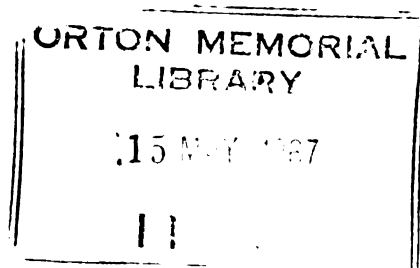


ESTUDIO COMPARATIVO DEL VALOR NUTRITIVO DE FORRAJES VERDES, HENOS

ENSILAJES Y CONCENTRADOS DETERMINADOS IN VIVO E IN VITRO.

Por

ALBA BUZY



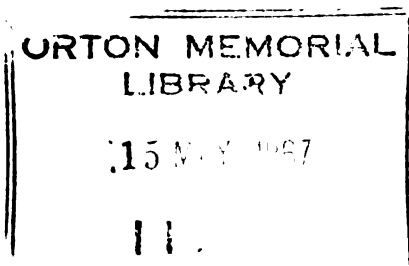
INSTITUTO INTERAMERICANO DE CIENCIAS AGRICOLAS DE LA OEA  
Centro de Investigación y Enseñanza para la Zona Templada

La Estanzuela, Colonia

URUGUAY

Abril de 1967

ESTUDIO COMPARATIVO DEL VALOR NUTRITIVO DE FORRAJES VERDES, HENOS,  
ENSILAJES Y CONCENTRADOS DETERMINADOS IN VIVO E IN VITRO. -



Tesis

Sometida al Consejo de Estudios Graduados  
como requisito parcial para optar al grado

de

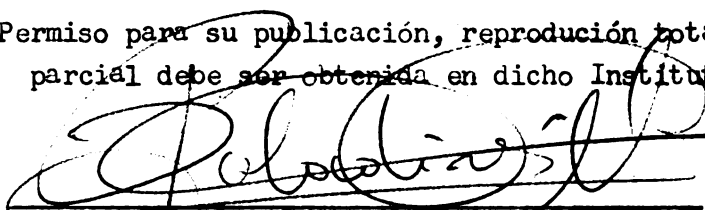
Magister Scientiae


en el


Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas


Permiso para su publicación, reproducción total o  
parcial debe ser obtenida en dicho Instituto

APROBADA:

  
\_\_\_\_\_  
Consejero

  
\_\_\_\_\_  
Comité

  
\_\_\_\_\_  
Comité

  
\_\_\_\_\_  
Comité

Abril 1967

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi profundo agradecimiento:

Al Dr. Osvaldo Paladines por su invaluable ayuda y acertados consejos en la realización de esta Tesis.-

A Srta.A.Stevenson, al Dr.Andrew Gardner y al Dr.Leo Raktøe, miembros del comité consejero, por su colaboración.-

A todos mis compañeros en especial a Emilio y Raúl, y al personal del Centro de Investigaciones Agrícolas "Alberto Boerger" quienes me alentaron en la realización de este trabajo.-

BIOGRAFIA

Alba Buzy Sanz nació en la ciudad de Florida, Uruguay, el 9 de julio de 1938.-Realizó sus estudios primarios en el Colegio de las Hermanas del Huerto, en Florida; cursando sus estudios secundarios en el Liceo José Enrique Rodó o Instituto Vázquez Acovado, en Montevideo, graduándose de Bachiller en 1959.-

Ese mismo año ingresó a la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República, de donde egresó en el año 1962, recibiendo el Título de Médico Veterinario en 1965.-

En agosto del mismo año ingresó a la Dirección de Ganadería en la Sección Sanidad Animal.-

En setiembre de 1965 ingresó al Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA para realizar estudios de post-grado, en la disciplina de Nutrición Animal, egresando en abril de 1967.-

TABLA DE CONTENIDO

	Página
LISTA DE CUADROS .....	viii
LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE CUADROS DE APENDICE .....	x
INTRODUCCION .....	1
REVISION DE LA LITERATURA .....	2
Sistemas <u>in vitro</u> .....	3
Membranas semipermeables .....	4
Componentes de los sistemas <u>in vitro</u> y factores que afectan la exactitud de los resultados.....	5
- Molido de la muestra .....	5
Secado de la muestra .....	6
Tamaño de la muestra .....	7
Inóculo .....	8
Duración de la fermentación.....	10
Control de pH .....	10
Temperatura .....	11
Indices usados para predecir el valor nu- tritivo .....	12
Otras técnicas para medir la digestibilidad de los forrajes .....	12
Digestibilidad <u>in vitro</u> como parámetro para pre- decir el consumo de forrajes.....	14
MATERIALES Y METODOS.....	20
Pruebas <u>in vivo</u> .....	20
Pruebas <u>in vitro</u> .....	24

	Página
RESULTADOS Y DISCUSION.....	29
Pruebas de digestibilidad <u>in vivo</u> .....	29
Pruebas de digestibilidad <u>in vitro</u> .....	30
Digestibilidad <u>in vitro</u> como parámetro para predecir la digestibilidad de los forrajes.....	30
Predicción de la digestibilidad de forrajes con la digestibilidad in vitro de la materia seca.....	31
Predicción de la digestibilidad de los forrajes con la digestión in vitro de la materia orgánica	35
Digestibilidad <u>in vitro</u> como parámetro para predecir el consumo de forrajes .....	41
CONCLUSIONES .....	51
RESUMEN .....	52
SUMMARY .....	54
LITERATURA CITADA .....	56
APENDICE .....	64

LISTA DE CUADROS

<u>Cuadro N<sup>o</sup></u>		<u>Página</u>
1	Relaciones encontradas en la literatura entre el I.V.N (Y) y la digestión <u>in vitro</u> de la celulosa (X) .....	17
2	Digestibilidad y consumo de materia seca de forrajes analizados durante los años 1964-1966.....	21
3	Coefficiente de digestibilidad promedio de la materia seca y de la materia orgánica, medidos <u>in vivo</u> .....	29
4	Error dentro y entre corridas de los standard de digestibilidad alta y baja .....	31
5	Coefficientes de correlación entre digestibilidad de la materia seca <u>in vivo</u> e <u>in vitro</u>	32
6	Ecuaciones de regresión para predecir el coeficiente de digestibilidad de la materia seca a partir de la digestibilidad <u>in vitro</u> de la materia seca .....	34
7	Coefficiente de correlación entre la digestibilidad de la materia orgánica <u>in vivo</u> e <u>in vitro</u> .-	35
8	Ecuaciones de regresión para predecir la digestibilidad de la materia orgánica a partir de la digestibilidad <u>in vitro</u> de la materia orgánica.-	38
9	Análisis de variancia de coeficientes de digestibilidad <u>in vitro</u> de celulosa purificada.	42
10	Coefficiente de correlación entre consumo de materia seca digerible/ $W^{0,75}$ y digestibilidad <u>in vitro</u> de la celulosa.....	43
11	Relaciones entre consumo de materia seca, (C.M.S.) y digestibilidad <u>in vitro</u> de la celulosa (D.C.).....	48
12	Ecuaciones de regresión para predecir el consumo de materia seca digerible/ $W^{0,75}$ a partir de la digestión <u>in vitro</u> de la celulosa a las 18 horas.....	48



