UTILIZACION DE LA TECNICA DE DIGESTION *IN SITU* PARA LA CARACTERIZACION DE FORRAJES

Francisco Romero[1]

1. Introducción

La técnica de incubación de substratos en el rumen (*in situ*), para el estudio de la degradación de la fibra, fue inicialmente utilizada por Quin *et al.* (1938); ellos usaron bolsas cilíndricas de seda muy fina para medir la digestión de varios alimentos en el rumen de ovejas. Posteriormente la seda fue reemplazada por materiales sintéticos totalmente resistentes a la degradación ruminal; así, Schoeman *et al.* (1972) utilizaron bolsas de poliester y Mehrez y Orskov (1977a) sugirieron la utilización de bolsas de nylon como técnica rutinaria. Actualmente se utilizan las bolsas de dacrón, las cuales son más baratas y de un bajo contenido de nitrógeno (N).

La técnica *in situ* consiste en colocar cierta cantidad de muestra dentro de una bolsa, asegurarse que quede bien cerrada y colocarla en el rumen de animales fistulados por cierto período de tiempo (McQueen *et al.*, 1980). Esta técnica permite determinar simultáneamente la cantidad de muestra que es digerida y la tasa a la cual esta digestión se realiza. Se utiliza principalmente cuando se requiere de información acerca del efecto de las condiciones ruminales sobre la digestión de un número limitado de muestras. Por otro lado, permite mantener constantes las condiciones ruminales y variar los substratos incubados, o variar las condiciones ruminales incubando materiales conocidos (estándares) para determinar el efecto del cambio en el ambiente ruminal sobre la tasa y potencial de degradación de los alimentos.

[1] Ph.D., Producción y Evaluación de Forrajes, Area de Ganadería Tropical, CATIE, Turrialba, Costa Rica.

Copyrighted material

Varios investigadores informan que existe una alta correlación entre los valores de digestibilidad de varios forrajes, encontrados por los métodos *in situ*, *in vitro* e *in vivo* (Barnes, 1973). Así, Burton *et al.* (1967) se basaron en la técnica *in situ* para determinar que el Bermuda Cruza-1 era superior que el Bermuda de la Costa.

Los nuevos sistemas de caracterización de las fracciones nitrogenadas (Orskov, 1970; Satter y Roffler, 1975; Verite *et al.*, 1979) reconocen la importancia de la degradabilidad de la proteína en el rumen. Su determinación permite estimar la cantidad de N disponible para la síntesis de proteína microbial y también la cantidad a ser enzimáticamente digerida y absorbida en el intestino delgado.

Existen dos alternativas para estimar la degradabilidad de materiales en el rumen: el método *in vivo* y el método *in situ*. En el método *in vivo* se requiere de animales fistulados en el rumen o en el intestino delgado, requiriéndose tomar muestras de digesta en estos sitios por períodos largos de tiempo. Además se debe asegurar que la proteína microbial y la proteína proveniente de la dieta sean debidamente separadas. Otro inconveniente del método es que no permite estimar la tasa de degradación de los diferentes materiales en el rumen, la cual es tan importante como la cantidad total que es degrada.

Una de las mayores desventajas en el método *in situ* es la falta de uniformidad con que se ha usado por los investigadores, encontrándose gran variación en los estimados de digestibilidad. Sin embargo, si esta técnica se utiliza cuidadosamente es posible obtener resultados reproducibles, con errores estándares aceptables.

