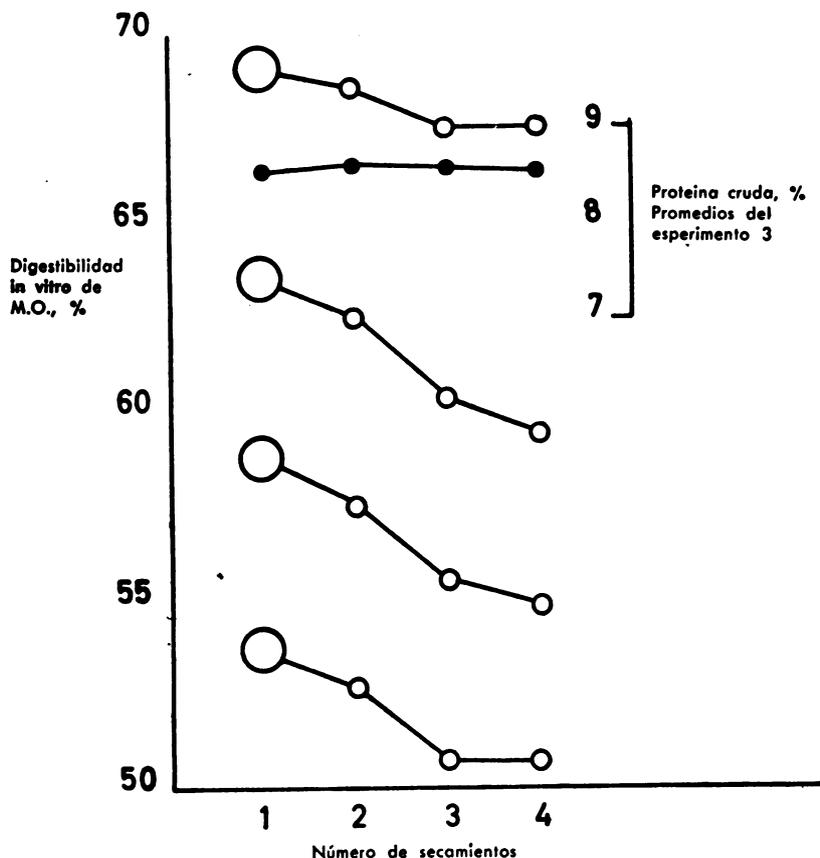


FIGURA N° 21 — Digestibilidad in vitro de cuatro muestras de forraje secadas repetidamente.

encontrada después de los tratamientos. Los resultados encontrados, indican la necesidad de tener mayor cuidado con la frecuencia y temperatura de secamiento de las muestras, cuando se van a emplear con métodos *in vitro*.

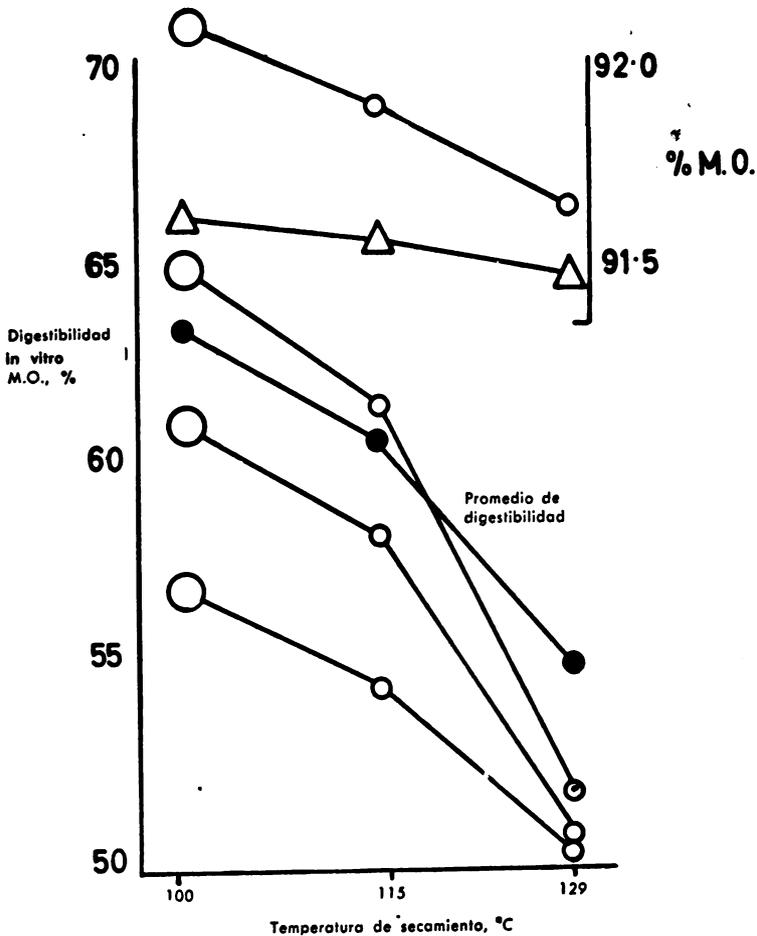


FIGURA N° 22. — Digestibilidad In vitro de cuatro muestras de forraje secadas a tres temperaturas diferentes.

### C) Obtención de sub-muestras para el análisis.

La sensibilidad encontrada al secamiento repetido, indica que no es aceptable el sistema de sacar la muestra para el análisis, de una muestra grande general. Las pesadas se pueden hacer de una muestra seca al aire y determinar el contenido de materia seca en otra muestra por separado. Otra posibilidad es el establecer que se resecará una sola vez las muestras secas y molidas previamente. La primera práctica implica un pesaje más, por lo cual debe preferirse el segundo sistema.

En nuestro laboratorio, la práctica es realizar los análisis duplicados tomando de una sub-muestra de 5 g. Los pesos para *in vitro* y materia orgánica se obtienen de esta sub-muestra. Los pesos para *in vitro* se toman primero y luego, la sub-muestra se seca otra vez antes de sacar los pesos para materia orgánica (la cual no está influenciada por el secamiento, Figura 22).

Este método, reduce el trabajo de muestreo, pero aumenta el peligro de error por muestreo, que queda enmascarado. Este problema, fue investigado tomando tres sub-muestras de cada una de cuatro muestras y realizando estimaciones de digestibilidad *in vitro* en triplicado, de cada sub-muestra. El análisis estadístico de los resultados indicó que, el cuadrado medio de análisis era de la misma magnitud que el cuadrado medio dentro de muestras y que por tanto, el método de muestreo era válido para el propósito empleado.

En el experimento descrito, el muestreo se realizó con espátula (casi 20 porciones por sub-muestra), tomando de la muestra total que había sido extendida sobre una superficie. Este procedimiento es sucio y lento, por lo cual se ideó la herramienta de muestreo que se diagrama en la Figura 23. El muestreador tiene la forma de un sacabocado, que se introduce de arriba a abajo en la muestra; un pistón en el interior, compacta la muestra, para que no se caiga al sacarla. El muestreo con este método probó ser igualmente satisfactorio.

#### D) Inoculación y gaseado superficial con CO<sub>2</sub>.

##### a) Equipo.

En trabajos anteriores, se había notado que la demora en la fase de inoculación producía una declinación en la actividad del licor del rumen, del comienzo al final de la corrida. Este riesgo y el trabajo de medir separadamente el licor de rumen y el buffer, nos llevó al desarrollo de un equipo simple para medir el inóculo combinado (2).

El equipo ha sido ahora desarrollado a un estado más efectivo, realizándose la inoculación con el equipo que se indica en la Figura 24. Para evitar las pérdidas de CO<sub>2</sub> del buffer (5), se pasa CO<sub>2</sub> por el interior y sobre la mezcla colocada en el recipiente (C), el cual está inmerso en el baño de maría (WB) mantenido a 38,5°C de temperatura por el termostato (T). Para mayor seguridad en retener el CO<sub>2</sub>, se gasean los tubos con CO<sub>2</sub> mientras el inóculo es medido por la bomba de medida (P). La bomba, que funciona con un motor (M), tiene válvulas de vidrio que cierran por gravedad (V). El voltaje se reduce con una serie de resistencias (R), de manera que la caída del pistón es lenta, evitando la salida del líquido en flujos acelerados. Durante la salida del inóculo, la velocidad del pistón se mantiene,

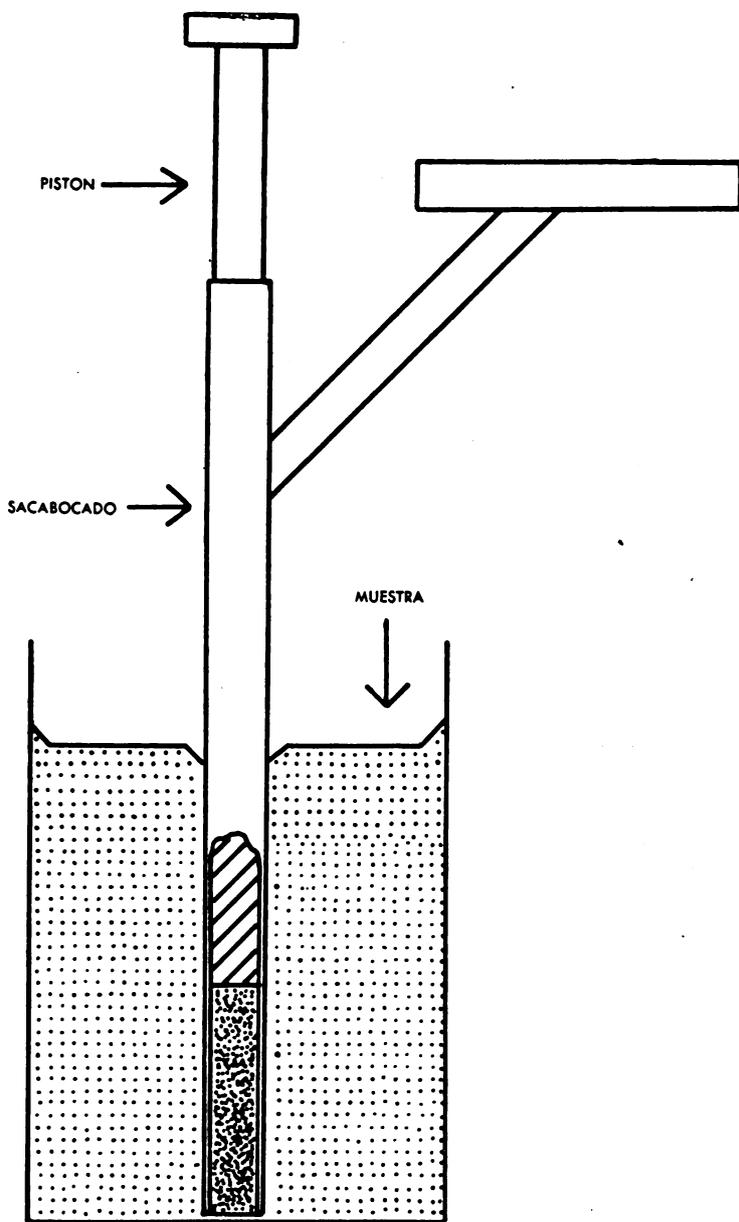


FIGURA N° 23 — Instrumento para el muestreo del forraje molido

produciendo un corto circuito en la resistencia por medio de la llave de paso operada por la rueda excéntrica, que normalmente está cerrada ( $S_1$ ).

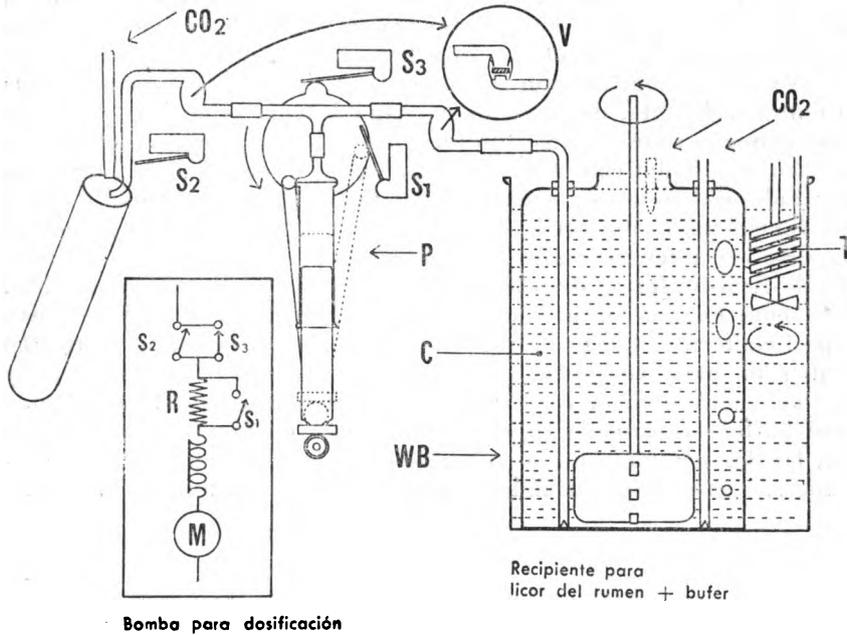


FIGURA N° 24 — Equipo para la inoculación

El control de la cantidad que sale, se consigue con dos llaves  $S_2$  y  $S_3$ . La llave  $S_2$  (normalmente abierta) se pone en funcionamiento con el borde del tubo, mientras que  $S_3$  (normalmente cerrada) es operada por la rueda excéntrica. La salida del líquido, se consigue elevando el borde del tubo, lo cual cierra temporalmente  $S_2$ . Una vez que comienza la salida del líquido, el movimiento de la rueda excéntrica permite el cerramiento de  $S_3$ , así la salida se mantiene por el tiempo de rotación de la rueda excéntrica, al finalizar la cual, la llave  $S_3$  se abre nuevamente y el proceso se detiene. La operación continúa de la bomba, se hace posible ofreciendo los tubos en ritmo adecuado. El tubo de descarga es curvo, de manera que la corriente de líquido golpea las paredes, produciendo una cortina de líquido que impide la pérdida de partículas finas.

b) Gaseado superficial de los tubos.