LISTA DE FIGURAS

<u>Figura No.</u>		<u>Página</u>
1	Relación entre coeficientes de digestibilidad de la materia seca <u>in vivo</u> (Y) o <u>in vitro</u> (X) de heno concentrados en forrajes verdes. (pasto sudán <del>incluido</del> )	36
2	Relación entre coeficientes de digestibilidad de la materia seca <u>in vivo</u> e <u>in vitro</u> de heno, concentrados y forrajes verdes, (pasto sudán no incluido) ..	37
3	Relación entre coeficientes de digestibilidad <u>in vivo</u> e <u>in vitro</u> de la materia orgánica de forrajes verdes, heno y concentrados.....	40
4	Relación entre coeficientes de digestibilidad <u>in vitro</u> de la celulosa y el consumo de materia seca digerible del pasto sudán.....	44
5	Relación entre consumo de materia seca digerible y la digestibilidad <u>in vitro</u> de la celulosa a las 18 horas, en forrajes verdes.....	50

LISTA DE CUADROS EN EL APENDICE

<u>Cuadro</u> <u>Apéndice</u> <u>No.</u>		<u>Página</u>
1	Porcentaje de ceniza y celulosa en las muestras de alimento ofrecido.....	65
2	Coefficientes de digestibilidad de la materia seca y de la materia orgánica individuales, obtenidos <u>in vivo</u> .....	68
3	Coefficientes de digestibilidad de la materia seca y de la materia orgánica <u>in vivo</u> e <u>in vitro</u> .....	69
4	Consumo de materia seca/ $w^{0,75}$ , consumo de materia seca digerible/ $w^{0,75}$ y coeficiente de digestibilidad <u>in vitro</u> de la celulosa .....	72

## INTRODUCCION

En todo programa de mejoramiento e implantación de praderas, es indispensable conocer el valor nutritivo de los forrajes en estudio.-Una de las principales determinantes del valor nutritivo es la digestibilidad.-

La digestibilidad de los forrajes puede determinarse con animales, conociendo el alimento consumido y heces focales excretadas.-Este procedimiento es largo y costoso, por lo que se han buscado métodos de laboratorio para determinar la digestibilidad en forma rápida y sencilla.-

En los últimos años, muchos trabajos han demostrado una alta correlación entre digestibilidad in vivo o in vitro.-Esto hizo pensar en reemplazar cuando fuera posible, la digestibilidad in vivo por in vitro.-

Recientes estudios ( 8 ) en diferentes laboratorios usando el mismo forraje y varias técnicas de fermentación in vitro encontraron considerable variación en los resultados.- Estas discrepancias se debieron en parte a que la fermentación microbiana del rumen es un sistema biológico, que cambia con el tipo de bacterias presentes, y éstas son afectadas por factores tales como: pH, concentración de sales, temperatura y anaerobiosis.-

El objetivo de este trabajo fué establecer la técnica de digestibilidad in vitro, sus limitaciones y la exactitud en la predicción de digestibilidad y consumo de forrajes verdes, heno concentrados y ensilajes.-

REVISION DE LA LITERATURA

. El rumiante representa la forma más desarrollada de herbívoro y está capacitado para obtener el máximo provecho de los alimentos fibrosos y groseros.-

Los alimentos que el animal ingiere son retenidos en el rumen y sometidos a la digestión microbiana preliminar.-

Estas reacciones de naturaleza anaeróbicas dan lugar a producción de calor y cambios de pH.- Los cambios de pH dependen en parte de la dieta, secreción salivar y velocidad de absorción de los ácidos grasos formados durante la fermentación ( 60 ).-

La posibilidad de imitar las reacciones de rumen in vitro, forma la base de las técnicas del rumen artificial.- Teóricamente, un sistema in vitro ideal, provee las condiciones de fermentación idénticas a las que ocurren en el rumen.- En consecuencia es necesario definir las condiciones que deben estar presentes en un sistema in vitro, para obtener una imitación satisfactoria.-

Marston ( 64 ) considera que los principales factores que controlan la fermentación en el rumen son: baja tensión de oxígeno, alta tensión de anhídrido carbónico, capacidad buffer de la saliva, temperatura de 40° C. aproximadamente y la presencia de microorganismos de rumen.-

Información reciente sobre el uso de los métodos in vitro se puede extraer de los trabajos presentados en el simposio realizado en Colonia Suiza - Uruguay ( 80 ).- Deben mencionarse también, las revisiones de literatura sobre este tópico escritas por Van Dyne ( 39 ), Johnson ( 56, 57 ) y Barnes ( 6 ).-

### Sistemas in vitro

Diversos sistemas de fermentación fueron ideados con el fin de cumplir con los requisitos antes expuestos.-

#### Sistemas de vidrio.-

Son los más empleados y se pueden distinguir básicamente dos formas:

a) Gaseado continuo con anhídrido carbónico; este procedimiento ha sido adoptado por muchos investigadores (9,35,73) y consta de una sola etapa (licor del rumen) en todos los casos.-

b) Sin gaseado continuo con anhídrido carbónico; dentro de éste encontramos los que utilizan una sola etapa (licor rumial) (11,27) y el sistema de dos etapas de Tilley et al. ( 84 ). Este sistema de fermentación in vitro se realizó sobre la hipótesis siguiente: la digestión microbiana del rumen, en el animal, es seguida de la digestión enzimática en el abomaso e intestino, donde se realiza el ataque de las proteínas del alimento y bacterias que no fueron atacadas en el rumen.- Esta digestión no es simulada por los sistemas de fermentación in vitro que utilizan licor del rumen solamente.- Ya que se había observado ( 33,84 ) que muestras con alto contenido de nitrógeno daban valores más bajos que los obtenidos en ensayos de digestibilidad con animales.-

Se investigó entonces la posibilidad de seguir la digestión, con una digestión de pepsina-ácida, se encontró que en esta forma la digestibilidad de la materia seca y de la materia orgánica daba valores más cercanos a los obtenidos in vivo.-

En la técnica de Tilley et al. ( 84 ) es necesario centrifugar entre las dos etapas lo mismo que al final de la digestión con pepsina.-

Alexander y McGowan (1) eliminaron la centrifugación.-La fermentación con licor del rumen se termina por acidificación y los residuos del período

pepsina-ácida se recupera por filtración.-

Para probar la eficacia del método Alexander y McGowan (1) analizaron 30 muestras de digestibilidad in vivo conocidas.-El parámetro de valor nutritivo utilizado fué la digestibilidad de la materia orgánica,obteniendo un coeficiente de correlación de 0,97.-

#### Membranas semipermeables.-

Louw et al. ( 62 ) idearon un sistema en el cual el licor del rumen y el sustrato apropiado fueron situados en un saco de diálisis o membrana semipermeable y suspendidos en un volumen de mezcla mineral contra la cual era dializada.-Esto fué una tentativa para simular la absorción por el rumen, siempre que el fluido dializado fuera cambiado regularmente.-

Huhtanen et al. ( 49 ) modificaron el sistema de Louw.-Esta modificación consistió en un rumen artificial en miniatura con un saco de colofán suspendido en un frasco con solución mineral, no siendo necesario la neutralización continua del dializado.-

Posteriormente Salisbury et al. ( 78 ) y Huhtanen y Elliot ( 50 ) lo adoptaron para estudiar los factores que influyen en la digestión de la celulosa in vitro.-

Los sistemas de membranas semipermeable presentan los inconvenientes siguientes ( 88 ): a) es difícil mezclar el forraje con líquido ruminal, b) la formación excesiva de gas, en los sacos, puede llevar a pérdida de la muestra por ruptura del saco, c) es necesario un lavado considerable del saco, después de terminada la digestión y aún así queda material residual, d) en digestiones prolongadas ( 48 a 72 horas) los sacos son atacados por los microorganismos del rumen.-