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

Uden y Van Soest (1984) y Nocek (1985) evaluaron las fuentes de variación en la estimación de la digestibilidad de la materia seca (MS) y de la proteína cruda (PC), cuando se utiliza el método *in situ*, encontrando como más importantes:

-Tamaño del poro de la bolsa.
-Tamaño de partícula de la muestra (grado de molienda).
-Relación entre la cantidad de muestra y tamaño de la bolsa.
-Secuencia de introducción de las bolsas al rumen.
-Posición de las bolsas en el rumen
-Tiempo de incubación ruminal de las bolsas.
-Uso de repeticiones.
-Variaciones debidas a períodos y animales.
-Dieta de los animales.

a. Tamaño del poro de las bolsas

Investigaciones llevadas a cabo por Van Hellen y Ellis (1977) utilizando bolsas de 70 milimicras (mμ) mostraron una entrada a la bolsa

Copyrighted material

de 0.27 g de paredes celulares durante 48 horas de incubación. Sin embargo, cuando el tamaño del poro se redujo a 10 mμ la entrada de partículas del líquido ruminal a las bolsas fue despreciable.

Nocek (1985), estudiando dos tamaños de poros diferentes (un aumento de 20 a 40 mμ y otro de 50 a 80 mμ), encontró que, en general, ha medida que se aumenta el tamaño de los poros, la desaparición de MS y de N de harina de soya incubada en el rumen aumenta. Lindberg (1984) encontró que todos los componentes fueron más extensamente degradados a medida que se aumentó el tamaño de los poros (10 *vs*. 36 mμ), pero que los patrones de degradación fueron semejantes.

Van Soest (1983) sugiere que el tamaño óptimo de los poros está alrededor de 30 mμ, ya que poros más pequeños retardan la entrada de microorganismos e inhiben una óptima fermentación, mientras que poros más grandes permiten la entrada de pequeñas partículas lignificadas que distorsionan los resultados.

b. Area superficial de la bolsa

Varios investigadores han examinado la importancia de la relación entre la cantidad de muestra en la bolsa y el tamaño de la misma. Así, se ha encontrado que al aumentar la cantidad de muestra de 6.5 a 50 mg/cm² de bolsa se disminuye la digestibilidad de la pared celular de pasto Guinea (*Panicum maximum*) de 54 a 38% (Uden y Van Soest, 1984). Similarmente, Nocek (1985) encontró que la desaparición de la MS puede reducirse 3 unidades porcentuales cuando la relación entre peso de la muestra y tamaño de la bolsa aumenta de 9.2 a 20.3 mg/cm² y reducciones de hasta 8 unidades de porcentaje cuando se aumentó de 18.3 a 32.7 mg/cm². Esto confirma aseveraciones hechas por Bullis *et al.* (1967) y Tomlin *et al.* (1967), en el sentido de que a medida que aumenta el peso de la muestra, en bolsas de tamaño constante, disminuye la digestibilidad a diferentes períodos de incubación. En general, se recomienda una relación de 10 mg/cm² para estudios con forrajes (Van Hellen y Ellis, 1977).

Según Van Soest (1983), es deseable que se mantenga una amplia relación entre el peso de la muestra y el tamaño de la bolsa porque contribuye a minimizar la variación de los resultados. Así mismo, la cantidad de muestra que recomienda para trabajar con forrajes es de alrededor de 8 g, lo que permite tener suficiente material residual en las bolsas, después de incubaciónes de 48 a 72 h, para efectuar análisis de laboratorio.

c. Efecto del tamaño de partícula de la muestra

La preparación de muestras para incubación debe ser tal que el material a incubar realmente represente la forma física del material en el rumen, luego de ser consumido por el animal. La preparación ideal sería utilizar muestras colectadas de animales fístulados al esófago, las cuales ya han

Copyrighted material

sido debidamente masticadas (Bailey, 1962).

A medida que disminuye el tamaño de partícula, la desaparición, tanto de la MS como del N, y ésta es mayor cuando se pulveriza el material. Las diferencias más grandes en desaparición de los materiales ocurren durante las primeras horas de incubación ruminal (Weakley *et al.*, 1983). Cribas menores que 2 mm no deberían utilizarse ya que al disminuir tanto el tamaño de las partículas se incrementa el área de exposición del material al líquido ruminal, aumentando así las posibilidades de ataque por los microorganismos ruminales; todo esto conduciría a una sobrestimación del valor de digestibilidad (Uden y Van Soest, 1984). Adicionalmente, se ha encontrado que con partículas menores de 0.6 mm las partículas tienden a agruparse (formar "clumps"), cuya parte central no se ve expuesta al líquido ruminal, reduciéndose así la degradación del substrato (Figroid *et al.*, 1972).