Los informes de la literatura, están generalmente de acuerdo en que, la tensión de  $\text{CO}_2$  es importante (12, 13); sin embargo, hay poca especificación sobre la técnica a emplearse e incluso, a pesar de que Baumgardt y colaboradores (5) indican que gasean los tubos con  $\text{CO}_2$  por 15 segundos, omiten indicar la velocidad de salida del gas. Nuestro trabajo, originalmente incluía gasear los tubos por 10 segundos a velocidad de salida de 4 litros por minuto. Posteriormente se investigó la contribución del gaseado superficial. Se encontró que la eliminación total del gaseado superficial, tenía solamente un efecto muy pequeño sobre la digestibilidad. En vista de lo contradictorio de nuestros resultados con la mayor parte de los informes de la literatura, se estudió este aspecto nuevamente. Partiendo de una cantidad de licor del rumen mezclado con buffer, y bajo alta tensión de  $\text{CO}_2$ , como se ha descrito antes, se realizaron una serie de inoculaciones. La mezcla de licor-buffer se dividió entonces en dos porciones (Figura 25), solamente en una de las dos porciones se burbujeó  $\text{CO}_2$  y se gaseó superficialmente. Luego de una hora de espera, simulando el tiempo requerido para completar una serie completa de inoculaciones, y tiempo en el cual, el exceso de  $\text{CO}_2$  se desprende de la suspensión licor-buffer no gaseado superficialmente, se realizaron inoculaciones con las dos porciones de la suspensión. En los dos grupos de inoculaciones, se gaseó superficialmente la mitad y la otra mitad no. Los re-

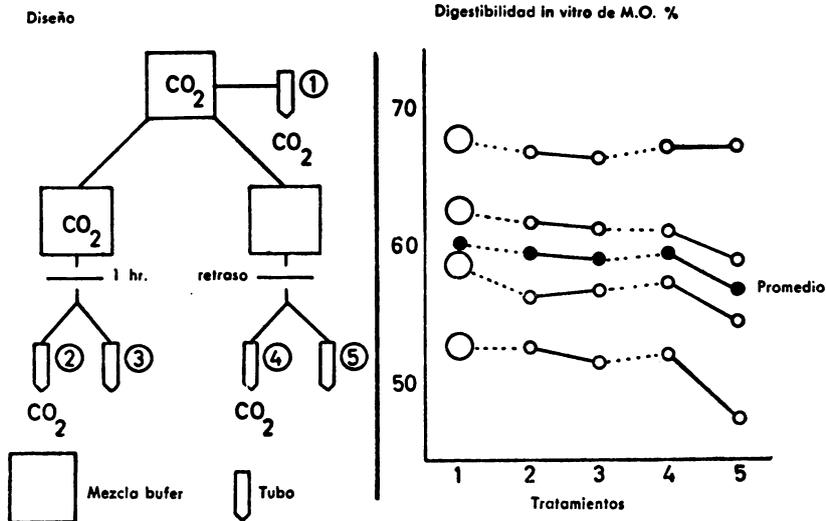


FIGURA N° 25. — Diagrama del diseño experimental y resultados de la sensibilidad del método al gaseado superficial con  $\text{CO}_2$

sultados de la Figura 25 indican que, se puede producir un efecto altamente significativo ( $P < 0,01$ ), si no se gasea superficialmente los tubos, pero que el método de inoculación empleado evita el peligro de la falta de gaseado.

c) Práctica actual.

Los requisitos de mano de obra son máximos al momento de realizar las inoculaciones. En el procedimiento original, era considerablemente mayor que el tiempo requerido para detener la fase de fermentación del rumen, agregando ácido. El procedimiento se modificó haciendo funcionar la bomba a su máxima velocidad. Este cambio, elevó la capacidad de inoculación a un tubo cada 4 segundos o sea aproximadamente 20 minutos por cada corrida. Para compensar por la reducción en el tiempo de gaseado superficial, se emplea un sistema de tubo múltiple (Figura 26) de manera que cada tubo recibe 12 segundos de gaseado.

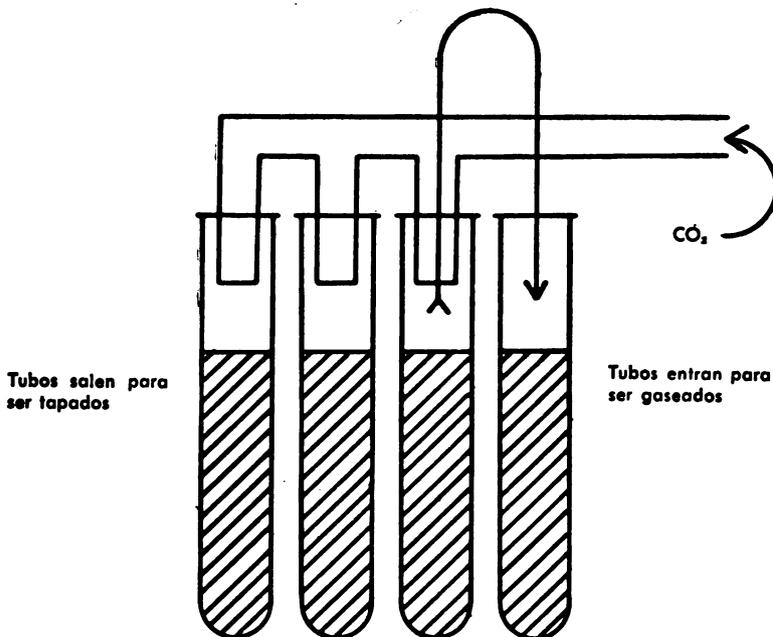


FIGURA N° 26. — Equipo para el gaseado superficial de los tubos.

## E) Digestión.

Luego de la inoculación, la fermentación se realiza en un baño de maría a 38,5°C, a pesar de que la mayoría de los laboratorios usan incubadoras. El baño de maría tiene la desventaja de que obliga a manejar tubos húmedos, pero en un sistema de número de muestras por corrida elevado y en sistemas (como es el nuestro) en que se necesita tener acceso a cada uno de los tubos, el baño de maría es virtualmente necesario. El baño de maría tiene además, las ventajas de ser más económico, más estable en el mantenimiento de la temperatura y tener inercia térmica mucho mayor.

El método es relativamente sensible a la temperatura; el aumento promedio en la digestibilidad entre 35,5 y 42,0°C fue de 0,67 unidades de digestibilidad por grado centígrado (Figura 27). Es sin embargo interesante notar que, no se precisa un termostato de rango de control muy estrecho, porque en una prueba, al fluctuar a propósito la temperatura una vez por hora entre el rango arriba indicado, no se alteró significativamente el nivel de digestibilidad. El manejo individual de los tubos, antes que en grupos es deseable, para limitar el tiempo de enfriamiento de los tubos, en vista de que el enfriamiento (3 horas a temperatura ambiente del laboratorio) en las primeras etapas de la fermentación disminuye la digestibilidad en 2,23 unidades.

Como el control adecuado de la temperatura es fácil de conseguir en la práctica, las variaciones en digestibilidad a la temperatura deben ser muy pequeñas.

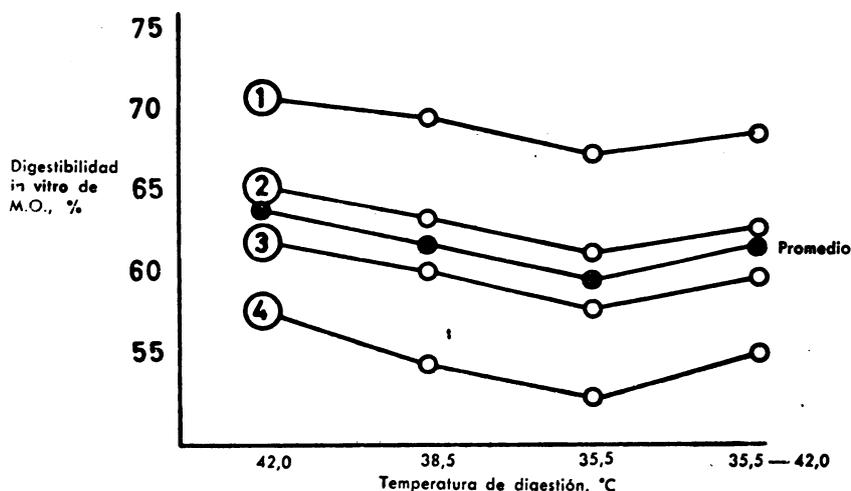


FIGURA N° 27. — Digestibilidad in vitro de cuatro muestras de forraje digeridas a cuatro temperaturas diferentes.

## F) Controles de pH.

Los tubos de digestión se ajustan para pH en dos puntos del procedimiento:

1. A las 24 horas, con carbonato de sodio, para elevar el pH después de la depresión causada por los ácidos grasos volátiles.

2. La fase del licor del rumen se termina con la inyección de 1,5 ml y luego 2,5 ml. de HCl (20 % v/v), por las paredes del tubo que permanece en el baño de maría. Si se emplea una jeringa automática (por ejemplo Zipette de Jenco), la operación es simple y no causa demasiada espuma, siempre y cuando los tubos se dejen en su lugar. Antes de añadir la solución acuosa de pepsina, se ajusta el pH de los tubos a 1,2.

El mismo equipo especial (Figura 28) es empleado para las dos operaciones. Los tubos son mantenidos sobre el electrodo doble (Pye Ingold E 401) (E) y el mezclador de vidrio (ST) por el gancho (CL). Durante la operación, una corriente de CO<sub>2</sub> entra sobre la superficie del líquido a través del tubo A. La velocidad de agregado de la solución, por medio del tubo B, se ajusta con la llave de paso que está conectada en serie con la llave principal. Luego del ajuste de pH, se lavan los electrodos y se gasean los tubos superficialmente con CO<sub>2</sub> (5 segundos a 4 litros por minuto). En el segundo ajuste, una vez que el pH ha llegado a 1,2, se agrega la pepsina por medio de una jeringa automática (Zipette) en el tubo C. Se encontraron tres problemas con este procedimiento.

1. La capa de material indigerido retenía la solución de carbonato de sodio y por esa razón se producía una demora en la respuesta del pH.

2. La llave que operaba el motor de la mezcladora era lenta para reaccionar y fallaba por humedecimiento con reactivos y agua.

3. El operador podía omitir la pepsina porque a simple vista no se reconoce el agregado.

La primera de estas dificultades fue solucionada en gran parte, extendiendo el tubo (B) hasta el nivel de las paletas de la mezcladora. Las otras dos dificultades se resolvieron con la aplicación del circuito eléctrico descrito en la Figura 29. La rueda excéntrica (CA) de la base del electrodo, opera la micro-llave (S<sub>1</sub>) (que normalmente está abierta) cuando se coloca un tubo sobre los electrodos. Esta acción cierra el relay R<sub>2</sub>, interrumpiendo el circuito que mantiene cerrada la llave R<sub>1</sub>. El relay es reducido por medio de un capacitador (CP<sub>2</sub>) que demora la operación, produciéndose así una demora en el cerramiento de los contactos (R<sub>1</sub> : C<sub>1</sub>) que controla el motor de la mezcladora (M). El efecto obtenido, es demorar el comienzo de la mezcladora cuando se cierra el gancho, permitiendo así al operador dirigir el tubo hacia arriba y alrededor del tallo frágil de la mezcladora.

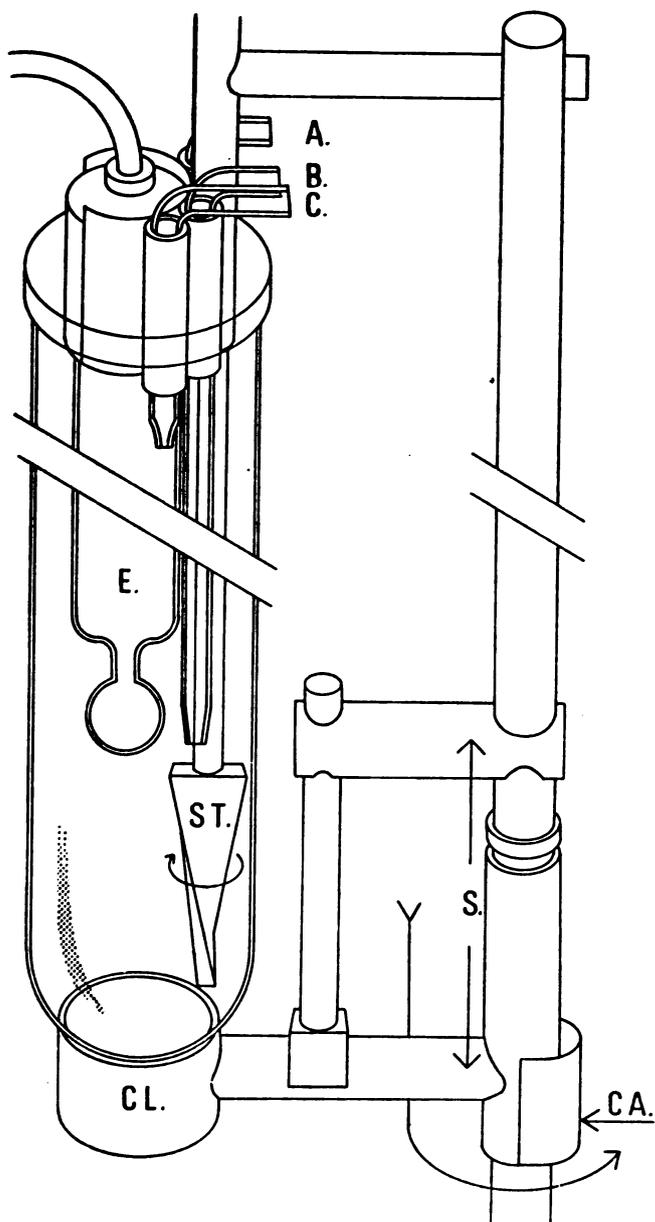


FIGURA N° 28. — Electrodo (2).

Cuando se abre nuevamente el gancho, se reactiva  $R_1$  y el motor se detiene inmediatamente. El resto del circuito, compuesto por una conexión eléctrica entre la llave  $S_1$  del gancho y la llave  $S_2$  colocada en la jeringa automática, impide la omisión de la pepsina, por medio de un sonido de campana (Campana A), que se produce si se retira el gancho, sin haber agregado la pepsina. En la práctica, este equipo reduce los errores apreciablemente y provee el beneficio adicional de aislar bien las entradas de corriente eléctrica, en una situación en la cual es difícil de mantener buena aislación.