La mayor limitación de los sistemas impermeables (sistemas de vidrio) es que no permiten la remoción continua de los productos de fermentación, como ocurre normalmente a través del epitelio ruminal ( 79 ).-

Sin embargo en periodos convencionales de fermentación Johnson et al. ( 51 ) encontraron que los niveles de ácidos grasos volátiles no eran suficientemente altos, como para inhibir la fermentación.-

Esto ha sido corroborado por el Shazly et al. ( 40 ) al comparar los sistemas de vidrio, membrana semipermeable y lavados continuos.- Los autores aconsejan por lo tanto el empleo de sistemas de vidrio, por su mayor simplicidad.-

Componentes de los sistemas in vitro y factores que afectan la exactitud de los resultados.-

Molido de la muestra.-

La finura del molido depende del tipo de molino usado, tamaño del tamiz, tiempo de molienda y contenido de humedad de la muestra.-

Tilley y Terry ( 85 ) encontraron digestibilidades idénticas al comparar muestras molidas groseras (tamiz 0,8 mms.) y finas de un mismo forraje, siendo el porcentaje de partículas retenidas en una malla No.60 de 28 y 38% respectivamente.-

Dehority y Johnson ( 30 ) encontraron, un aumento en la digestibilidad de la celulosa utilizando muestras molidas muy finas ( ball-milling) en diferentes tiempos de molienda: 0, 6, 24 y 72 horas.-Este aumento fué mayor en muestras que tenían originalmente digestibilidad alta.-Los autores de acuerdo a estos resultados, asumen que el efecto de la molienda es romper las paredes de las células y permitir que las enzimas penetren en regiones de las células que están normalmente excluidas.-

Dehority ( 28 ) utilizando el mismo procedimiento no encontró diferencia en la digestibilidad, sólo una disminución en el tiempo que transcurre desde la iniciación de la fermentación hasta el comienzo de la digestión de la

celulosa.-

Baumgardt y Oh ( 12 ) encontraron coeficientes de digestibilidad in vitro de la celulosa más altos, en forrajes pasados a través de un tamiz de malla No.60, que cuando los mismos forrajes eran pasados por un tamiz de 40.-Siendo esta diferencia mayor en gramíneas que en alfalfa.-

Alexander ( 2 ) moliendo una muestra de heno en cribas de 2,45 mm., 1,6 mm. y 0,6 mm. de diámetro encontró una reducción de la digestibilidad in vitro con el molido grueso.-El error standard de la estimación aumentó en forma significativa.-El autor indica la necesidad de una criba de diámetro constante y suficientemente pequeño para reducir al máximo los errores de muestreo.-

#### Secado de la muestra.-

Tilley y Terry ( 85 ) indican que el procedimiento desechar las muestras para ser analizadas no tiene efecto sobre la digestibilidad.-Esto se basa en comparaciones de resultados obtenidos in vitro de materiales secados en la estufa y secados en secadora-congeladora.-

Los mismos autores ( 85 ) estudiaron la posibilidad de que el secamiento repetido de muestras secas produzcan una disminución de la digestibilidad.-Encontrando que muestras secadas a 40 o 100° C tenían la misma digestibilidad, pero cuando el secado se mantenía por más de 4 días se notaba una marcada disminución en la digestibilidad; lo mismo sucedía con temperaturas superiores a 125° C. por más de 16 horas.-

Alexander ( 2 ) repitió este trabajo encontrando que el secado repetido producía una disminución progresiva y significativa ( P 0,05) de la digestibilidad medida in vitro.-



Johnson et al. ( 53 ) determinaron el efecto del secado sobre la digestibilidad de la celulosa del forraje, utilizando para las determinaciones in vitro forrajes secos y frescos, relacionando estos resultados a la digestibilidad in vivo de la materia seca.-Los resultados indicaron que la digestión de 12 horas de la celulosa de forrajes frescos eran en promedio 7.0 unidades de porcentaje mayor que la de forraje seco, ( P 0,001).-El coeficiente de correlación de las determinaciones in vivo e in vitro, mostró ser más alto para los forrajes frescos pero no estadísticamente significativo.-

Bowden y Church (14) encontraron discrepancias en las relaciones in vivo e in vitro, usando muestras de forrajes almacenadas por períodos de tiempo diferentes, tanto para la digestibilidad de la materia seca como para celulosa.-El coeficiente de correlación bajó de 0,93 a 0,73 y de 0,87 a 0,49 respectivamente a los tres años.-

Resultados similares son presentados por Clark y Mott ( 23 ).-Ellos atribuyen estas diferencias a cambios producidos en el forraje almacenado.- También encontraron diferencias significativas entre forrajes secados a 170°F y en secadora-congeladora.-

Los resultados encontrados, indican la necesidad de tener cuidado con la frecuencia y temperatura de secamiento de las muestras cuando se van a emplear métodos in vitro.-

#### Tamaño de la muestra.-

Con el método de Hurley ( 84 ), se probó que 0,5 gr. de muestra es un peso conveniente, aunque se obtienen digestibilidades idénticas cuando el peso de la muestra, el volumen del licor del rumen y buffer han sido aumentados a 1,5 gr., 30 ml. y 120 ml. respectivamente.-

Bentley et al. ( 9 ) usan ácido Valerico y Biotina como ingredientes del medio de fermentación.-Otros investigadores tales como Donofer et al. ( 34 ) han aumentado la capacidad buffer de la solución para eliminar la necesidad de ajustar el pH durante la fermentación.-

La digestibilidad disminuye cuando se reduce el volumen de licor del rumen para un peso determinado de muestra ( 84 ).-

Si el inóculo es sacado de animales que no han sido alimentados recientemente, lo mismo que cuando se usan suspensiones de células lavadas sin agregar solución de nutrientes,-la digestibilidad de la fibra disminuye mucho y es muy variable entre los tubos ( 85 ).-

Experimentos preliminares muestran que la digestibilidad de los forrajes no es afectada por variaciones en la dieta del animal que provee el inóculo ( 88 ).-

También Raymond y Terry ( 74 ) consideran que el efecto de la dieta es pequeño.-En tanto que Shelton y Reid ( 79 ), Baumgardt et al. ( 11 ) y Bezeau ( 10 ), concluyen que es necesario un control rígido de la ración.-

Alexander, ( 2 ) estudió el efecto del nivel de proteína de la ración, alimentando a los ovinos donantes con un nivel constante de consumo y cambiando la ración cada semana.- El rango de digestibilidad promedio de la materia orgánica in vitro fué de 59, 2 a 54, 5%, encontrándose una correlación significativa (  $r = 0.88$  ) con la proteína cruda de la ración.-

Suplementado el licor con solución de sulfato de amonio, el efecto de la dieta se eliminó en buena parte, obteniendo una variación promedio de digestibilidad de 59,7 a 57,5% y una correlación no significativa entre la digestibilidad de la materia orgánica y la proteína cruda de la dieta.-Es de

Baumgardt et al. ( 11 ), estudiaron el efecto de variar la cantidad de sustrato, sobre la digestión de la celulosa.-Los niveles empleados fueron de 0,5; 1,0; y 1,5 gr.-La cantidad de celulosa digerida aumentó en proporción a la cantidad agregada, de manera que el remanente indigerido fué similar.-

Kamstra et al. ( 58 ), hallaron resultados similares con forrajes que contenían niveles de celulosa 0,30 a 0,80 grs.-También Quicke et al. ( 73 ) encontraron porcentajes de digestión de celulosa cercanos con muestras de forrajes cuyo peso variaba de 0,44 a 2,50 gr.-El rango de celulosa de las muestras fué de 0,08 a 0,48 gr.-