Orskov (1982) sugiriere que las pajas y henos se muelan con una criba de 2.3-3.0 mm. Materiales frescos, como forrajes y ensilajes deberían macerarse hasta un tamaño de 5.0 mm. Suplementos proteicos secos no deberían molerse.

d. Secuencia de introducción de las bolsas al rumen

La introducción simultánea de todas las bolsas puede aumentar la variación entre réplicas, especialmente cuando se estudian tasas de degradación. Es común que las bolsas se enreden entre sí dentro del rumen y que, para sacar aquellas con períodos cortos de incubación, se tenga que sacar todas las bolsas, interrumpiéndose temporalmente la fermentación en aquellas con períodos de incubación más largos. Al respecto, Nocek (1985) sugiere introducir las bolsas a diferentes intervalos de tiempo, de acuerdo con las horas de incubación que se desee estudiar, y sacar todo el grupo al mismo tiempo, con el fin de disminuir la variación encontrada entre réplicas.

Otro factor importante es el lavado de las bolsas. Es difícil aplicar el mismo tratamiento de lavado a todas las bolsas, cuando éstas se sacan individualmente a diferentes tiempos. Cuando todas se sacan simultáneamente, el lavado es más homogéneo y además está sujeto a menos variación debido a la fatiga del investigador. Se sugiere el uso de un lavado mecánico con tiempos fijos para que todas las muestras de diferentes corridas tengan el mismo tratamiento.

e. Tiempo de incubación

La medición de la tasa de degradación ruminal requiere de tiempos de incubación mayores a los normalmente empleados cuando sólo se quiere relacionar la desaparición de MS de las bolsas con la digestibilidad aparente del alimento (Orskov *et al.*, 1980). El tiempo necesario para medir la tasa de degradación varía en función del material que se está evaluan-

Copyrighted material

la tasa de degradación varía en función del material que se está evaluando, por lo que no se puede generalizar un tiempo máximo de incubación, ni tiempos intermedios. Sin embargo, es importante incluir suficientes observaciones en la parte más sensitiva de la curva de degradación y poner sólo las observaciones necesarias que permitan describir bien la parte asíntota, que representa el potencial de degradación.

El mejor período de incubación para predecir la digestibilidad depende de la forma de la curva de degradación. Faria y Huber (1984), trabajando con henos de alfalfa y ensilaje de maíz encontraron una correlación de 0.82 y 0.59 entre sus estimados de digestibilidad *in vitro* de la MS y los estimados por el método *in situ* a 48 h y 72 h de incubación, respectivamente. Rodríguez (1968) encontró grandes variaciones entre bolsas y entre animales asociadas con tiempos cortos de incubación. Estas variaciones se redujeron a medida que las incubaciones fueron mayores que 24 h. McQueen *et al.* (1980) obtuvieron resultados similares y, además encontraron una importante reducción en la variación obtenida en la digestibilidad de la MS cuando incubaron las muestras 72 h en lugar de 48 h.

En forma general se podría decir que los concentrados requieren de 12 a 36 h de incubación; henos, pajas y otros materiales fibrosos requieren de más de 36 h. Para muchos suplementos proteícos incubaciones de 2, 4, 6, 12 y 24 h es adecuado. En el caso de forrajes tropicales los períodos de incubación deben ser superiores a 48 h (Orskov, 1982). Para leguminosas herbáceas (Arachis y Alfalfa 77) y leguminosas árboreas (*G. sepium* y *E. berteroana*) es sufuciente con 48 h de incubación (Romero, 1985; CATIE, 1987).

f. Posición de la bolsa en el rumen

Balch y Johnson (1950) y Van Soest (1983) indicaron la ventaja de controlar la posición de las bolsas dentro del rumen, y que el mejor sitio de colocación es el saco ventral donde la fermentación es más rápida. Sin embargo, otros investigadores no encontraron ningún efecto de la posición de las bolsas dentro del rumen sobre la degradabilidad de varios alimentos (Mehrez y Orskov, 1977b).