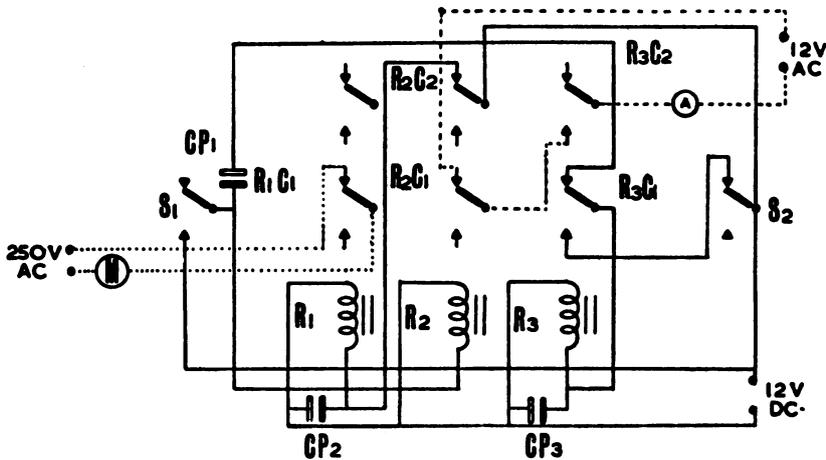


FIGURA N° 29. — Circuito de control.

### G) Recobro de los residuos.

#### a) Alternativas posibles.

Además del método descrito en este artículo, se pueden recobrar los residuos por centrifugación (23) o filtración (9, 19) al final de las dos fases. Los dos métodos pueden además combinarse, realizando centrifugación después de la fermentación con licor del rumen y filtrado luego de la pepsina (23).

El número de muestras hacía inoperante el sistema de centrifugación, de manera que, se probó la filtración para terminar las fases del licor del rumen por acidificación, realizando la filtración luego de la digestión con pepsina. El último procedimiento mencionado, demostró ser menos tedioso y tener la ventaja de eliminar la operación de transferencia, con los peligros de error y pérdida del residuo.

b) Práctica seleccionada.

Luego de agregar aproximadamente un gramo de material inerte, (ayuda para la filtración), se limpian las paredes del tubo con un

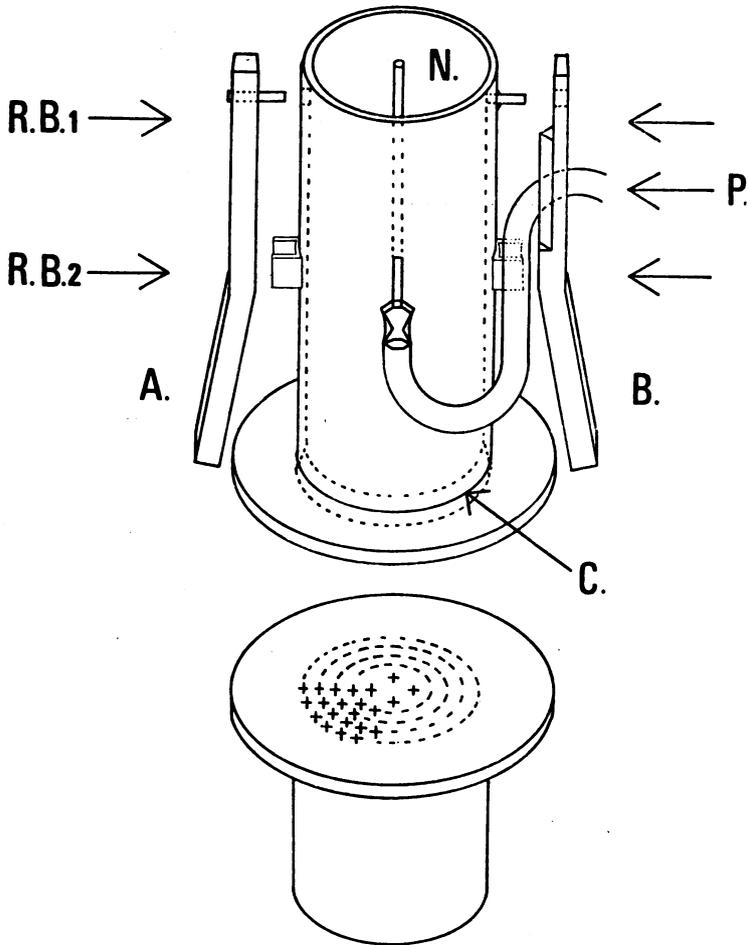


FIGURA N° 30. — Embudo para filtración (2).

mango rotativo de goma. Los tubos son entonces colocados en el embudo especial para la filtración (Figura 30) (2) mientras los embudos están en la posición invertida. En esta posición, los tubos son retenidos

por la presión de las gomas RB<sub>1</sub> y RB<sub>2</sub>, que actúan sobre el retenedor localizado en la extremidad A. El aparato se invierte luego a la posición elevada, impidiéndose el derrame por medio de presión de aire. Los tubos se lavan hacia abajo oprimiendo las dos extremidades, lo cual permite que las gomas se aflojen y que el agua bajo presión adecuada salga por el tubo plástico (P) y la aguja (N). Los tubos se sacan de los embudos, luego de cinco lavados, y se recobran los residuos con el papel de fibra de vidrio, colocándolos finalmente en cápsulas de aluminio anodizado. La canal (C), ayuda la separación del filtro del embudo. Luego de secar a 100°C y pesar, las cápsulas y residuos se calcinan a 480°C. Varios pisos de cápsulas se mantienen separados entre sí, en la mufla, por medio de láminas de aluminio anodizado. La diferencia entre el peso seco y calcinado, se toma como la materia orgánica indigerible y los resultados se calculan de acuerdo a la ecuación siguiente:

$$\text{Coeficiente de digestibilidad de M.O., in vitro} = \frac{\text{M.O. en 0,5 g de muestra} - \left( \frac{\text{M.O. en residuo de muestra} - \text{M.O. en residuo control}}{\text{M.O. en 0,5 g de muestra}} \right)}{\text{M.O. en 0,5 g de muestra}} \times 100$$

El material inerte para ayuda de la filtración, se agrega en volumen, habiéndose probado que la cantidad de material inerte agregado no influye en los resultados. Esto se demostró, calculando el recobro que se obtenía cuando se agregan cantidades de material inerte que variaba de 0,75 a 1,25 g (un rango mayor que el que se obtiene midiendo la cantidad por volumen aproximado). Estas pruebas resultaron en eficiencias de recobro que no fueron significativamente diferentes (la digestibilidad promedio de 4 muestras fue con 0,75 g de material 62,42 % y con 1,25 g, 62,50 %).

### c) Ventajas del método.

Este método que emplea: filtración semiautomática, papel filtro de fibra de vidrio, material inerte de ayuda para la filtración y equipo de aluminio, junto con la expresión de los resultados como digestibilidad de la materia orgánica, tiene las siguientes ventajas:

1. Se evita pesar el material inerte, tarea que es difícil, por la naturaleza física del material.
2. Las pérdidas de material inerte que se producen durante el proceso no son importantes.
3. El material inerte actúa como material abrasivo y ayuda en el lavado automático de los tubos.
4. Las posibilidades de transferencia cruzada de material (por descuido en la filtración) se eliminan con el sistema de inversión y cierre de aire de los embudos.

5. La uniformidad en el peso de las cápsulas de aluminio, facilita grandemente la labor de pesada, disminuyendo el manipuleo de las balanzas.

6. Los efectos de contaminación con suelo se eliminan al expresar los resultados como coeficiente de digestibilidad de la materia orgánica (2).

d) Operación continua.

El método descrito, con la mano de obra especificada, permite una operación continua de aproximadamente 300 muestras por corrida. Este trabajo requiere de tres asistentes de laboratorio a tiempo completo, con ayuda en el momento de la inoculación (2).

### III. DISCUSION SOBRE EL METODO

#### 1. Efecto de las Modificaciones

La acidificación de los tubos de digestión y el agregado de solución acuosa de pepsina, constituye un cambio importante del método propuesto por Tilley, porque el líquido sobrenadante no se decanta o centrifuga al finalizar la fase del licor del rumen, sino que se baja el pH. El procedimiento escogido, provoca un precipitado y altera el peso del residuo sobre el cual debe actuar la pepsina. Se realizaron pruebas para asegurar que este cambio en el procedimiento, no había alterado el principio básico del método de Tilley. Este investigador y sus colaboradores (22), indican que con la fase de la pepsina, se aumenta la digestión de la proteína estando el aumento relacionado con el nivel de proteína en el forraje y que, como consecuencia, se obtenían mejores correlaciones con los resultados *in vivo*, se reducían los errores entre corridas y se mejoraba la precisión de los análisis.

#### A) Contribución de la fase de pepsina.

En un experimento con 6 muestras de forraje cuyo contenido de proteína cruda fluctuaba entre 11,8 y 22,2 %, se estudió la proporción de la digestibilidad que era atribuible a la acción de la pepsina. La digestión se detuvo en tres puntos: 1) luego de 48 h. de digestión con licor del rumen: 2) después de 48 horas de digestión con el licor del rumen seguidas de 48 horas con ácido hasta pH 1,2; y, 3) después de 48 horas de digestión con el licor del rumen seguidas de 48 horas

con el tratamiento normal de pepsina. Los resultados de la Figura 31, indican que la disminución de la digestibilidad por la acidificación del líquido sobrenadante hasta pH 1,2 sin agregar pepsina es consistente e independiente de la naturaleza de la muestra digerida. Estos resultados indican así mismo que, la contribución de la fase de digestión con pepsina, es en verdad una función del contenido de proteína de la muestra y que sigue una distribución similar a la que fuera observada originalmente por Tilley *et al.* (22).

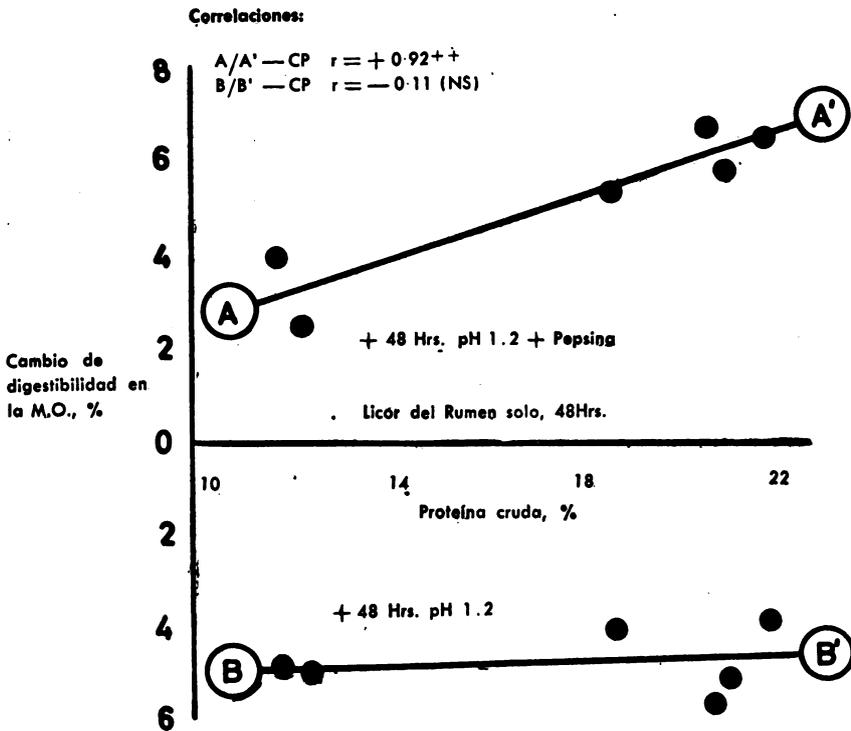


FIGURA N° 31. — Proporción de la digestibilidad in vitro atribuible a la acción de la pepsina.

Los efectos primarios que fueran encontrados por Tilley *et al* (22), como resultado de incluir la fase de pepsina, se repitieron en el método propuesto (Cuadro 24).

CUADRO N° 24. — Correlaciones entre digestibilidad *in vivo* e *in vitro* y errores entre y dentro de corridas cuando se incluye o se omite la fase de pepsina.

Comparación	Método	
	Licor del rumen solamente	Licor del rumen + pepsina
<u>In vitro / in vivo</u> r	0,93	0,99
Error standard residual	2,88	1,01
Error, entre corridas	0,99	0,63
Error, dentro de corridas	0,73	0,38

B) Comparación directa de los métodos.

El método que se ha descrito, fue probado también comparándolo con el método de centrifugación propuesto por Tilley y Terry (23), realizando análisis simultáneos de 4 muestras que tenían valores *in vivo* de digestibilidad conocidos. En la centrifugación, se omitió la adición de cloruro de mercurio y carbonato de sodio al líquido sobrenadante, pero se empleó el mismo licor del rumen suplementado con nitrógeno. La correlación entre los resultados de los dos métodos fue alta ( $r = 0,994$ , desviación standard =  $\pm 0,85\%$ ). La relación con los resultados *in vivo*, fue menor en el método de la centrifugación (desviación standard 1,5 comparada con 0,66). La diferencia entre los métodos no fue significativa. El error analítico, sin embargo, fue significativamente mayor en el método de centrifugación; encontrándose que el error standard de una estimación era  $\pm 1,22$ , comparado con  $\pm 0,50\%$  ( $P < 0,05$ ).

Los resultados indican muy buen acuerdo entre los métodos. La menor precisión observada con el método de centrifugación, puede estar asociada con la omisión de los materiales que ayudan la centrifugación y también con un factor que causa siempre mucha dificultad al comparar métodos, cual es, el grado de inexperiencia con el procedimiento y fallas en el equipo.

De estos resultados se concluye que, las modificaciones descritas permiten el beneficio de aumentar la capacidad de producción, sin

invalidar en forma alguna el concepto de que, la adición de pepsina, confiere al método un standard más alto de precisión, no sólo desde el punto de vista de la técnica de laboratorio, sino también en lo que respecta al grado de predicción de resultados *in vivo*.