Erwin y Elliston ( 41 ), encontraron una disminución lineal en la digestión de la celulosa con el aumento del tamaño de la muestra.-

Barnes et al. ( 5 ), compara los métodos de Donefer et al. ( 37 ) Baumgardt et al. ( 11 ) y Chalupa y Lee ( 27 ) modificado con el uso de tubos de centrífuga, encontraron que con cinco períodos de fermentación ( 6, 12, 18, 24 y 48 horas ) había significativas diferencias entre los métodos en las primeras etapas ( 6, y 12 horas ).- En períodos más avanzados de la fermentación ( 18, 24 y 48 horas ) estas diferencias desaparecían.-Los autores consideraron que las diferencias entre los métodos se debieron principalmente al tamaño de la muestra, medio nutriente, tipo de recipiente usado para la fermentación y mantenimiento de las condiciones anaeróbicas.-

#### Inóculo.-

Las técnicas de preparación del inóculo varían, de la más simple (85, 88) que usa líquido ruminal filtrado y complementado por salive artificial (en algunos casos enriquecida con urea 1,27), a las que usan suspensiones de células lavadas enriquecidas con distintos minerales ( 9, 73 ).-

hacer notar que se incrementó el error cuando el contenido de proteína cruda de la ración era superior a 15%.--

#### Duración de la fermentación.-

La longitud de la fermentación es función enteramente de los objetivos del trabajo.--Se encuentra una amplia variación en el tiempo requerido para la iniciación de la fermentación bacteriana y máxima digestión de los varios tipos de carbohidratos y otros sustratos.--

Quicke et al. ( 73 ) encontraron que 48 horas de fermentación dan valores de digestibilidad de la celulosa similares a los obtenidos in vivo.--

Otros investigadores ( 11, 34 ) con períodos de digestión de la celulosa de 12 y 24 horas obtuvieron correlaciones similares a las obtenidas con períodos más largos de tiempo.--

Tilley et al. ( 84 ) encontraron que con su método de dos fases, la fermentación por 48 horas con licor del rumen, seguido de otras 48 horas con pepsina ácida, era suficiente para obtener digestión de la celulosa comparable a la obtenida in vivo.--

#### Control de pH.-

Para una digestión in vitro eficiente el mantenimiento del pH entre los límites 6.7 a 6.9 durante la incubación del forraje con licor del rumen es reconocida como esencial.--

Tilley et al. ( 86 ) encontraron que manteniendo el pH entre los límites de 6.5 a 7.5 la digestibilidad se reduce alrededor de cuatro unidades.-- La mayor reducción en la digestibilidad ( más de veinte unidades ) se obtuvo a pH 5.5; a este pH la digestibilidad de la materia seca in vitro obtenida por incubación con licor del rumen pepsina ácida, fué similar a la obtenida

con pepsina ácida sola, indicando que la digestión bacteriana era inhibida a este pH.-

Estudios in vivo han demostrado que los niveles de pH en el rumen son muy variables.-Se han encontrado pH menores de 5.5 cuando se suplementa la dieta de forraje con granos ricos en almidón, como por ejemplo, maíz ( 17 ).

Balch y Rowland ( 4 ) encontraron pH cercanos a 6.0 cuando se suministraba heno con alta proporción de concentrados.-

En los casos en que los forrajes fueron suplementados con carbohidratos rápidamente digeribles, la digestibilidad de la fibra fué menor que cuando el forraje se dió solo ( 21, 47 ).-Esta disminución podría deberse a la reducción en la actividad o número de las bacterias celulolíticas, que resulta de la utilización preferencial de hemicelulosa ( 71 ).-

De esto se deduce que no es muy factible la estandarización del método en cuanto a pH.-

#### Temperatura.-

La temperatura seleccionada para la fermentación in vitro es alrededor de 39° C.-Aunque la incubadora es generalmente preferido para este fin, algunos investigadores utilizan baño maría.-

Alexander ( 2 ) estudió el efecto de la temperatura encontrando que el aumento promedio de la digestibilidad entre 35.5 y 42° C.fué de 0.67 unidades de digestibilidad por grado C.- Dejando los tubos tres horas a la temperatura ambiente del laboratorio en las primeras etapas de fermentación, la digestibilidad disminuyó en 2.2 unidades.-

Indices usados para predecir el valor nutritivo.-

La actividad digestiva, es evaluada in vitro comunmente por la desaparición de constituyentes químicos durante un período discreto de tiempo.- La digestibilidad de la celulosa ( 9 ) es la medida más común, pero también son medidos otros factores tales como digestibilidad de la materia seca ( 85 ), materia orgánica (1,2), energía ( 11 ) y TDN ( 72 ).-

Estos criterios medidos in vitro se relacionan matemáticamente con las mismas variables determinadas in vivo.-

Otras técnicas para medir la digestibilidad de los forrajes.-

La sustitución de los animales por un método de laboratorio tiene cierta desventaja.-La limitación principal es la transferencia de los resultados obtenidos en el laboratorio al animal, ya que los resultados no son necesariamente el duplicado de las funciones del rumen.-Por esta causa, un número de investigadores ( 52, 65, 70, 59 ) han estudiado la digestión de los forrajes en el rumen con el uso de bolsas de nylon o de dacrón.-Estas bolsas de material indigerible, se sitúan en el rumen de animales fistulados, sacánolas después de un período dado de tiempo.-

Hopson et al. ( 48 ) relacionaron los coeficientes de digestibilidad de la celulosa obtenida in vivo, con los mismos coeficientes obtenidos con bolsas de dacrón en períodos de fermentación de 36 y 42 horas.-Los coeficientes de correlación fueron de 0.52 y 0.54 respectivamente, lo que indica, que la técnica de las bolsas de dacrón no se adapta bien a los resultados in vivo.-

Sin embargo, Lusk et al. ( 63 ) encontraron correlación de 0.83 entre los coeficientes de digestión de la celulosa por las bolsas de dacrón, y los mismos coeficientes obtenidos in vivo.- Debe observarse que los tiempos de

fermentación empleados, para obtener el mismo coeficiente de correlación fué diferente con gramíneas ( 72 horas ) y leguminosas ( 48 horas ).-

Ferrando y Catsaounis ( 42 ) compararon la digestibilidad real y la medida por los sacos de nylon, concluyendo que esta medida no es posible por no ser reproducible.-

Dehority y Johnson ( 29 ) desarrollaron un método químico, basado en solubilidad de la celulosa de forrajes en diamina cupriethylene, para estimar la digestibilidad de los forrajes.-En un trabajo posterior los autores ( 31 ) relacionaron los valores obtenidos por esta técnica de solubilidad con los coeficientes de digestibilidad de la celulosa in vivo.-El coeficiente de correlación entre los métodos fué (  $r = 0,92$  ).-La alta correlación obtenida sugiere que puede ser usada para estimar la digestibilidad de los forrajes.-Sin embargo, el método no fué satisfactorio para estimar la digestibilidad de la alfalfa, ya que la cantidad de celulosa disuelta por diamino cupriethylene era pequeña y no variaba en muestras que tenían digestibilidad diferente.-

Con análisis químicos adicionales, los mismos investigadores ( 32 ) encontraron que la solubilidad de la materia seca de los forrajes en ácido sulfúrico 1,0.N. estaba altamente relacionado con la digestibilidad de la materia seca in vivo (  $r = 0,81$ , para leguminosas ).-

Como las heces de los herbívoros están compuestas de residuos indigerido, excreción endógena y residuo bacteriano.- A priori, se puede esperar que el método in vitro de digestibilidad más alta por la razón de que no hay excreción endógena ( 82 ).-