La mayoría de los investigadores que trabajan con ésta técnica recomiendan que las bolsas se amarren a la cánula con un hilo de nylon de 25 cm en ovejas y de 50 cm en bovinos (Orskov, 1982). Esto permite a las bolsas moverse libremente en las fases líquidas y sólidas del rumen. Al respecto, Rodríguez (1968) encontró que la variación entre bolsas se redujo cuando éstas se ataron a un hilo de 50 cm en lugar de 30 cm, indicando que el mayor movimiento disminuyó el efecto de variaciones en el ambiente ruminal.

Copyrighted material

g. Variación en el tiempo y entre animales

Van Keuren y Heinemann (1962) no encontraron diferencias importantes entre días cuando heno incubaron heno de alfalfa por cinco días consecutivos. Sin embargo estudios realizados por Mehrez y Orskov (1977a) demostraron que la principal fuente de variación para la desaparición de la MS de las bolsas fue la debida a animales, en este caso ovejas (6.2% del promedio), seguida por la variación encontrada entre días (4.9%). La menor variación encontrada fue aquella entre bolsas (3.2%) que fueron incubadas juntas y removidas del rumen al mismo tiempo.

Orskov y Mehrez (1977) calcularon que una muestra que se repite dos veces en el tiempo, en el mismo animal (2 períodos), y utilizando tres animales simultáneamente, es un método conveniente para obtener resultados confiables (variación del promedio de 3.43%). El adicionar una oveja más al experimento resultó en una variación del promedio de 3.19%, pero esto significa un mayor uso de recursos en términos de animales y de incubaciones.

La variación del promedio se calculó de la siguiente manera:

$$\frac{V_B + (b+V_D) + (b \times d \times V_A)}{b \times d \times a}$$

donde,

V_B, V_D y V_A = Variación de los promedios de bolsas, días y animales, %

b, d, a = Número de bolsas, días y animales.

McQueen *et al.* (1980) encontraron que, en vacas fistuladas, los resultados eran suficientemente confiables cuando se incubaban simultáneamente dos bolsas por vaca; el error estándar fue de 0.8% y 1.0% para la digestibilidad promedio de la MS y de la pared celular, respectivamente. En este mismo estudio, se logró reducir el error estándar del promedio a 0.3% para la digestibilidad de la MS y de la pared celular, utilizando cuatro vacas, tres bolsas y dos períodos.

h. Número de bolsas

Cuando se utilizan ovejas se pueden utilizar hasta nueve bolsas siempre y cuando el diámetro interno de la cánula sea de 40 cm (Orskov *et al.*, 1980). Romero *et al.* (1987) utilizaron 18 bolsas en vacas Holstein, sin encontrar ningún problema; para ello, introdujeron las bolsas en forma secuencial, atadas a lo largo de una cadena de 30 cm de largo, la cual a su vez fue atada a la cánula con un cordón de nylon.

i. Efecto de la dieta

La dieta de los animales fistulados puede tener un efecto importante sobre la tasa de degradación del ma-

Copyrighted material

terial que se está evaluando. Sin embargo, existen resultados contradictorios sobre el efecto de la dieta en la desaparición de la MS y la PC de bolsas incubadas *in situ*. Así, Romero *et al.* (1987) encontraron que la tasa de degradación de la MS de alfalfa fue 10.5 % superior cuando se alimentaron vacas con heno de maní que cuando éstas recibieron 70% de concentrado y 30 % de heno de maní. Por otro lado, Weakley *et al.* (1983) encontraron una disminución en la desaparición de MS y PC a medida que aumentaron los niveles de heno de alfalfa en la dieta de 20% a 80%. Ganev *et al.* (1979) también encontraron que la tasa y potencial de degradación de la PC dependía de la dieta basal del animal.