## 2. Posibles Simplificaciones.

### A) Eliminación del ajuste de pH a las 24 horas.

La importancia del control del pH, para obtener valores de digestibilidad *in vitro* consistente, ha sido demostrada por Tilley y colaboradores (24). Estos investigadores demostraron que la digestibilidad será máxima y pH 6,8. Tilley y Terry (23), indican que el pH se mantendrá entre los límites de 6,7 y 6,9 si la oveja donante de licor del rumen es alimentada con heno y que por tanto no es necesario ajustar el pH al menos que el animal sea alimentado con gramíneas verdes. Dent (9), empleando una modificación del método de Tilley, mantiene también que no es necesario ajustar el pH a las 24 horas, porque el digerido se mantiene entre pH 6,8 y 7,1. Dent, sin embargo, comprueba el pH en un cierto número de muestras en cada corrida.

En una serie de siete experimentos se comparó el resultado de corregir el pH y no hacerlo a las 24 horas. En cuatro de estos experimentos se realizaron las pruebas como cuatro grupos separados, todos ellos con licor del rumen proveniente de ovinos alimentados con heno de calidad media y un suplemento de 100 g de concentrado para ovejas (experimentos 1, 2, 3 y 4). Los otros tres experimentos se realizaron en una sola corrida, empleando tres diferentes fuentes de licor del rumen. Cada inóculo provenía de una oveja diferente, las cuales fueron alimentadas con pasto seco de calidad baja, heno de calidad media y heno de mala calidad.

Los resultados que se presentan en la Figura 32, corresponden a cuatro muestras comunes para todos los experimentos. La variabilidad entre experimentos, en el grado de depresión de la digestibilidad, se puede constatar porque las diferencias entre los promedios de los experimentos se aproximan a la significación (significativas al nivel de 10 %). Por otro lado, los promedios de las muestras, sobre todos los experimentos, presentan diferencias altamente significativas ( $P < 0,01$ ).

Los resultados indican que la eliminación del ajuste de pH a las 24 horas, produce una disminución en la digestibilidad en función de las muestras y en forma variable entre experimentos. Por razones asociadas con el nivel básico de los errores, el ajuste de pH a las 24 horas, tiene solamente un efecto pequeño y no significativo sobre el error standard de una corrida, reduciéndolo de  $\pm 0,78$  a  $\pm 0,71$  %.

Se estudió también el efecto de esta simplificación en el procedimiento sobre el error analítico. En este caso se encontró que la inclusión del ajuste de pH, produjo una mejora significativa ( $P < 0,01$ ) en la precisión del procedimiento, reduciendo el error standard de una estimación de  $\pm 0,73$  a  $\pm 0,53$  %.

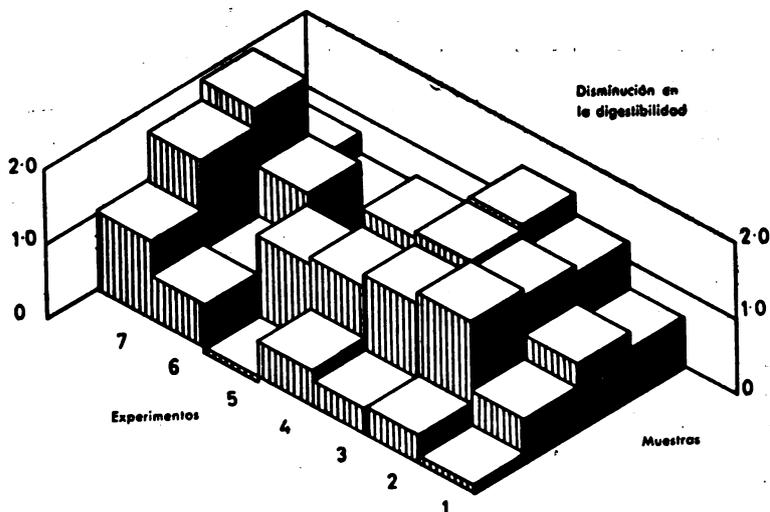


FIGURA N° 32. — Cambio en la digestibilidad *in vitro* como resultado de eliminar el ajuste de pH a las 24 horas.

Se debe resaltar además el hecho de que, la gran variación en la depresión (desde casi cero hasta dos unidades de porcentaje) puede influir la precisión de la relación *in vitro* / *in vivo*. Se disponía de muy pocas muestras de forrajes con digestibilidad *in vivo* conocida, para poder probar la certeza de esta observación, pero parece lógico emplear en los análisis de rutina el método con el cual se derivaron las relaciones y no alterar la técnica entre experimentos, ni siquiera cuando la evidencia encontrada en unos pocos tubos de la corrida indique que no hay efecto. Los resultados presentados, así como la demostración de que el ajuste mejora la precisión de los animales, se aceptan como justificación para continuar incluyendo este paso en el método.

#### B) Eliminación del ajuste de pH a las 48 horas.

El método empleado para disminuir el pH y añadir la solución de pepsina, se reconoce como conveniente desde el punto de vista de la

mecánica del laboratorio y porque se evitan errores que surgen de la adición inadecuada de reactivos. Se estudió la importancia del pH a las 48 horas. En dos experimentos con 4 muestras, se encontró que el cambio de pH de 2,5 a 1,2 producía un cambio en la digestibilidad promedio de 3,49 unidades (o 2,68 unidades por unidad de pH). A pH 1,2 la adición de más ácido tiene poco efecto, porque la curva de titulación es muy plana.

Para probar si se podía eliminar el ajuste crítico del pH, se realizaron dos experimentos sucesivos con 7 muestras, en los cuales se añadió 6 ml de HCl (20 % v/v) en tres incrementos. La adición del ácido fue seguida de la pepsina acuosa, sin medir el pH. Sin embargo de que los resultados de digestibilidad fueron ligeramente más bajos que los obtenidos en la práctica normal (ajuste crítico del pH), la desviación standard entre experimentos no fue significativamente diferente.

A pesar de que las pruebas cortas descritas, sugieren que no comprobar el pH a las 48 horas puede no reducir la estabilidad del método, el hecho de que el ácido deba ser agregado en tres etapas para evitar la espuma excesiva, especialmente en los tubos control, sumado al hecho de que el pH es crítico en el rango de 2,5 a 1,2 parece indicación que es necesario tomar precauciones especiales en esta parte del método, para evitar errores serios que se pueden producir por la falta de ácido en un tubo. Además, si se emplea un método de agregado rápido como la jeringa automática, se debe tener cuidado de que no se pierda nada del ácido y disponer de un sistema de compensación para las posibles pérdidas.

Tomando estos hechos en consideración, y en especial en trabajos de asesoría, es deseable evitar la repetición de procedimientos largos, se considera más seguro agregar una cantidad aproximada de ácido y luego ajustar el pH en cada tubo. A esto se agrega el hecho de que como es necesario hacer el control crítico del pH a las 24 horas, el equipo, para este trabajo está de todas maneras disponible.

### C) Eliminación de tubos de control.

El empleo de los tubos de control en la forma descrita, lleva implícito que la digestión de la materia orgánica del inóculo solo, llegará al mismo punto de digestión, cuando está solo que cuando lleva una muestra de forraje. La falta de seguridad sobre este punto motivó el estudio de la utilidad de incluir controles en el análisis. El estudio se hizo calculando los resultados de digestibilidad con y sin los controles, en cuatro muestras standard de forrajes y en 10 corridas seleccionadas por tener valores muy diferentes de control. La inclusión del control, redujo significativamente el error standard de una corrida de  $\pm 1,27$  a  $\pm 0,89$  ( $P < 0,05$ ). El mejoramiento de la precisión se tomó como justificación para el esfuerzo extra de incluir los controles.

## IV. DETERMINACION DE LA PRECISION DEL METODO

### 1. Errores en el Laboratorio

Los experimentos que se describieron en la sección anterior, sirvieron para reconocer los factores que afectan al método y para determinar su magnitud relativa. Se incluyó también una discusión de la facilidad o dificultad que se encuentra en su control. Los factores que contribuyen a causar errores en el método, son acumulativos y por lo que se ha dicho, es aparente que muchos de ellos tienen efecto depresivo sobre la digestibilidad. La propiedad de los sistemas de control de errores, incluidos en el método como resultado de los estudios realizados, pueden probarse solamente midiendo los parámetros de precisión (errores dentro de corridas, errores entre corridas y errores de predicción) cuando el método es empleado en su máximo de capacidad de trabajo.

#### A) Procedimiento analítico.

Por razones de economía en el trabajo, nuestra costumbre ha sido limitar a dos el número de estimaciones por muestra. Hay dos procedimientos posibles: una sola estimación en cada una de dos corridas sucesivas o determinación duplicada en una misma corrida.

En las comparaciones realizadas por Baumgardt y Oh (6), sobre el error standard del promedio de digestibilidad de la celulosa de un solo forraje, calculado para varias combinaciones de corridas y repeticiones dentro de cada corrida, se concluyó que, aumentando el número de corridas se disminuía más el error standard que aumentando el número de repeticiones dentro de una corrida. A pesar de que los resultados de la literatura, indican que es preferible la primera posibilidad, se considera que la segunda es más aplicable, por las siguientes razones. Primeramente, tratándose de muestras para asesoría, es esencial que la demora entre la llegada de las muestras y la salida de los resultados, sea la mínima. Segundo, la experiencia con métodos de esta complejidad, operados sin repetición ha sido desilusionante. Se ha visto que es un factor importante en el trabajo de laboratorio, que los resultados reflejen el cuidado con el cual se ha trabajado. La mayor tolerancia que debe permitirse cuando se realizan los duplicados en dos corridas separadas, implica que el reflejo de ese esfuerzo no es tan visible para el técnico, y como consecuencia tiende a disminuir su cuidado en el trabajo.

El empleo exitoso del procedimiento analítico, implica que la relación entre el error dentro de una corrida y entre corridas debe ser tal que la precisión no sufra por no incluir el efecto correctivo que resulta de promediar los resultados de análisis realizados en corridas separadas. Este punto fue estudiado en forma crítica, por medio del experimento que se presenta a continuación.

## B) Medidas del tamaño del error.

Se prepararon 20 sub-muestras de 20 muestras que tenían digestibilidad *in vitro* conocida entre 40 y 84 %. Las sub-muestras se analizaron en una sucesión de cuatro experimentos, uno cada semana. Cada experimento consistió de seis standards en triplicado y cinco bloques, con una sub-muestra de cada una de las veinte muestras distribuidas al azar dentro de cada bloque. Los bloques se distribuyeron espaciadamente a lo largo de la corrida. Para asegurar que había un énfasis normal en el método, se colocaron tubos de análisis común entre los bloques, hasta producir un total semanal de 276 análisis. Así, hubieron cinco repeticiones de cada muestra en cada una de las semanas. En las cuatro semanas de prueba, se realizaron por tanto, veinte análisis de cada muestra; el número total de análisis de que estuvo constituida la prueba fue 1.104.

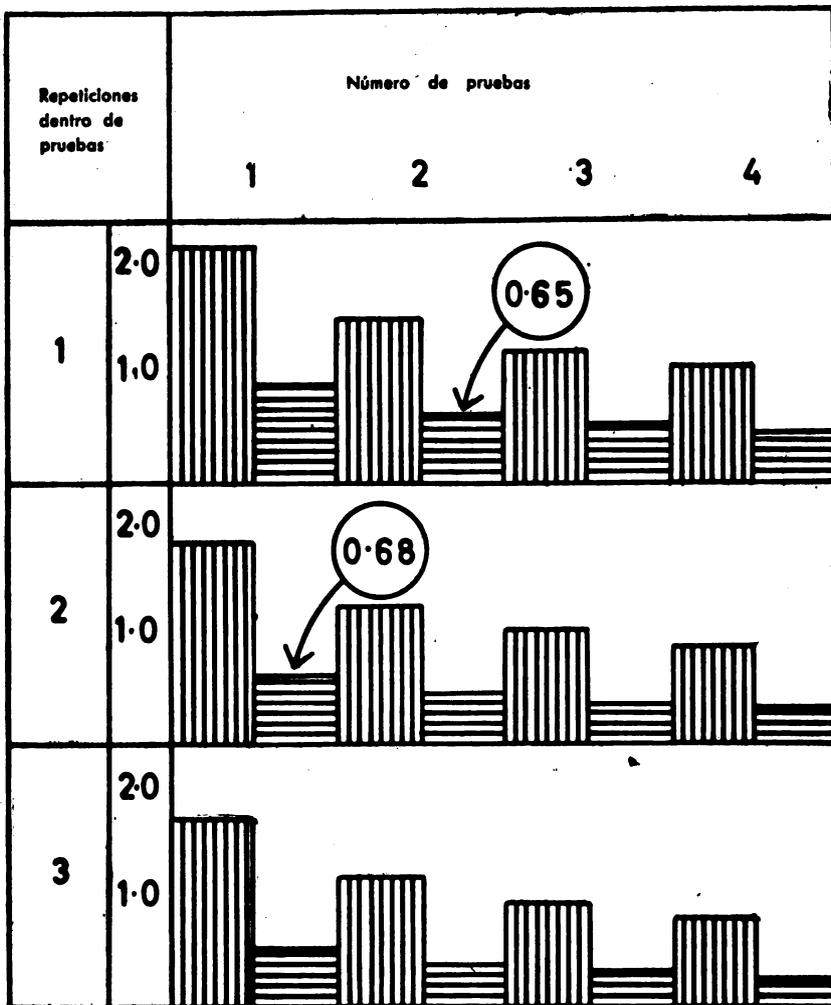
### a) Consideraciones estadísticas y comparación de los errores con los publicados en la literatura.

Los resultados del experimento descrito arriba se sometieron al análisis de variancia, para medir los efectos de muestras, experimentos, interacción muestras x experimentos, bloques dentro de los experimentos y residual. De esta manera, fue posible calcular los errores asociados con los procedimientos analíticos.