Teniendo en cuenta estos puntos Van Soest et al. ( 82 ) idearon un procedimiento en el que la primera etapa es igual al método de Tilley, pero la etapa de pepsina es reemplazada por la extracción de las proteínas con

detergentes neutros.-Al relacionar estos resultados con los de digestibilidad in vivo el coeficiente de correlación fué de 0.96 con una desviación standard de 2,8.-

Relacionaron entonces digestibilidad verdadera in vivo con la digestibilidad in vitro de la pared celular consiguiendo mayor precisión ya que el coeficiente de correlación fué 0.98 y la desviación standard 1,7.-

DH y Baumgardt ( 69 ) compararon, dos test de solubilidad, diamina cupriethylene ( 31 ) y solubilidad de la materia seca ( 32 ), con la digestibilidad de la materia seca obtenida in vivo; los coeficientes de correlación fueron para 56 muestras de forrajes ( 32 gramíneas y 24 leguminosas ) de 0,67 y 0,54 respectivamente, para la alfalfa sola  $r = 0.88$ .-

Al comparar distintos métodos para estimar la digestibilidad de los forrajes Baumgardt y OH ( 13 ) concluyen que la medida más real para predecir la digestibilidad de la materia seca in vivo se obtiene por el método de Tilly et al. ( 84 ) con un coeficiente de correlación de 0.88 y una desviación standard de 2.96.-

#### Digestibilidad in vitro como parámetro para predecir

#### el consumo de los forrajes.-

Hasta hace pocos años los métodos in vitro se dirigían únicamente a predecir algún aspecto de la digestibilidad de los forrajes ( 68, 84, 11 ).-

Blaxter et al. ( 16 ) consideran que el consumo de forrajes por los rumiantes, cuando se ofrece ad-libitum, está estrechamente relacionado a la digestibilidad de la energía.-Esto se cumple cuando se comparan forrajes de la misma especie a diferente estado de madurez, ( 61 ) pero es menos importante cuando se comparan forrajes de especie diferente ( 38 ).-



En los últimos tiempo, se ha puesto atención a la velocidad con que se digieren los forrajes por cuanto parece, que esta tiene un efecto importante sobre la cantidad de forraje que el animal es capaz de consumir ( 18 ).-

Crampton ( 24 ) sugiere que la velocidad de digestión de la celulosa puede relacionarse al consumo voluntario de forrajes ya que el hambre está asociada con la cantidad de alimento presente en el rumen.- La repetición del hambre puede tener relación con la salida del rumen de una parte de la comida.-Posteriormente Donefer et al. ( 34 ) desarrollaron un método in vitro para predecir el consumo de forraje, modificando el método de Ohio ( 9 ).- El índice in vitro es la digestión de la celulosa.-Con nueve forrajes encontraron un coeficiente de correlación de 0.83 entre la digestión de la celulosa a las 12 horas y el consumo relativo.-

Teniendo en cuenta que la respuesta animal es un reflejo de la cantidad de alimento consumido y de la digestibilidad de este alimento, Crampton et al. ( 26 ) propusieron la utilización de un índice que reúna estos dos factores y permita comparar los forrajes entre sí.- A este parámetro lo llamaron Índice del Valor Nutritivo ( I.V.N. ).-Este índice resulta de la multiplicación del consumo relativo de un forraje por su coeficiente de digestibilidad de la energía.-Al relacionar el I.V.N. con la digestibilidad de la celulosa in vitro a las 12 horas encontraron un coeficiente de correlación 0.91 ( 34 ).-

Posteriormente analizaron nuevas muestras de forrajes ( 35 ), encontrando una ecuación de regresión y coeficiente de correlación de la misma magnitud que las anteriores.-

Johnson et al. ( 54 ) obtuvieron coeficiente de correlación altos entre la digestión de la celulosa in vitro a las 12 horas y el consumo relativo.-Sin embargo al incluir alfalfa en la relación el coeficiente de corre-

lación bajó de 0,95 a 0,86.-

Arroyo-Aguilú et al. ( 3 ) encontraron un coeficiente de correlación de 0,11 entre el I.V.N. y la digestión in vitro de la celulosa a las 12 horas.-Al relacionar el consumo con la digestión in vitro el coeficiente fué de 0,48.-Resultados similares obtuvieron Reid et al.( 76 ).-

Chalupa y Lee ( 27 ) empleando otro método de fermentación in vitro que incluye licor del rumen filtrado y saliva artificial enriquecida con urea y glucosa, sin gaseado continuo con CO<sup>2</sup> obtuvieron coeficientes de correlación de 0,70 y 0,81 entre, la digestión de la celulosa in vitro a las 18 horas y el I.V.N. y consumo relativo respectivamente.-

Estudios in vivo han demostrado que la forma física como se suministra el forraje a los animales, incluye sobre la eficiencia de la utilización de la energía.-

Paladines et al. ( 70 ) con heno suministrado ad-libitum molino y picado encontraron, que el consumo de materia seca en gramos por unidad de tamaño metabólico fué de 68,0 gr. para el heno cortado y 87,3 para el molido.-La superioridad del heno molido fué de 24,4 y 63,4% al expresar el consumo, en gramos de materia seca y energía neta respectivamente.-La superioridad del heno molido fué atribuida en 78% al mayor consumo y en 22% a la mayor eficiencia de utilización de la energía.-

De estos resultados Reid ( 77 ) concluye que parece improbable que se pueda desarrollar un método químico o de fermentación in vitro para que por medio de él se pueda predecir el consumo o efecto nutritivo total de los forrajes.-

Teniendo en cuenta que la forma física en que se suministra un forraje tiene efecto en el consumo voluntario, digestibilidad y por lo tanto en el I.V.N. y que las determinaciones in vitro de la digestión de la celulosa se hacen con muestras molidas, Donefer et al. ( 35 ) compararon el I.V.N. determinado in vivo e in vitro de forrajes suministrados picados y molidos.- Los sustratos usados in vitro provenían de forrajes secos, picados y molidos.- La digestión de la celulosa estaba altamente correlacionada con el I.V.N. de los forrajes suministrados molidos y picados, sin embargo, a un mismo nivel de digestión de la celulosa correspondió un I.V.N. 10,9 unidades de porcentaje mayor en los forrajes molidos.-

En el cuadro No.1 se dan las distintas ecuaciones de regresión sacadas de la literatura en el estudio de estas variables.-

CUADRO No.1.-Relaciones encontradas en la literatura entre el I.V.N. (Y) y la digestión in vitro de la celulosa (X).-

Tiempo de incubación	ecuación	r	SyX	Nº de mtras.	Ref.
12 horas	$Y = 1,31X - 7,8$	0,91	-	9	( 34 )
12 horas	$Y = 1,09X - 15,9$	0,95	-	8	( 54 )
12 horas	$Y = 0,81X - 5,9$	0,86	-	11	( 54 )
12 horas	$Y = 0,23X - 3,5$	0,91	5,5	26	( 35 )
12 horas	$Y = 1,23X + 7,4$	0,87	6,7	16	( 35 )
18 horas	$Y = 28,20X + 4,1$	0,70	5,0	25	( 27 )

La variabilidad de los resultados entre laboratorios, asociada con la operación de un sistema de fermentación in vitro, generalmente se acusa al hecho de la dificultad en standarizar la actividad de los microorganismos del rumen.-

Estos hechos han estimulado el desarrollo de procedimientos de laboratorio más simples que tiendan a eliminar la fase biológica de la digestión.-