Owens y Zinn (1982) y Orskov (1982) postularon que las diferencias en la tasa de degradación de las proteínas de origen vegetal, resultantes del uso de diferentes tipos de dieta, son debidas a diferencias intrínsicas en su contenido de fibra. El material celulolítico podría proteger más a las proteínas cuando se alimenta con una dieta basada en concentrados, que con una de forrajes. Weakley *et al.* (1983) sugieren la existencia de fuerzas abrasivas y diferencias de presiones que podrían ayudar a mantener limpios los poros de bolsas que son incubadas en el rumen de animales alimentados con sólo forrajes (resultando en una mayor degradación de la MS y la PC), que bolsas que se incuban en un medio ruminal más líquido, como ocurre con dietas basadas en concentrados.

En contraste con lo anterior, otros investigadores no han encontrado ningún efecto de la dieta sobre la degradación de la MS o la PC en el rumen. (Faria y Huber, 1984; Figroid *et al.*, 1972; Schaibly y Wing, 1974).

3. Referencias

BAILEY, C. B. 1962. Rates of digestion of swallowed and unswallowed dried grass in the rumen. Canadian Journal of Animal Sience 42:49.

BALCH, C. C.; JOHNSON, V. W. 1950. Factors affecting the utilization of food by dairy cows 2 Factors influencing the rate of breakdown of cellulose (cotton thread) in the rumen of the cow. British Journal of Nutrition 4:389-394.

BARNES, D. K. 1973. Laboratory methods of evaluating feeding value of herbage. *In* Chemistry and Biochemistry of Herbage. Ed. by G. W. Butler and R. W. Bailey. New York, EE.UU., Academic Press. p. 179.

BULLIS. D. D.; MAJ-MANOUCHEHRI, M. A.; KNOX, K. L. 1967. *In vivo* nylon bag dry matter digestibility as a predictor of ration feeding value. Journal of Animal Science 26:130. (Abstract).

BURTON, G. W.; HART, R. H.; LOWREY, R. S. 1967. Improving forage quality in bermudagrass by breeding. Crop Science 7:329.

Copyrighted material

CATIE 1987. Efecto de la edad de rebrote sobre la degradación *in situ* de *G. sepium* y *E. berteroana*. II Informe Anual, Proyecto Sistemas Silvopastoriles, CATIE/CIID. Turialba,. Costa Rica. 124 p.

FARIA, V. P. De; HUBER, J. T. 1984. Influence of dietary protein and energy on disappearance of dry matter from different forage types from dacron bags suspended in the rumen. Journal of Animal Science 59:246.

FIGROID, W. W.; HALE, H.; THEURER, B. 1972. An evaluation of the nylon bag technique for estimating rumen utilization of grains. Journal of Animal Science 35:113.

GANEV, G.; ORSKOV, E. R.; SMART, R. 1979. The effect of roughage or concentrate feeding and rumen retention time on total degradation of protein in the rumen. Journal of Agricultural Science (Cambridge) 93:651.

LINDBERG, J. E. 1984. Nitrogen metabolism in sheep. 2. A comparison between rumen degradability of nitrogen and organic matter *in sacco* and *in vivo* in sheep fed hay rations and various protein supplements. Swedish Journal of Agricultural Research 14:37.

McQUEEN, R. E.; BUSH, R. S.; NICHOLSON, J. W. G. 1980. Variability of forage digestion in nylon bags suspended in the rumen. Proceedings of a meeting held in Alberta, Canada. p. 9.

MEHREZ, A. Z.; ORSKOV, E. R. 1977a. The use of a dacron bag technique to determine rate of degradation of protein and energy in the rumen. Journal of Agricultural Science (Cambridge) 93:645.

_____.; _____. 1977b. A study of the artificial fibre bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. Journal of Agricultural Science (Cambridge) 93:645.