Las comparaciones con resultados de la literatura, son difíciles, porque hay variaciones considerables en las formas de expresión y la precisión en el cálculo de los errores. Por esta razón, se trató de realizar la comparación más cercana posible con la prueba de precisión publicada por Baumgardt y Oh (6), para su procedimiento de digestibilidad de la celulosa con licor del rumen, en veinticuatro horas. La esperanza era descubrir el grado de mejoramiento que se obtendría de la aplicación de este procedimiento mucho más complicado. Un resumen de la comparación se presenta en la Figura 33.

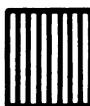
Los niveles de error son apreciablemente menores y se encuentra también que en oposición a lo encontrado por Baumgardt, es menos marcado el beneficio relativo de aumentar la repetición en diferentes corridas, en oposición a aumentar las repeticiones dentro de la misma corrida. La proximidad de los errores en los dos procedimientos analíticos considerados, quiere decir que el procedimiento preferido (duplicación dentro de corrida) puede ser aplicado con confianza, porque el tamaño del error no aumentará considerablemente (de  $\pm 0,65$  a  $\pm 0,68$ ).

Los resultados pueden también compararse con los de otros investigadores que han empleado métodos más complejos. Tilley y Terry (23) encontraron un error dentro de corrida (error standard del promedio de un duplicado) de  $\pm 0,66$  unidades. Una cifra comparable obtenida con los standards en cada experimento fue de 0,39 unidades.



Error standard de la digestibilidad media

24 hr. celulosa



Este artículo



FIGURA N° 33. — Comparación de errores entre determinaciones in vitro simples y complejas.

Desviaciones entre experimentos de  $\pm 0,61$  unidades, las cuales fueron medidas en los standard de 14 experimentos, fueron publicadas anteriormente (2). Esta cifra se compara favorablemente con el valor de  $\pm 1,90$  y  $\pm 2,31$  obtenidos por Tilley y Terry (23) con sus standards individuales y pueden compararse también con los valores de Dent (9), quien indica que su desviación entre experimentos está generalmente entre  $\pm 1,5\%$ .

Los intentos por reducir los niveles de error, por medio del escalonamiento basado en los valores medios encontrados para los standards en las corridas, fue inefectivo. Esto coincide con lo encontrado por Baumgardt y Oh (6).

## 2. Errores de Predicción de los Resultados *in vivo*.

Esta parte del método se probó originalmente (2) empleando gramíneas, leguminosas y henos con los cuales se habían realizado pruebas de digestibilidad en seis diferentes centros. Tomando en cuenta este hecho, los resultados se consideraron satisfactorios (relación para 43 muestras,  $r = 0,96^{***}$ , desviación standard =  $\pm 2,33$ ).

Los resultados de la relación entre digestibilidades *in vitro* e *in vivo*, de la materia orgánica de pastos secos han sido publicados por Armstrong y colaboradores (3). Los resultados obtenidos con 12 pastos (cuatro cortes de ryegrass S.23, dos cortes de ryegrass S.24, tres cortes de pasto ovilla S.37 y tres cortes de pasto tymothy S.48), alimentados a un nivel de dos veces mantenimiento, se presentan en la Figura 34. La elevada precisión ( $r = 0,989$ , error standard =  $\pm 1,53$ ), es sin duda el resultado de la intensidad de repetición en las pruebas *in vivo*. Los resultados *in vitro*, pueden también emplearse para predecir la energía metabolizable de estos forrajes, con elevado grado de precisión (coeficiente de variación de la media =  $3\%$ ). Todas las relaciones son superiores a las que fueran encontradas por Armstrong, basadas en métodos químicos.

### A) Forrajes conservados.

Los cambios en el valor nutritivo que se producen por ciertas condiciones de conservación, como el calentamiento, fermentación y pérdida de elementos nutritivos por lavado en el campo, muy posiblemente hacen que la predicción de su digestibilidad, por simples medios químicos, sea mucho menos adecuada para forrajes conservados que para pastos secos.

A pesar que se había observado anteriormente (2), que la relación *in vitro* - *in vivo* era la misma para henos y pastos, la importancia del problema nos decidió a examinar las relaciones con forrajes conservados en forma más crítica. Trabajos realizados con anterioridad en ensilajes habían sido poco estimulantes.

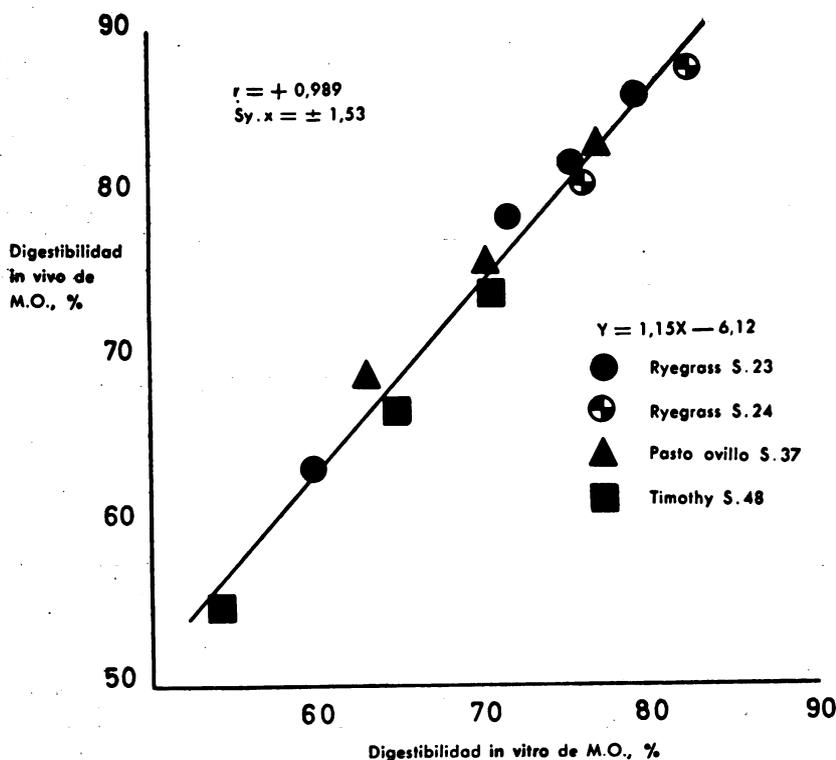


FIGURA N<sup>o</sup>. 34. — Relación entre las digestibilidades in vitro e in vivo en pastos secos

## B) Henos.

Se sometieron a pruebas convencionales de digestibilidad, en duplicado: dos henos formados de mezclas de especies y los cuales se habían sobrecalentado marcadamente en los fardos; un heno secado en el establo, formado de mezcla de especies; y, tras cortes sucesivos de ryegrass italiano, artificialmente secado. En la Figura 35 se presenta la relación de los resultados *in vitro* (promedio de 3 experimentos) con los resultados *in vivo*. La correlación  $r = 0,998$  y la desviación de standard de  $\pm 0,41$ , encontrada en una situación muy forzada por la diversidad de forrajes, justifica este procedimiento en trabajo de asesoría sobre henos y sugiere la posibilidad de emplearlo en estudios sobre pérdidas resultantes de los métodos de conservación.

Se calculó también la relación entre la digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica y la digestibilidad *in vivo* de la energía. La expresión de los resultados en esta forma, no redujo marcadamente la precisión, obteniéndose la relación  $r = 0,996$ , error standard  $= \pm 0,62$ .

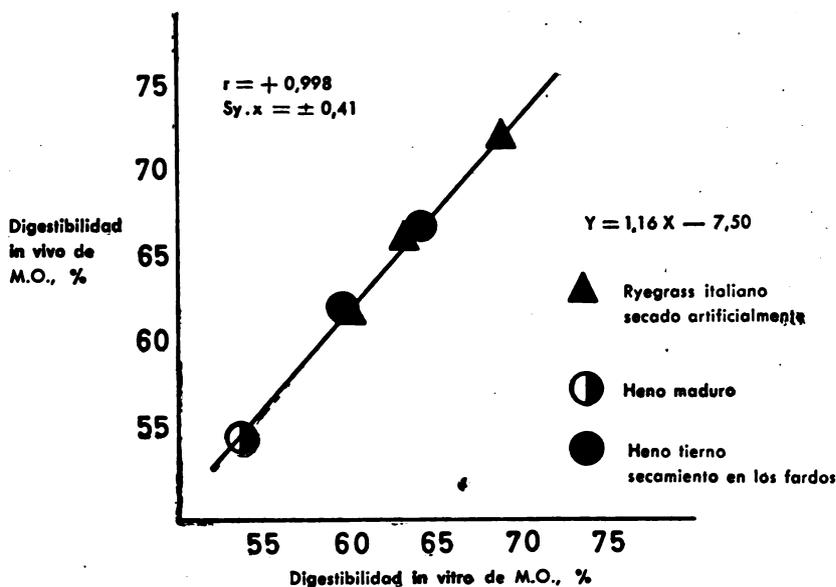


FIGURA N° 35. — Relación entre las digestibilidades in vitro e in vivo en henos y pastos secos.

### C) Ensilajes.

Se seleccionaron 10 ensilajes por tener una amplia variedad en su composición, tipo de fermentación y método de preparación (Cuadro 25).

CUADRO N° 25. — Tipos de ensilaje probados.

Muestra	pH	M. S.	Proteína cruda	Tipo de silo
1	4,30	39,7	11,3	Torre, hermético (B)
2	4,05	29,0	14,7	Torre (R)
3	4,25	21,4	12,7	Cobertizo (R)
4	5,05	15,7	20,5	Trinchera cubierta, cubierta polietileno (D)
5	5,30	19,2	20,6	Doble cuña, cubierto (D)
6	4,40	22,8	15,8	Doble cuña, cubierto (B)
7	3,85	25,9	17,3	Doble cuña, cubierto (B)
8	4,45	15,9	8,3	Trinchera (R)
9	4,40	20,3	17,7	Trinchera - Techo temporal (R)
10	3,70	17,2	10,9	Trinchera (B)

Tipo de fermentación = (B) = Buena, (R) = Recalentado, (D) = Descompuesto

Las pruebas de digestibilidad *in vivo* realizadas en duplicado, dieron como resultado digestibilidades de la materia orgánica entre 60 y 74 %. Los resultados encontrados previamente en este laboratorio sobre valores anormalmente bajos en la digestibilidad *in vitro* de ensilajes, la inferencia de Raymond y Terry (17) sobre los cambios que se producen en el secamiento del ensilaje y la evidencia encontrada en los trabajos de Simkins y Baumgardt (21), introdujeron dudas de que el procedimiento, en la forma empleada para henos y pastos, fuera satisfactorio para ensilajes. En vista de lo anteriormente expuesto, se prepararon los ensilajes para digestibilidad *in vitro*, por cuatro métodos diferentes:

1. Ensilaje fresco picado. Se pesó una cantidad suficiente para digerir 0,5 g de materia seca.

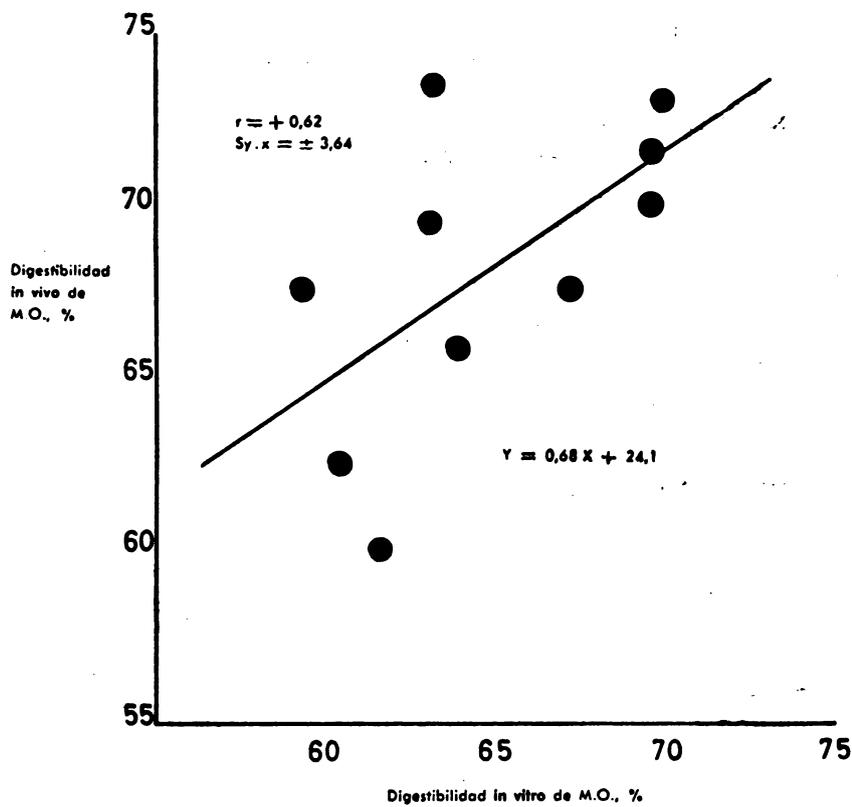


FIGURA N° 36. — Relación entre las digestibilidades in vitro / in vivo de la materia orgánica de ensilajes secados con calor.

2. Ensilaje picado y secado al vacío (casi 20 pulgadas de vacío), a temperatura de 30°C. hasta obtener 8 a 10 % de humedad residual. El material obtenido en esta manera se molió. Se obtuvieron muestras de 0,5 g para digestión *in vitro*. La humedad residual fue determinada separadamente.

3. Secado y molido de acuerdo a la práctica normal. Se obtuvo 0,5 g de la muestra secada al aire para digestión *in vitro*. La humedad residual se determinó separadamente.

4. La materia seca se trató de la misma manera que para los otros forrajes, esto es, se obtuvieron sub-muestras y se secó por segunda vez a 100°C.