Johnson et al. ( 55 ) compararon los coeficientes de correlación entre el I.V.N. in vivo y los resultados obtenidos por tres diferentes métodos de laboratorio, digestibilidad in vitro de la celulosa a las 12 horas, solubilidad de la celulosa con diamine-cuprietileno y solubilidad de la materia seca con ácido sulfúrico 0.1N.-El coeficiente de correlación obtenido al comparar el I.V.N. in vivo con la digestión de la celulosa in vitro fué el más alto.-

Donefer et al. ( 37 ) determinaron el porcentaje de desaparición de la materia seca de 49 forrajes, con una solución de pepsina 0,2% en HCl 0.075 N. encontrando un coeficiente de correlación 0.95 entre la desaparición de la materia seca con pepsina ácida y el I.V.N. determinado in vivo.-Estos resultados confirman la hipótesis ( 36 ) de que la rápida solubilidad de los forrajes en el rumen puede facilitar el ataque físico de los organismos celulolíticos al residuo insoluble del forraje, resultando una más alta digestión inicial y un mayor consumo voluntario.-

Los mismos autores ( 36 ) sugieren que otra explicación podría resultar del hecho que la materia seca disuelta sería removida del rumen más rápido que la ingesta sólida, lo que reduciría el llenado del rumen, aumentando el consumo.-Esto está de acuerdo con las observaciones de Weller et al. ( 89 ) que encontraron que la fase líquida del contenido ruminal tiene una velocidad de pasaje mayor que la porción sólida.-

Donefer et al. (35 ) encontraron una correlación de 0.90 entre el I.V.N. y la desaparición de la materia seca con agua destilada.-

Barnes ( 7 ) obtuvo un coeficiente de correlación de 0.91 al comparar la desaparición in vitro de la materia seca producida con un buffer y solución

de pepsina, con un índice del valor nutritivo que incluye la digestibilidad de la materia seca.-

Clancy y Wilson ( 22 ) empleando una modificación del método de la fibra de detergente ácido de Van Soest ( 73 ), obtuvieron un coeficiente de correlación de 0.82 con una desviación standard de 7,0 con el consumo voluntario, de 60 muestras mezclas de gramíneas con trébol blanco.-

MATERIALES Y METODOS

Con el fin de establecer las limitaciones y exactitud de la técnica in vitro en la predicción de la digestibilidad y consumo de forrajes verdes, heno y ensilajes, se realizó un estudio comparativo de los resultados obtenidos por este método y los obtenidos in vivo.-

Las muestras de los forrajes estudiadas provenían en todos los casos de alimentos cuya digestibilidad in vivo se conocía.-

Para obtener información sobre el empleo de la técnica in vitro con concentrados, se realizaron pruebas in vivo que denominamos complementarias.-

Pruebas in vivo.-

Pruebas anteriores.-

Comprenden experimentos realizados en el Laboratorio de Nutrición de La Estanzuela durante los años 1964-1966 inclusive con un total de 54 muestras (Cuadro No.2 y Cuadro Apéndice No.3).-

CUADRO Nº 2.- Digestibilidad y consumo de materia seca de forrajes analizados durante los años 1964-1966.-

Forraje	Nº Mtras	Digestibilidad	Consumo
		(Rango promedio)	(Rango promedio)
		%	g/H 0,75
Heno de Alfalfa	8	67,0-49,9	63-46
Ensilaje de Feterita	3	59,4-47,8	35-31
Sorgo Congelado	1	60,8	60
Pasto Sudan	18	72,4-53,9	63-37
Heno de Pasto Sudán	4	63,9-54,5	
Ensilaje de Pasto Sudan	3	49,8-52,3	28,5-23,5
Heno de Trébol Blanco + Festuca	4	65,5-63,1	63, 61
Heno de Alfalfa	1	59,4	
Trébol Blanco	1	72,8	
Trébol Blanco + Falaris	3	75,5-67,7	59-47
Ryegrass	5	76,4-52,6	53-44
Trébol Subterráneo	1	70,4	48
Trébol Blanco	2	77,7 76,7	63 54

Pruebas complementarias.-

Se realizaron pruebas in vivo e in vitro con los siguientes alimentos:

Prueba No. 1

- a) Heno de alfalfa
- b) Heno de alfalfa y maíz molido
- c) Heno de alfalfa y trigo molido

Prueba No. 2

- a) Heno de alfalfa
- b) Heno de alfalfa y harina de girasol
- c) Heno de alfalfa y torta de lino

Prueba No. 3

- a) Paja de lino

Prueba No.1

Para determinar la digestibilidad del heno de alfalfa se emplearon 8 capones Cornedale uniformes en edad y peso.-Los capones fueron alimentados en jaulas metabólicas, dos veces por día, el alimento ofrecido y rechazo fué pesado diariamente.-La prueba tuvo una duración de 7 días con un período preliminar de 14 días.-

El consumo máximo se determinó tomando en cuenta el alimento ofrecido y rechazo de los días 10 a 14.-

Para el período de colección de heces fecales ( 7 días ) se ofreció a los animales desde el día 15 hasta el día 21 una cantidad de heno igual al consumo de los días 13 y 14 reducida en 10%.-La colección de heces comenzó 48 horas después de iniciada la prueba de digestibilidad, es decir el día 17.-

Del total de heces húmedas/días/animal se tomó una alícuota del 20%, las alícuotas fueron reunidas en muestras compuestas para 7 días, las cuales sirvieron para los análisis químicos.-

La determinación de materia seca del alimento ofrecido, rechazo y heces fecales se realizó en un secador marca Uuitherm a 90° C.-El tiempo de secamiento fué de 48 horas para las heces fecales y 7 horas para el heno.-

Las muestras una vez secas, fueron molidas en un molino marca Wiley modelo N° 3 con tamiz de 1 mm. y guardadas para determinación de ceniza.-

La determinación de ceniza se hizo en duplicado empleando 2 grs. de muestra, e incinerándolo por cuatro horas a 600° C.-

Para determinar la digestibilidad de la materia seca se empleó la



fórmula siguiente:

$$\text{Digestibilidad \%} = \frac{\text{Consumo de M.S.} - \text{M.S. de heces}}{\text{Consumo de M.S.}} \times 100$$

En forma similar se calculó la digestibilidad de la materia orgánica:

$$\text{Digestibilidad \%} = \frac{\text{Consumo de M.O.} - \text{M.O. de heces}}{\text{Consumo de M.O.}} \times 100$$

Al finalizar la prueba los animales se dividieron en dos grupos de cuatro animales cada uno, con los que se determinó la digestibilidad de maíz y trigo.-

La digestibilidad de los concentrados se determinó por un procedimiento indirecto:

- 1o) Se determinó la digestibilidad del heno de alfalfa.-
- 2o) El coeficiente promedio obtenido se multiplicó por el consumo de heno/animal/día, determinando de esta manera la cantidad de forraje digerido.-
- 3o) Al forraje consumido/animal/día se le restó el forraje digerido, obteniendo de esta manera las heces fecales correspondientes al heno.-
- 4o) A las heces fecales total de animal/día se le restaron las heces de heno correspondientes, obteniendo las heces del concentrado.-
- 5o) Al consumo de concentrado animal/día se restaron las heces correspondientes, conociendo así la cantidad de concentrado digerido.-
- 6o) La digestibilidad de concentrado se calculó entonces por la fórmula siguiente:

$$\text{Digestibilidad concentrado \%} = \frac{\text{concentrado digerido}}{\text{consumo de concentrado}} \times 100$$