NOCEK, J. E. 1985. Evaluation of specific variables affecting *in situ* estimates of ruminal dry matter and protein digestion. Journal of Animal Science 60:1347.

ORSKOV, E. R. 1970. Nitrogen utilization by the young ruminants. Proceedings of the Fourth Nutrition Conference, Nottingham, U.K. 113 p.

_____.; MEHREZ, A. Z. 1977. Estimation of extent of protein degradation from basal feeds in the rumen of sheep. Proceedings of the Nutrition Society 36:78.

_____.; DeB HOVELL, F. D.; MOULD, F. 1980. Uso de la técnica de la bolsa de nylon para la evaluación de los alimentos. Producción Animal Tropical 5:213.

Copyrighted material

_____. 1982. Protein Nutrition in Ruminants. 1 Ed. New York, New York, Academic Press, Inc. 160 p.

OWENS, F. N.; ZINN, R. A. 1982. The standard reference system of protein bypass estimation. *In* Protein Requirements for Cattle: Symposium. Ed. by F. N. Owens. Stillwater, Oklahoma, Oklahoma State University. 363 p.

QUIN, J. I.; WATH, J. G. VAN DER; MYBURGH, S. 1938. Studies on the alimentary tract of Merino sheep in South Africa. 4. Description of experimental techniques Onderstepoort Journal of Veterinary Science and Animal Industry 11:341.

RODRIGUEZ, H. 1968. The *in vivo* bag technique in digestibility studies. Revista Cubana de Ciencia Agrícola. 2:285.

ROMERO, F. 1985. Nutritional evaluation of Florida 77 alfalfa and Florigraze Rhizoma peanut as forages for dairy Cattle. Ph.D. Thesis. Gainesville, Florida, EE.UU., University of Florida. 172 p.

_____.; VAN HORN, H. H.; PRINE, G. M.; FRENCH, E. C. 1987. Effect of cutting interval upon yield, composition and digestibility of Florida 77 alfalfa and Florigraze Rhizoma peanut. Journal of Animal Science 65:786.

SATTER, L. D.; ROFFLER, R. E. 1975. Nitrogen requirements and utilization in dairy cattle. Journal of Dairy Science 58:1219.

SCHAIBLY, G. E.; WING, J. M. 1974. Effect of roughage concentrate ratio on digestibility and rumen fermentation of corn silage-citrus pulp rations. Journal of Animal Science 38:697.

SCHOEMAN, E. A.; De WET, P. J.; BURGER, W. J. 1972. The evaluation of the digestibility of treated proteins. Agroanimalia 4:35.

TOMLIN, D. A.; ANDERSON, M. J.; HARRIS, L. E. 1967. Refinements in the *in vivo* bag rumen technique. Journal of Animal Science 27:939. (Abstract).

UDEN. P.; VAN SOEST, P. J. 1984. Investigation of the *in situ* bag technique and a comparison of the fermentation in heifers, sheep, ponies and rabbits. Journal of Animal Science 58:213.

VAN HELLEN, R. W.; ELLIS, W. C. 1977. Sample container porosities for rumen *in situ* studies. Journal of Animal Science 44:141.

VAN KEUREN, R. W.; HEINEMANN, W W. 1962. Study of a nylon bag technique for *in vivo* estimation of digestibility. Journal of Animal Science 21:340.

Copyrighted material

VAN SOEST, P. J. 1983. Nutritional Ecology of the Ruminant. 1 Ed. Corvallis, Oregon, EE.UU., O & B Books. 374 p.

WEAKLEY, D. C.; STERN, M. D.; SATTER, L. D. 1983. Factors affecting disappearance of feedstuffs from bags suspended in the rumen. Journal of Animal Science 56:493.

VERITE, R.; JOURNET, M.; JARRIGE, R. 1979. A new system for the protein feeding of ruminants: The PDI system. Livestock Production Science 6:349.

Copyrighted material