Se calcularon los coeficientes de correlación para los cuatro grupos de resultados, junto con sus desviaciones standard residuales. El efecto del secamiento sobre la digestibilidad *in vitro* de los ensilajes, fue confirmado por la relación no significativa con los valores *in vivo* (Figura 36). Como se puede observar en la Figura 37, los ensilajes

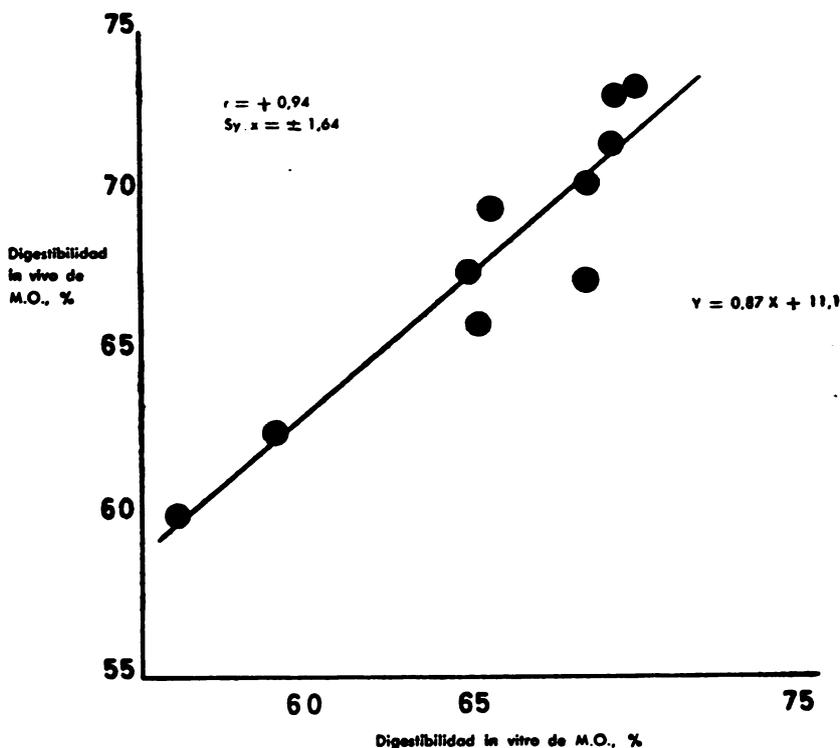


FIGURA N° 37. — Relación entre las digestibilidades in vitro / in vivo de la materia orgánica de ensilajes frescos.

frescos, a pesar de los errores inevitables de pesada, dieron la mejor relación ( $r = 0,94$ , desviación standard =  $\pm 1,64$ ).

Aparte del ensilaje fresco, la única otra relación que parece promisoría es la del ensilaje seco al vacío ( $r = 0,89$ , desviación standard =  $\pm 2,10$ ). Los resultados que se han presentado sobre el alcance de la digestibilidad *in vitro* por el método descrito, puede muy bien extenderse a los ensilajes, pero antes de que el método pueda ser operado como rutina, es necesario desarrollar mejor los procedimientos de preparación de las muestras.

## V. CONCLUSIONES

A pesar de que, los trabajos presentados en este artículo, se refieren a la determinación en gran escala de la digestibilidad *in vitro*, es la esperanza del autor que el principio básico, que ha demostrado ser importante en el establecimiento de esta técnica de laboratorio, tendrá aplicación no solamente en otras versiones del método *in vitro*, si no también en otros campos de la química analítica.

Si se considera el número elevado de muestras con que se trabaja en experimentos de pasturas, no es necesario enfatizar la necesidad de operar en gran escala. Además de esto, como se dijera antes, los estudios sobre metodología requieren de números grandes de muestras. El trabajo en que se basa este artículo, requirió de 5.000 análisis, realizados en aproximadamente ocho meses.

No se pretende sugerir que el procedimiento relativamente complejo descrito, con su énfasis en la máxima precisión analítica y operación continua en gran escala (características necesarias en nuestro laboratorio), sea el tipo de procedimiento para cada caso. A pesar de eso, es deseable tener una capacidad de análisis superior a los requisitos, permitiendo la distribución estacional del trabajo y haciendo así uso más efectivo del personal de laboratorio. Además, reducir la capacidad de producción es más fácil que aumentarla. La simplicidad de conceptos, sugiere muchas posibilidades, para establecer métodos más reducidos empleando equipos de laboratorio más sencillos.

El control satisfactorio de los errores, que se obtiene inclusive al máximo de trabajo, no tendría ningún valor si se redujera el valor productivo del método. Las correlaciones sumamente elevadas con los resultados *in vivo*, obtenidos en un rango muy amplio de forrajes, se consideran como la prueba última de utilidad del método y permite la ampliación de los trabajos, en un grado mayor que lo posible antes, en el campo de la evaluación de forrajes y en estudios de técnicas de conservación.

## AGRADECIMIENTO

El autor desea dejar constancia de su agradecimiento al Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA por el honor de haber sido invitado a preparar y presentar este trabajo.

Se expresa agradecimiento a los Gobernadores, difunto Rector D. S. Hendrie y Dr. F. E. Moon, del West Of Scotland Agricultural College, por su estímulo para iniciar y desarrollar estos trabajos y por la provisión de los elementos físicos necesarios para realizar los experimentos presentados en este trabajo.

El autor desea dejar constancia de su aprecio, por el esfuerzo realizado por los miembros de su laboratorio, en especial la Srta. Mary McGowan, quien contribuyó grandemente al desarrollo del método y organizó el trabajo de laboratorio. El número elevado de muestras que se analizaron, significó una carga extra en el trabajo de los miembros de laboratorio que acompañaron los trabajos, Srta. F. Girvan, Srta. H. Hutton, Sr. A. Ronnay y Srta. E. Tanner.

Se recibió mucha ayuda con los análisis estadísticos, por parte de los miembros de la Unidad de Estadística del A. R. C., Aberdeen y también de Robert Laird Jr., de esta Universidad, para quienes se expresa el agradecimiento del autor.

Se agradece la ayuda de muchas otras personas: E. K. Schofield-Palmer (W. S. A. C.) por su ayuda en la preparación del manuscrito, Srta. J. Crawford y Sra. H. Skinner (W. S. A. C.) por la escritura del manuscrito, W. Boning (W. S. A. C.) por sus consejos respecto a los equipos eléctricos y a W. S. Slattery (S. & J. McDowall Ltd. Ayr) por la fabricación de equipos según diseño.

## LITERATURA CITADA

1. ALEXANDER, R. H. y MCGOWAN, MARY. A Filtration Procedure for the "In Vitro" Determination of Digestibility of Herbage. *Journal of the British Grassland Society* 16 (4): 275. 1961.
2. ALEXANDER, R. H. y MCGOWAN, MARY. The Routine Determination of "In Vitro" Digestibility of Organic Matter in Forages — An Investigation of the Problems Associated with Continuous Large-Scale Operation. *Journal of the British Grassland Society* 21 (2): 140-147. 1966.
3. ARMSTRONG, D. G., ALEXANDER, R. H., MCGOWAN, MARY. The Use of "In Vitro" Digestibilities of Dried Grass for the Prediction of their Energy Values for Ruminants. *Proceedings of the Nutrition Society* 23(2):26. 1964.
4. BARNES, R. F. Use of "In Vitro" Rumen Fermentation Techniques for Estimating Forage Digestibility and Intake. *Agronomy Journal* 57 (2): 213-216. 1965.
5. BAUMGARDT, B. R., TAYLOR, M. W., CASON, J. L. Evaluation of Forages in the Laboratory II. Simplified Artificial Rumen Procedure for Obtaining Repeatable Estimates of Forage Nutritive Value. *Journal of Dairy Science* 45 (1): 62-68. 1962.

6. BAUMGARDT, B. R., OH, H. K. Evaluation of Forages in the Laboratory IV. Within and Among Trial Variability of the Wisconsin Artificial Rumen Procedure. *Journal of Dairy Science* 47 (3): 263-266. 1964.
7. BEZEAU, L. M. Effect of Source of Inoculum on Digestibility of Substrate in "*In Vitro*" Digestion Trials. *Journal of Animal Science* 24 (3): 823-825. 1965.
8. BLAXTER, K. L. The Utilization of the Energy of Grassland Products. Proceeding 8th. International Grassland Congress, Reading. 1960.
9. DENT, J. W. Applications of the Two-Stage "*In Vitro*" Digestibility Method to Variety Testing. *Journal of the British Grassland Society* 18 (3): 181-188. 1963.
10. DONEFER, E., CRAMPTON, E. W. LLOYD, L. E. Prediction of the Nutritive Value Index of a Forage from "*In Vitro*" Rumen Fermentation Data. *Journal of Animal Science* 19 (2): 545-552. 1960.
11. HUNGATE, R. E. The Anaerobic Mesophilic Cellulolytic Bacteria 1. The Isolation Technique. *Bacteriological Review* 14: 1-49. 1950.
12. MARSTON, H. R. The Fermentation of Cellulose "*In Vitro*" by Organisms from the Rumen of Sheep. *Biochemistry Journal* 42: 564-574. 1948.
13. McDOUGALL, E. I. Studies on Ruminant Saliva. 1. The Composition and Output of Sheep's Saliva. *Biochemistry Journal* 43: 99-109. 1948.
14. QUICKE, G. V., BENTLEY, O. G., SCOTT, H. W., MOXON, A. L. Cellulose Digestion "*In Vitro*" as a Measure of the Digestibility of Forage Cellulose in Ruminants. *Journal of Animal Science* 18 (1): 275-287. 1959.
15. RAYMOND, W. F., JONES, E. C., HARRIS, C. E. Factors Affecting the Accuracy of Normal-Acid Fibre Determinations, and its use as a Faecal Index Component. *Agricultural Progress* 30: 120-124. 1955.
16. RAYMOND, W. F., SPEDDING, C. R. W. The Effects of Fertilizers on the Nutritive Value and Production Potential of Forages. *Proceedings of the Fertilizers Society* 88: 5-19. 1965.
17. RAYMOND, W. F., TERRY, R. A. Studies of Herbage Digestibility by an "*In Vitro*" Method. *Outlook on Agriculture* 5 (2): 60-68. 1966.
18. Research Techniques in Use at the Grassland Research Institute, Hurley, Preparation of Dried Samples for Chemical Analysis. *Commonwealth Agricultural Bureau Bulletin* 45, pp. 131-142. 1961.
19. ROGERS, H. H., WHITMORE, E. T. A Modified Method for the "*In Vitro*" Determination of Herbage Digestibility in Plant-Breeding Studies. *Journal of the British Grassland Society* 21 (2): 150-152. 1966.
20. SHELTON, D. C., REID, R. L. Measuring the Nutritive Value of Forages Using "*In Vitro*" Rumen Technique. *Proceeding 8th. International Grassland Congress, Reading* 524-528. 1960.
21. SIMKINS, K. L., BAUMGARDT, B. R. Evaluation of Forages in the Laboratory III. Comparison of Various Methods for Predicting Silage Digestibility. *Journal of Dairy Science* 46 (4): 338-340. 1963.
22. TILLEY, J. M. A., DERIAZ, R. E. TERRY, R. A. The "*In Vitro*" Measurement of Herbage Digestibility and Assessment of Nutritive Value. *Proceeding 8th. International Grassland Congress, Reading* 533-537. 1960.
23. TILLEY, J. M. A., TERRY, R. A. A Two-Stage Technique for the "*In Vitro*" Digestion of Forage Crops. *Journal of the British Grassland Society* 18 (2): 104-111. 1963.
24. TILLEY, J. M. A., TERRY, R. A., DERIAZ, R. E., OUTEN, G. E. Studies of Herbage Digestibility Using the "*In Vitro*" Method. *Experiments in Progress at the Grassland Research Institute* 16: 64-65. 1962-1963.
25. WATSON, S. J., HORTON, E. A. Composition Digestibility and Nutritive Value of Samples of Grassland Products. *Journal of Agricultural Science, Cambridge* 24 (part 1): 143-154. 1936.

## APENDICE

### Circuito de control empleado para asegurar la adición de pepsina (Figura 29)

La rueda excéntrica, localizada en la base de los electrodos, cierra la micro-llave ( $S_1$ ) cuando se coloca el tubo sobre los electrodos. Esta acción tiene dos efectos separados:

1. Se cierra el relay  $R_2$ , abriendo así los contactos  $R_2 C_1$ , desarmando el circuito de la campana.

2. El capacitador  $CP_1$ , pasa momentáneamente corriente por los contactos  $R_3 C_1$ , produciendo el cerramiento y clausura del relay  $R_3$ , como resultado de la demora ocasionada por el capacitador  $CP_3$ , armando así la campana por cerramiento de los contactos  $R_3 C_2$ .

En el caso de que no se agregue la pepsina, la apertura de la micro llave  $S_1$ , al quitar el tubo de la base del electrodo, permite la apertura del relay  $R_2$  armando la campana a través de los contactos  $R_2 C_1$  y  $R_3 C_2$ . La adición de la pepsina por medio de la jeringa automática (Zipette) abre momentáneamente la micro llave  $S_2$ , quitando la clausura del relay  $R_3$ , el cual se abre nuevamente desarmando el circuito de la campana, por apertura de los contactos  $R_3 C_2$ .

## DISCUSION DEL TRABAJO PRESENTADO POR EL SR. R. H. ALEXANDER

Encargado de abrir la discusión fue el Dr. JOHN V. BATEMAN, Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, Turrialba, Costa Rica.

J. V. BATEMAN:

El Sr. Alexander ha descrito los sistemas empleados en la conversión de un método de laboratorio, para ser usado en forma rutinaria con un número grande de muestras. El estudio extenso realizado por el Sr. Alexander (sobre 5000 análisis), es un buen ejemplo del trabajo que se debe hacer con algunos de nuestros métodos de laboratorio, para manejar el volumen de muestras necesario para resolver los problemas en estudio. Su sistema, incluye también equipo que puede ser construído con cantidades limitadas de dinero y materiales disponibles. Esto es doblemente importante en Latinoamérica, en que tenemos tantos problemas con las importaciones.

Los métodos empleados por el Sr. Alexander para modificar el método original de Tilley, han despertado mi interés, porque creo que un método de laboratorio es potencialmente limitado, hasta cuando se ha establecido para su uso con personal de laboratorio medianamente capacitado.

Independiente del hecho de que se adopte o no, el método *in vitro* propuesto, el cuidado con que cada uno de los pasos y modificaciones fueron probados, debe servir como ejemplo cuando se proponen modificaciones a un método de investigación existente.