El procedimiento y duración de estas pruebas fué similar a la de heno de alfalfa.-

En los primeros 14 días se suministró el concentrado hasta llegar a una ración de 500 gr./capón/día, cantidad que se mantuvo durante la realización de la prueba.-La cantidad de heno ofrecido fué el promedio de lo consumido entre los días 11 y 12 reduciéndolo en un 10%.-

#### Prueba N° 2.-

Se procedió en igual forma que en la prueba N° 1, sólo que el nivel de alimentación de la alfalfa fué de mantenimiento.-

Para esto la alfalfa se suministró de manera que los animales no dejaran rechazo.-

Con la harina de lino y torta de girasol, se utilizó el mismo método que en la prueba de trigo y maíz.-

#### Prueba N° 3.-

Para determinar la digestibilidad de la paja de lino se emplearon 6 capones Corriedale uniformes en edad y peso, fijando el consumo de manera que los animales no dejaran rechazo.-

En todas las muestras que pertenecían a pruebas en que el forraje fué ofrecido ad-libitum se determinó el porcentaje de celulosa (Cuadro Apéndice No.1).-

#### Pruebas in vitro.-

##### Método de Tilley y Terry ( 85 ).-

Se empleó para determinar la digestibilidad de la materia seca y materia orgánica de todas las muestras de alimento ofrecido.-Este método cons-

ta de dos etapas:

Primera etapa.- Muestras de 0,5 g. de forraje molido y secado a 100° C. por 16 horas se pesan en duplicado.-Las muestras se transfieren a tubos de centrifuga provistos de tapones de goma con válvulas para salida de gases.-En cada corrida se colocan 2 tubos control que no llevan muestra, y 4 tubos con muestras de digestibilidad in vivo e in vitro conocidas, siendo una de las muestras de digestibilidad alta y la otra baja, con el fin de controlar la actividad microbiana entre corridas.-

Todos los tubos llevan 50 ml. de licor del rumen y saliva artificial de Mc.Dougall ( 66 ) en la proporción de 1 a 5.-La composición de la saliva artificial es en gramos por litro la siguiente:  $\text{NaHCO}_3$  9,8;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 7,0;  $\text{KCl}$ ; 0,57;  $\text{NaCl}$ , 0,47;  $\text{CaCl}_2$ ; 0,04; y  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,12.-Esta solución debe ser burbujeada vigorosamente con  $\text{CO}_2$  hasta que el pH esté aproximadamente en 6,7 y el burbujeo debe continuarse más suavemente cuando la solución se agrega a los tubos de fermentación.-

La mezcla de buffer y licor del rumen debe mantenerse a temperatura aproximada de 38-39° C. Después de agregar la mezcla, cada tubo es gaseado superficialmente con  $\text{CO}_2$ , cuidando de que una vez tapados los tubos las válvulas funcionen.-Los tubos son incubados a 38-39° C. en la obscuridad por 48 horas, en incubadora.-El pH se determina después de 6 y 24, si es necesario se ajusta a pH 6,9 con  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , ON.-Antes de retornarlos a la incubadora, los tubos deben gasearse nuevamente con  $\text{CO}_2$ .-Durante la incubación los tubos son mezclados a mano 4 o 5 veces para permitir un ataque más uniforme por los microorganismos.-

Después de las 48 horas los tubos se retiran de la incubadora y la actividad bacterial se detiene por el agregado de 1 ml. de  $\text{HgCl}_2$  al 5% a

cada tubo.-Para ayudar a la sedimentación se agrega 2 ml. de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  aproximadamente 1,0N.-Los tubos se centrifugan por 15' a 1.800 g. descargando el líquido sobrenadante

Segunda etapa.- Al residuo insoluble se le agrega 50 ml. de una solución de pepsina ácida.-Esta solución se prepara de la siguiente forma: 2,0 g. de pepsina de 1:10.000 (Chas. Zimmerman and Co. Ltd., Perivale, Middlesex, - England), se disuelve en alrededor de 850 ml. de agua y 100 ml. HCl 1.0N llevando esta solución después de preparada a 1 lt.-Esta solución no es estable y debe prepararse para cada corrida.-

El pH de la solución debe estar entre 1,2 y 1,3 para conseguir la máxima actividad de la enzima.-

Los tubos se incuban por otras 48 horas a 39° C. con mezclado alternado durante este tiempo.-Después de transcurridas las 48 horas los tubos son sacados de la incubadora y centrifugados por 15' a 1.800 g. y el sobrenadante descargado.-El residuo insoluble es lavado con agua destilada y centrifugado nuevamente, luego cada residuo es transferido a crisoles de porcelana siendo secados en estufa a 100°C.-hasta peso constante.-El peso del residuo puede calcularse por sustracción del peso del crisol.-Al residuo de la muestra se le extrae el residuo del blanco (restos bacteriales y partículas de alimento del licor del rumen).-

La digestibilidad de la materia seca se calcula de la manera siguiente:

$$\text{Digestibilidad} = \frac{\text{Peso mtra. - residuo mtra. - residuo blanco}}{\text{peso mtra.}} \times 100$$

La digestibilidad de la materia orgánica se determina por incineración de los residuos indigeridos de la muestra y el blanco, siendo necesario conocer el contenido de materia orgánica de la muestra.-

Método de Chalupa y Lee ( 27 ).-

Este método se empleó para determinar la digestibilidad de la celulosa a las 18 horas y relacionarla con el consumo de materia seca y/o materia seca digerible por unidad de tamaño metabólico.-

Este método consta de una sola etapa.-Se introdujeron algunas modificaciones.-

Muestras de 1 gr. de forraje molido y secado a 100°C. por 16 horas se pesan en duplicado.-Las muestras se transfieren a tubos de centrifuga - provistos de tapones de goma con válvulas para salida de gases.-En cada corrida se colocan como en el método anterior, 2 tubos control que no llevan muestra y otros 2 tubos con celulosa purificada, que sirven para controlar la actividad microbial.-En nuestro caso en dos corridas 4 tubos con celulosa purificada.-

A todos los tubos se le agregan 25 ml. de saliva artificial Mc. Dougall ( 66 ), en este caso fortificada con 23 mg. de urea e igual cantidad de glucosa y 20 ml. de licor del rumen filtrado.-

Las condiciones anaeróbicas se mantienen como en el método de Tilley y Torry ( 85 ) por gaseado con CO<sub>2</sub> sólo al comienzo de la fermentación, dejando librado el mantenimiento de la anaerobiosis a los gases producidos por la fermentación.-

Durante la incubación a 38-39° C. los tubos son mezclados 2 o 3 veces y el pH controlado.-Después de 18 horas de incubación la fermentación es detenida de igual forma que en el método anterior.-Los tubos son centrifugados a 1.800 g. y el sobrenadante descargado.-El residuo insoluble es lavado con agua destilada y centrifugado nuevamente.-Este residuo se guarda en heladera para determinar posteriormente la celulosa residual.-

El método empleado para determinar la celulosa fué el de Crampton y Maynard ( 25 ) con algunas modificaciones.-

La digestión se realiza, en tubos de centrífuga con ebullición suave (baño maría) bajo campana, durante 20'.-Previamente en cada tubo se le agregan 15 ml. de ácido acético 80% y 1,5 ml. de ácido nítrico concentrado.- Por conveniencia los dos ácidos se mezclan y se agrega a cada tubo 16,5 ml. de la mezcla.-Al terminar la digestión los tubos se centrifugan a 2.000 r.p.m. previo agregado de celite y etanol 90%. -El sobrenadante se descarga y el residuo se transfiere, a crisoles Goch lavándolos con etanol caliente 90%, benceno caliente, etanol frío 90% y éter frío.-Los crisoles se secan por 20 horas en estufa a 100° C., se pesan y se incineran a 600° C. por 2 horas.-La celulosa se calcula como pérdida de peso después de incinerado.-