En mi experiencia, hay dos tipos de modificaciones que se producen en los métodos de laboratorio. El primero, es de modificaciones intencionales. El Sr. Alexander nos ha provisto con un ejemplo de la forma como resolverlo. El segundo tipo, es aquel que se desliza en la técnica, debido a la falta de cuidado, sea porque se cree que estando bien familiarizado con la técnica no es necesario el realizar comprobaciones rutinarias o simplemente por descuido. Estas modificaciones inadvertidas, son frecuentemente difíciles de determinar. Es evidente que el Sr. Alexander ha pensado también en este tipo de modificación.

Se mencionó la adaptación de sistema de seguridad para mantener la precisión del método, pero se dijo muy poco sobre el entrenamiento de asistentes, o lo que es más importante, la forma de asegurarse que

ellos siguen la técnica, en la forma descrita. Espero que este punto se tratará en la discusión.

Con un método que permite el proceso de un número tan grande de muestras, parecería fácil incluir, como controles, varias muestras de digestibilidad conocida. Me gustaría preguntar al Sr. Alexander, su opinión sobre el valor de éstas muestras como controles.

#### R. H. ALEXANDER:

1. Una parte importante del proceso de entrenamiento del personal, es despertar su interés en el trabajo a realizarse. Con este objetivo, se les explica al máximo posible, los detalles de la técnica analítica y el valor de los resultados obtenidos.

En el caso del trabajo *in vitro*, hemos visto que es útil nombrar a una de las ayudantes, como responsable para una de las corridas. Esta ayudante realiza, en esa corrida, las manipulaciones más importantes y es ayudada por las otras. En esta forma se mantiene el interés por desempeñarse lo mejor posible.

Se da a los ayudantes, buen entrenamiento básico sobre los procesos de manipuleo y se trata de demostrar la influencia de las técnicas defectuosas sobre los resultados, por medio de experimentos diseñados específicamente para este propósito.

2. Se debe establecer primero la relación *in vivo* / *in vitro*, antes de que se pueda emplear los resultados obtenidos para propósitos de evaluación. Los métodos *in vitro*, pueden ser complejos y largos y la falta de standards de digestibilidad conocida, no debe ser una barrera para comenzar los estudios iniciales y para establecer la técnica. Se puede adelantar mucho trabajo, con la técnica y en calcular los errores analíticos antes de introducir los standards. Esto es cierto, solamente cuando se introducen solo pequeñas modificaciones a los métodos establecidos. Si se prueba sistemas completamente nuevos, es preciso realizar las comprobaciones del valor de predicción en primera instancia.

Cuando se han establecido las relaciones con los valores *in vivo* y la técnica está totalmente establecida, es posible operar el sistema con standards de digestibilidad *in vivo*, desconocida, empleando estas muestras como índice de estabilidad y por tanto economizando el material de valor *in vivo* conocido, que puede ser limitado.

#### L. VERDE:

1. ¿Cree necesario que el licor del rumen provenga de más de un animal para evitar la variación entre animales?

2. ¿Habría inconveniente en usar licor del rumen de novillos?

**R. H. ALEXANDER:**

1. Los experimentos que hemos realizado indican muy poca variación entre animales y además que no hay incompatibilidad entre los licores de diferentes animales.

2. Se precisa disponer de novillos con fistulas grandes, para preparar el extracto de rumen, en los sistemas que miden la velocidad de digestión *in vitro*. Cuando se somete a digestión por períodos más largos, la preparación del inóculo es menos crítica y en ese caso se puede obtener el licor del rumen filtrado, de ovinos o vacunos.

**P. PRESTES:**

¿Por qué razón emplea el Sr. Alexander sulfato de amonio, en lugar de urea, en el inóculo?

**R. H. ALEXANDER:**

Los trabajos originales de Marston, indicaban el uso de sulfato de amonio (0,02 M). Otros investigadores emplean urea (Baumgardt). La conclusión sería que, se puede emplear satisfactoriamente cualquiera de las dos fuentes de nitrógeno.

**J. LOPEZ:**

¿Cómo se transporta y guarda el ensilaje enviado por los agricultores?

**R. H. ALEXANDER:**

El tamaño de las muestras es el mínimo, para transportarlas en bolsas de polietileno de medida 500. Se obtiene una muestra adecuada del ensilaje empleando un saca-bocado diseñado por nosotros. Se toman de 1 a 4 muestras, en el punto medio de cada mitad de dos diagonales horizontales trazadas sobre la trinchera. El saca-bocado se introduce a 1,8 m. de profundidad; cada muestra extraída con el saca-bocado pesa aproximadamente 750 g.

**N. ABIUSSO:**

¿Qué otros criterios (análisis químicos, etc.) emplea, además de la digestibilidad *in vitro*, para establecer la calidad del heno o ensilaje?

**R. H. ALEXANDER:**

Los estudios de digestibilidad *in vitro* en el ensilaje, son todavía preliminares. Esperamos, sin embargo, introducir pronto este método en nuestro trabajo de asesoría.

Los análisis comunes en ensilaje son: materia seca (estufa a 100°C), proteína cruda determinada en la muestra fresca, y pH del jugo. En henos, determinamos materia seca, proteína cruda y digestibilidad *in vitro*.

**P. HIRSCH-REINSHAGEN:**

1. ¿Cómo lavan el electrodo luego de medir el pH?
2. ¿Extraen el aire de las bolsas que contienen las muestras de ensilaje, antes del transporte?

**R. H. ALEXANDER:**

1. El electrodo y el mezclador se lavan con agua tibia (alrededor de 40°C). Empleando el mínimo posible de agua no hemos encontrado ningún problema.
2. Se saca a mano, el máximo de aire de las bolsas, antes de sellarlas.

**E. VONESCH:**

Cree el Sr. Alexander justificado fortificar el licor del rumen con vitaminas, minerales, etc.?

**R. H. ALEXANDER:**

Los resultados obtenidos por Quicke y Tilley, además de los obtenidos en nuestro laboratorio, indican que el licor del rumen no requiere otra suplementación que Nitrógeno.

**J. J. PARODI:**

Para analizar muestras de forraje fresco, ¿qué cantidad requieren y cómo vienen éstas?

R. H. ALEXANDER:

En nuestro laboratorio, no analizamos muestras de forraje fresco de los productores, en vista de los errores envueltos en el muestreo. Cuando se trabaja con forraje fresco, se lo trata de la misma manera que el ensilaje, pero se emplean muestras más grandes (1.300 a 1.800 g.).

A. DAVIDOVICH:

En el método de Tilley y Terry, se empleaba cloruro de mercurio para detener la acción de los microorganismos, ¿por qué razón han eliminado este paso?

R. H. ALEXANDER:

Tilley, empleaba cloruro de mercurio para obtener una mayor precisión, en el tiempo de incubación con el licor del rumen. En nuestro método, con la adición de ácido clorhídrico, no se produce ninguna imprecisión en el tiempo de incubación.

A. E. STEVENSON:

1. ¿Cuánto espacio de mesas se requiere para un sistema de 300 muestras semanales?
2. ¿El trabajo *in vitro* se realiza en un laboratorio por sí solo, o forma parte del laboratorio general?
3. Me parece que al realizar una sola corrida semanal de 300 muestras, se corre peligro de perder mucho trabajo si algo inesperado sucede. ¿Cuál es la ventaja de este número sobre dos corridas de 150 muestras cada una?

R. H. ALEXANDER:

1. El trabajo se realiza en un espacio de mesa de 60 a 75 cm.
2. Se hace uso común de las balanzas, estufas y muflas del laboratorio general, sin embargo, debido a la precisión requerida en el tiempo, se da prioridad al trabajo *in vitro*.
3. Con el método de dos fases descrito, no es posible realizar dos corridas por semana. En realidad, aumenta el riesgo de perder un número grande de muestra en caso de una emergencia, como corte de la corriente eléctrica o ruptura de un termostato, pero se ahorra en el empleo de standards.

#### H. LARSEN:

1. ¿Cuál es el porcentaje de muestras que Uds. reciben de los productores?

2. ¿Cómo emplean los resultados obtenidos y cuál es el tipo de recomendaciones que hacen al agricultor?

#### R. H. ALEXANDER:

1. Aproximadamente 20 %, entre henos y ensilajes.

2. Para asesoría se expresa el valor nutritivo de las muestras en términos de la Energía Metabolizable. Empleamos las ecuaciones de regresión derivadas por el Dr. Armstrong (anteriormente del Hannah Dairy Research Institute). Usando los principios derivados por el Dr. Blaxter, se llega a un valor de 1/2 el requisito de mantenimiento de Energía Metabolizable, el cual se da a conocer al productor.

#### H. CABALLERO:

1. ¿Se ha realizado algún intento de standardizar el tipo de muse-lina que debe emplearse para filtrar el licor del rumen?

2. ¿Podría darnos algunos detalles adicionales, sobre la manera de preparar las muestras de ensilaje fresco para el análisis *in vitro*?

#### R. H. ALEXANDER:

1. No hemos estudiado este aspecto de la técnica, pero cremos importante que se emplee siempre el mismo procedimiento.

2. Las muestras se muelen (molino, Crypto Ltd., N. Circular Road, London - modelo AC. 22). Se determina la materia seca del ensilaje, de tal manera que se pueda calcular la cantidad de material necesaria para dar 0,5 g. de materia seca. Las muestras se colocan en los tubos de digestión, se cierran con tapones y se guardan a 0° F, hasta el momento de comenzar el análisis.

#### A. FRONTERA:

¿Cuál es la desviación del valor real del standard que se acepta para corregir toda la corrida?

**R. H. ALEXANDER:**

A pesar de que se encuentra alguna desviación entre experimentos, se ha demostrado que las muestras no se desvían en la misma proporción. Los resultados del trabajo estadístico, del experimento que realizamos para estudiar la precisión del método, confirmaron las observaciones de Baumgardt, que el uso de standards para corregir es inefectivo a los niveles de desviación encontrados.

## INDICE DE AUTORES

- ALEXANDER, R. H. (28) (143) 8, 11, 106, 107, 112, 117, 126, 128, 131, 137.  
 ALDER, F. E. (95) 68.  
 ALDRICH, D. T. A. (28) 22.  
 ARMSTRONG, D. G. (28) (143) 8, 11, 106, 131, 137.  
 ARNOLD, G. W. (92) 70, 72, 73, 74, 77, 79, 81, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91.  
 BALCH, C. C. (28) (52) 17, 50, 91.  
 BALL, J. (93) 83, 85, 87, 89, 90.  
 BARNES, R. F. (28) (52) (143) 6, 50, 51, 104, 131.  
 BAUMGARDT, B. R. (143) (144) 110, 117, 120, 135, 137, 140.  
 BEZEAU, L. M. (144) 110.  
 BENTLEY, O. G. (144) 109.  
 BIGSBY, F. W. (53) 51.  
 BLAND, B. F. (28) 22, 24.  
 BLAXTER, K. L. (28) (29) (143) 11, 17, 44, 47, 50, 104.  
 BOHMAN, V. R. (94) 91.  
 BRIGGS, P. K. (28) 12, 13.  
 BURK, A. (53) 50.  
 BUSH, I. G. (93) 77, 79, 83, 85, 87, 89, 90, 91.  
 CAMPLING, R. C. (28) (52) 17, 50.  
 CARTER, A. H. (93) (94) 67, 70, 72.  
 CASON, J. L. (143) 110, 117, 120.  
 CHENOST, M. (52) 52.  
 CHRISTIAN, K. R. (93) 67.  
 CLANTON, D. C. (93) 67.  
 CLANCY, M. J. (52) 51.  
 CLARK, B. (53) 6, 25.  
 COOPER, J. M. A. (28) 24.  
 COOK, C. W. (93) 69.  
 CORBETT, J. L. (93) (94) 67, 68, 70, 71, 72.  
 CRAMPTON, E. W. (28) (52) (53) (93) (144) 15, 44, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 53, 83, 107.  
 DEHORITY, B. A. (52) (53) 50, 51.  
 DONEFER, E. (28) (52) (53) (93) (144) 15, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 53, 83, 107.  
 DENT, J. W. (28) (144) 22, 24, 26, 105, 125, 131, 137.  
 DEMARQUILLY, C. (52) 50.  
 DERIAZ, R. E. (29) (53) (95) (144) 7, 47, 104, 106, 128, 129.  
 DUDZINSKI, M. L. (92) (93) 70, 72, 73, 74, 79.  
 ELLIOT, R. C. (93) 67.  
 ENGEL, R. W. (94) 67.  
 FAGAN, T. W. (28) 24.  
 FOKKEMA, K. (93) 67.  
 FOLKINS L. P. (29) 20.  
 GAILLARD, B. D. E. (28) 6.  
 GRAF, G. C. (94) 67.  
 GREENHALGH, J. F. D. (93) 72.  
 GRIMES, R. C. (93) 91.  
 HANDRECK, K. A. (94) 69.  
 HARDISON, W. A. (94) 67.  
 HARRIS, C. E. (29) (95) (144) 18, 23, 24, 25, 26, 70, 71, 104.  
 HARRIS, L. E. (93) 69.  
 HARTSOOK, E. W. (52) 47.  
 HEADY, H. F. (95) 87.  
 HERSHBERGER, T. V. (52) 47.  
 HOGAN, J. P. (28) 12, 13.  
 HOMB, T. (29) 18.  
 HORTON, E. A. (144) 104.  
 HUNGATE, R. E. (144) 103.  
 HUTCHINSON, K. J. (94) 78.  
 JARICE, R. (29) 17.  
 JEFFERS, H. F. M. (53) 50.  
 JENSEN, E. H. (94) 91.  
 JOHNSON, R. R. (52) (53) 50, 51.  
 JONES, E. C. (144) 104.  
 JONES, L. H. P. (94) 69.  
 JONES, H. T. (28) 24.  
 JUNG, G. A. (53) 50.  
 KEMP, C. D. (95) 70, 71.  
 KEMP, A. W. (95) 70, 71.  
 KENNEDY, W. K. (53) (94) 46, 70, 72.  
 KOTHMANN, M. M. (94) 85.

- LAMBOURNE, L. J. (29) (94) 67, 68, 70, 72.  
LANCASTER, R. (94) 70, 72.  
LANGLANDS, J. P. (94) 68, 70, 71, 72, 73, 74, 77, 84, 85, 88, 90, 91.  
LEIGH, J. H. (94) 86.  
LESPERANCE, A. L. (94) 91.  
LINKOUS, W. N. (94) 67.  
LLOYD, L. E. (28) (52) (53) (93) (144) 15, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 53, 83, 107.  
LOFGREEN, G. P. (95) 91.  
LOMBARD, P. E. (95) 91.  
LONG, T. A. (52) 47.
- MADSEN, R. A. (94) 91.  
MARSTON, H. R. (29) (144) 6, 106, 120.  
MAY, P. F. (93) 91.  
MC DONALD, I. (93) (94) 67, 68, 72.  
MC DOUGALL, E. I. (144) 106, 120.  
MC GOWAN, M. (28) (143) 8, 11, 106, 107, 112, 117, 126, 128, 131, 137.  
MC MANUS, W. R. (93) (95) 69, 70, 77, 79, 83, 84, 85, 87, 89, 90, 91, 92.  
MEYER, J. R. (95) 91.  
MILFORD, R. (29) (53) 18, 23, 50.  
MILTHORPE, F. L. (29) 6.  
MINSON, D. J. (29) (53) (95) 17, 18, 23, 24, 50, 67, 68.  
MOXON, A. L. (144) 109.  
MULHAM, W. E. (94) 86.  
MURPHY, R. P. (53) 46.
- NIEMANN, P. J. (52) 51.  
NOTTLE, M. C. (95) 69.
- OH, H. K. (144) 135, 137.  
OSBOURN, D. F. (53) 50.  
OUTEN, G. E. (144) 131.  
OWEN, J. B. (95) 70.
- PAHL, P. J. (93) 87.  
PARSONS, J. L. (53) 50, 51.  
PIGDEN, W. J. (29) 20.  
PRITCHARD, G. I. (29) 20.
- QUICKE, G. V. (144) 109.
- RAYMOND, W. F. (28) (29) (95) (144) 6, 18, 23, 24, 67, 68, 70, 71, 104, 109, 140.
- REARDON, T. F. (94) 67, 68, 70, 72.  
REID, G. W. (94) 67, 68.  
REID, J. T. (53) (93) 46, 63.  
REID, R. L. (29) (53) (144) 6, 12, 13, 50, 110.  
ROGERS, H. H. (144) 125.  
RUDMAN, J. E. (95) 68.
- SCOTT, H. W. (53) (144) 50, 109.  
SHELTON, D. C. (29) (144) 6, 110.  
SIMKINS, K. L. (144) 140.  
SLACK, S. T. (53) 46.  
SPEDDING, C. R. W. (144) 104.  
STEWART, J. (53) 47.  
SULLIVAN, F. T. (29) 66.  
SWIFT, R. W. (52) 47.
- TAYLER, J. C. (29) (95) 68.  
TAYLOR, M. W. (143) 110, 117, 120.  
TERRY, R. A. (28) (29) (53) (95) (144) 7, 8, 9, 10, 11, 19, 20, 21, 24, 47, 50, 73, 104, 105, 106, 107, 109, 112, 114, 125, 128, 129, 130, 131, 135, 137, 140.  
THOMSON, D. J. (29) (53) 23, 50.  
TILLEY, J. M. A. (29) (53) (95) (144) 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 16, 19, 20, 21, 24, 47, 73, 104, 105, 106, 107, 112, 114, 125, 128, 129, 130, 131, 135, 137.  
TORRELL, D. T. (29) (95) 63, 83.  
TRIMBERGER, G. W. (53) 46.  
TROELSEN, J. E. (53) (95) 51, 67, 70.  
TURK, K. L. (53) 46.
- VAN DINE, G. M. (29) (95) 83, 87.  
VAN SCHALKWYK, A. (95) 91.  
VAN SOEST, P. J. (53) (95) 51, 83.
- WAINMAN, F. W. (52) 47, 50.  
WAITE, R. (28)  
WARNER, A. C. I. (29) 6.  
WATKIN, B. R. (93) 91.  
WATSON, S. J. (144) 104.  
WEIR, W. F. (95) 91.  
WHITMORE, E. T. (144) 125.  
WILLIAMS, V. J. (93) 67.  
WILSON, R. S. (52) 47, 50.  
WILSON, R. K. (52) 51.  
WOODMAN, H. E. (53) 47.
- YOUNG, G. A. (53) 6, 25.

## INDICE DE MATERIAS

- Aceites esenciales, consumo de 82.  
 Aceptación del forraje 3, 5, 81.  
 Acidos aminados, consumo de 82.  
 Acidos grasos volátiles  
   efecto de la dieta 17.  
   predicción *in vitro* 17.  
   relación con pH 17.  
 Acidos orgánicos, consumo de 82.  
 Alcaloides, consumo de 83.  
 Alcoholes, consumo de 82.  
 Aldehidos, consumo de 82.  
 Anaerobiosis del sistema 8, 10.  
 Anhídrido carbónico, utilización 107.  
   volumen y velocidad 120.  
 Animales fistulados 83.  
   muertes de 84.  
 Animales donantes 9.  
   alimentación de 109.  
 Arneses, recolección heces fecales 65.  
  
 Brassicas, digestibilidad de 25.  
 Baño María, empleo 122.  
 Bufor, capacidad del sistema 10.  
   tipo empleado 106.  
 Bunsen, válvulas 8, 106.  
  
 Calcio, en forraje consumido 92.  
 Carbonato de sodio 123.  
 Celulosa  
   digestión de 12, 14.  
   indicador, efecto como 70.  
   análisis de 6.  
 Ceniza, forraje consumido 92.  
 Cetonas, consumo de 82.  
 Clones de plantas forrajeras  
   digestibilidad 24.  
 Cobre, indicador fecal 70.  
 Composición botánica de  
   forraje consumido 92.  
 Composición del cuerpo 44.  
 Composición química de  
   forraje consumido 92.  
 Constancia  
   método *in vivo* 10.  
   método *in vitro* 10.  
 Consumo de forraje  
   animales, variación entre 47.  
   digestibilidad y 5, 44, 50.  
   eficiencia de utilización 5.  
   especies, diferencias entre 74.  
   factores que afectan 79.  
   fibra ácida, predicción por 51.  
   masticación, relación con 51.  
   pastoreo, volumen en 79, 84.  
   pastoreo y velocidad de 81.  
   predicción de 64, 73, 74.  
   resistencia eléctrica, relación con 51.  
   velocidad de digestión, relación con 15.  
 Consumo relativo 46.  
   predicción *in vitro* 50.  
   solubilidad de materia seca y 51.  
 Controles, digestibilidad conocida 133.  
 Cromógenos, predicción digestibilidad 69.  
 Cumarina, consumo de 83.  
  
 Dactylis, diferencias entre  
   variedades 22.  
 Dieta consumida en pastoreo  
   condición fisiológica, efecto de 87.  
   edad, efecto de 87.  
   especie, efecto de 87.  
   experiencia previa, efecto de 88.  
   raza, efecto de 87.  
   sexo, efecto de 87.  
   variación entre animales 85.  
   variación entre días 85.  
   variación durante el día 84.  
 Digestibilidad *in vitro* 6.  
   constancia 10.  
   consumo, predicción de 47, 73.  
   demora en comenzar 7, 48.  
   dieta animal, efecto de 10, 109.  
   factores que afectan 7, 10.  
   gaseado superficial, efecto de 120.  
   IVN, predicción de 49.  
   método de dos faces 7, 73, 106, 130.  
   molido, efecto de 112.  
   Nitrógeno, efecto de 12, 110.  
   partes de plantas 19.  
   pH, ajustes de 131.  
   precisión del método 7, 134.  
   propósito del método 3.  
   secamiento, efecto de 114.  
   standarización 10.  
   temperatura incubación 122.  
   validez del método 7, 8, 72.

- Digestibilidad *in vivo* 5.  
constancia de 10.  
estado de madurez, y 6.  
lignina 6, 68.  
métodos químicos, estimación 6.  
nivel de alimentación, efecto 11.  
relación con consumo 5.  
variación 10.
- Digestión  
equipo para *in vitro* 122.  
*in vitro* 122.  
pepsina, acción de 128.  
residuos *in vitro* 125.  
temperatura, efecto 122.  
velocidad de, *in vitro* 48.  
velocidad de, *in vivo* 15.
- Eficiencia conversión 3.  
Energía digerible 44.  
Energía metabolizable 8  
Energía neta 6, 44.  
Ensilaje, digestibilidad 26, 139.  
Equipo *in vitro*  
digestión 122.  
extracción del licor 107.  
gaseado 119.  
medición pH 123.  
inoculación 117.  
molino de muestras 113.  
muestreo 116.  
Equivalentes almidón 3, 6.  
Errores *in vitro* 135.  
Errores predicción digestibilidad 137.  
Esófago  
contracciones 83.  
fistulas (ver *Fistulas, esófago*).  
Extracto etereo, forraje consumido 92.
- Fenoles, consumo 83.  
Fibra cruda, índice fecal 71.  
Filtración  
licor del rumen 107.  
material inerte, para 107.  
residuos *in vitro* 126.  
Fistulas del rumen 6.  
Fistulas del esófago 63, 73, 83.  
éxito operatorio 84.  
pérdida de muestras 89.  
tamaño, efecto del 83.  
tiempo de recolección 84.  
Fitotecnia, empleo del método  
*in vitro* 23.  
Forraje disponible y consumo 79.  
Fósforo, forraje consumido 92.  
Fracción soluble de las heces 71.
- Gaseado  
inóculo para *in vitro* 117, 119.  
tubos para *in vitro* 106, 120.
- Granos, efecto de alimentar con 13.  
Gusto, efecto en consumo 81.
- Heces fecales  
colección total 65.  
muestra del recto 65.  
óxido de cromo 65.  
muestra del suelo 65.
- Hemicelulosa 15.  
Heno, digestibilidad 26, 138.  
Hidratos de carbono solubles  
digestibilidad celulosa, efecto de 12.  
plantas, cambios durante el día 84.  
Hojas, digestibilidad 19.  
Hurley 3, 7, 81.
- Indicadores 70.  
características de 64.  
cromógenos, métodos de relación 69.  
lignina, método de relación 68.  
nitrógeno, índices fecales 65.  
óxido de cromo, indicador fecal 69.  
sílice, método relación 69.
- Indices fecales 64, 70.  
comparaciones 73.  
indicadores 70.
- Incubación  
temperatura de 14.  
tiempo de 14, 106.
- Índice de Valor Nutritivo 5, 46.  
digestibilidad *in vitro*, relación  
con 47.  
solubles en pepsina, ácida, relación  
con 51.  
solubles en ácido sulfúrico, relación  
con 51.
- Inoculación 117.  
Inóculo 10.  
extracción de 107.  
temperatura del 107.  
gaseado de 108, 117.
- Licor del rumen 107.  
equipo para extracción 107.  
filtración 107.  
saturación con CO<sub>2</sub> 107.
- Lignina  
indicador, método relación 68.  
digestibilidad, para predecir 6, 8.
- Mac Dougall, saliva 106.  
Magnesio, indicador 70.  
Maiz, digestibilidad de plantas 25.  
Mantenimiento, requisitos de 3.  
Método de relación 64, 68.  
cromógenos indicador 69.  
lignina, indicador 68.  
sílice, indicador 69.  
Método *in vitro* de dos faces  
(ver *digestibilidad in vitro*)

- Microorganismos del rumen 6  
     (ver también *Inóculo*)  
 Molienda, del forraje 10.  
 Molino de Laboratorio 114.  
     equipo para 113.  
 Muestra  
     análisis, tamaño para 6, 8, 10.  
     equipo para obtener 117.  
     Standard 10.  
 Muestra forraje consumido 69.  
     fistula esófago, comparación con 92  
     composición botánica 92.  
     composición química 92.  
     pérdidas 89.
- NDT 6, 44.  
 Nitrógeno  
     alimento, contenido en 12.  
     forraje consumido, contenido 92.  
     índice fecal 71, 72, 73.  
     inóculo, agregado al 12, 110.
- Olfato 81.  
 Oxido de cromo 65.  
     recobro 65.  
     variación diurna 67.
- Pastoreo  
     consumo forraje 79.  
     velocidad consumo en 80.
- Pepsina ácida 51.  
 Pepsina  
     agregada *in vitro* 107.  
     digestibilidad, acción sobre 7, 128.  
     tiempo incubación *in vitro* 8.
- pH  
     celulosa, efecto sobre digestibilidad  
     12, 14.  
     controles de 8, 10, 107, 123.  
     controles, eliminación de 131, 132.  
     digestión *in vivo* 12.
- Potasio  
     forraje consumido 92.
- Precisión, método *in vitro* 135.
- Predicción de digestibilidad (ver *Di-  
 gestibilidad*).  
 Proteína  
     análisis 6.  
     microorganismos 7.  
     no digerida 7.
- Rebrotos, digestibilidad 23.  
 Regresiones "locales" 72.  
 Residuos *in vitro* 126.  
 Rumen artificial 6, 7 (ver también *Di-  
 gestibilidad in vitro*).
- Saliva  
     artificial 106.  
     contaminación de muestras con 92.  
 Selección de forrajes *in vitro* 21, 23.  
 Secamientos muestras 112, 114, 140.  
 Sílice 69, 70.  
 Sodio en forraje 92.  
 Solubilidad de materia seca  
     análisis, métodos 53.  
     consumo relativo, relación con 50.  
     IVN, relación con 50.  
 Standares de forraje 10.  
 Sulfato de amonio 106.
- Tacto 81.  
 Tallos, digestibilidad 19.  
 Temperatura  
     digestión *in vitro* 8, 106, 114, 122.  
     secamiento de forraje 10.  
     Tiempo de incubación 8, 14.
- Urea 12.
- Vaina de hojas 20.  
 Válvulas Bunsen 8.  
 Variedad de forrajes  
     consumo, diferencias 81.  
     digestibilidad, diferencias 23.  
     estudios *in vitro* 21, 23.  
 Velocidad de digestión 15.  
 Visión 81.

**Comisión del Papel - Edición amparada en el Art. 79 de la Ley 13349**





Serie *monografía*