#### Fuentes de inóculo.-

El inóculo se obtuvo en todos los casos de tres capones con fistula del rumen permanente, alimentados ad-libitum con heno de alfalfa.-

Para la extracción del licor del rumen se empleó una bomba de vacío.- El alimento de los capones se retiró 3 horas antes de la extracción en todos los casos.-

Siendo necesario filtrar el licor ruminal antes de proceder a la inoculación de los tubos, durante este período es necesario cuidar que la temperatura se mantenga entre 38 y 39°C.-

RESULTADOS Y DISCUSION

Pruebas de digestibilidad in vivo

El cuadro N° 3 muestra los coeficientes de digestibilidad promedio de la materia seca y materia orgánica de las pruebas in vivo, realizadas con el fin de aumentar el número de observaciones disponibles en la comparación de los dos métodos.-

CUADRO No. 3.-Coeficientes de digestibilidad promedio de la Materia Seca y de la Materia Orgánica medidos in vivo.-

Ración	No.de animales empleados.-	Nivel de alimentación.-	Materia seca	C.V. %	Materia Orgánica	C.V. %
Heno de alfalfa	8	ad-libitum	67,5 ± 2,1	3,1	67,3 2,4	3,6
Trigo molido	3	ad-libitum	89,2 ± 6,0	6,7	91,8 3,5	3,8
Maíz molido	3	ad-libitum	80,8 ± 7,1	8,7	82,4 7,7	9,4
Heno de alfalfa	4	mantenimiento	63,3 ± 3,4	5,5	65,2 8,7	13,5
Harina de girasol	3	mantenimiento	61,07 ± 2,4	3,9	68,7 5,0	7,25
Torta de lino	4	mantenimiento	73,15 ± 5,0	5,8	72,8 5,9	8,22
Paja de lino	4	mantenimiento	37,4 ± 2,5	6,7	38,2 2,7	7,1

Los coeficientes de variación altos, indican una gran variabilidad individual (cuadro apéndice No.2).-Esto estaría explicado en parte por el escaso número de animales empleado, principalmente en las pruebas de concentrado donde por trastornos digestivos se debió eliminar en todos los casos un animal.-Conrad et al. ( 91 ) y Head ( 47 ) encontraron que cuando los forrajes son suplementados con carbohidratos rápidamente digeribles, la diges-

tibilidad de la fibra disminuye.- En este caso la digestibilidad de los concentrado se obtuvo por diferencia, siendo necesario determinar previamente la digestibilidad del heno de alfalfa y sobre esta base se determinó la digestibilidad del concentrado.-Este sería otro factor que aumentaría la diferencia entre los animales.-Como tomamos como base la digestibilidad promedio del heno de alfalfa, este promedio fué aplicado al consumo de heno de cada animal, sin tener en cuenta la variación individual, sumando a esto el comportamiento diferente de cada individuo en la digestibilidad de la fibra, es factible un aumento en el coeficiente de variación.-

La validez de estas pruebas es por tanto limitada.-

#### Pruebas de digestibilidad in vitro.-

##### Digestibilidad in vitro como parámetro para predecir la digestibilidad de los forrajes.-

##### Elección del método.-

Los métodos in vitro propuestos para predecir la digestibilidad de los forrajes básicamente pueden agruparse en dos: 1) la técnica de Ohio (9), en la cual el índice in vitro usado es la digestión de la colulosa.- El inóculo está constituido por suspensiones de células lavadas, requiriendo gaseado continuo de los tubos con  $CO_2$  durante la fermentación.-Una vez obtenida la digestibilidad in vitro de la celulosa es necesario emplear otra relación para determinar el valor nutritivo (N D T).- 2) la técnica propuesta por Tilley et al. ( 84 ), que debido a su sencillez y precisión, está siendo usada en muchos laboratorios.-En esta técnica el parámetro medido in vitro es una expresión directa del valor nutritivo y por tanto se evita la doble predicción.-Esta característica además de la sencillez de instalación y operación nos decidió a preferirla.-



Error dentro y entre corridas.-

Para determinar el error dentro y entre corridas, se sometieron análisis de variancia, los coeficientes de digestibilidad de la materia seca de los standards de digestibilidad alta y baja (cuadro No.4).-

CUADRO No.4.- Error dentro y entre corridas de los standards de digestibilidad alta y baja.-

Standard	No.de corridas	Desviación standard	
		Dentro corridas	Entre corridas
Alto	22	0.93	1,85
Bajo	20	0.84	2,12

Alexander ( 2 ), con su método de filtración, consignó analizando los standards de 14 experimentos reducir la desviación standard entre corridas a 0,61 unidades de digestibilidad.-

Predicción de la digestibilidad de forrajes con la digestibilidad in vitro de la materia seca.-

Para determinar la relación existente entre los coeficientes de digestibilidad de la materia seca in vivo e in vitro, se hallaron coeficientes simples de correlación entre estas dos variables (cuadro No.5).-

CUADRO Nº 5.- Coeficientes de correlación entre digestibilidad de la materia seca in vivo e in vitro.-

Ración	No. de muestras	r
Ryegrass	5	0,97 <sup>xx</sup>
Sudán	18	0,77 <sup>xx</sup>
Henos	20	0,98 <sup>xx</sup>
Ensilajes	6	0,86 <sup>x</sup>
Concentrados	4	0,94 <sup>x</sup>
Mezclas	7	0,96 <sup>xx</sup>

x = significativo al nivel de 5%.-

xx = significativo al nivel de 1%.-

Los coeficientes de correlación para forrajes verdes, así como también para heno, son significativamente diferentes de ~~uno~~ y de la misma magnitud a los encontrados por otros investigadores ( 84, 54, 81 ).-

Con pasto sudán el coeficiente de correlación de 0,77 llama la atención ya que por tratarse de un mismo forraje en distintos estados de crecimiento era de esperar una relación más alta. Si tenemos en cuenta que la pradera no era uniforme, por lo que el forraje cortado para ser ofrecido a los animales estaba constituido por plantas en distintos estados de crecimiento, y siendo los rechazos generalmente superiores a 10% del alimento ofrecido, lo que daba oportunidad a los animales a seleccionar el forraje más tierno, se explicaría en parte la baja relación encontrada.-

Las muestras para las pruebas in vitro se toman del total de forrajes ofrecido sin tener en cuenta la selección por el animal.-

Con ensilajes y concentrados si bien hay relación, el coeficiente es sólo significativo al 5%.-

. Resultados de Harris ( 44 ) con maíz forrajero indican que el método in vitro ostimó en exceso la digestibilidad de la planta.-Esto podría deberse según el autor a que el elevado contenido de almidón produjo un pH in vivo diferente al que se empleó in vitro.-

En nuestro caso no parece ser éste el motivo ya que como se ve en el cuadro apéndice No.3, los valores in vitro para trigo y maíz son similares o más bajos a los obtenidos in vivo.-Devemos recordar, no obstante, lo dudoso de los resultados in vivo.-

Raymond ( 75 ) estudió la digestibilidad in vitro de ocho ensilajes cuya digestibilidad in vivo se conocía, encontrando diferencias entre los dos métodos.- El autor atribuye esta diferencia a cambios en la composición química que incluyen pérdidas de materiales volátiles producidos en el proceso de secamiento con calor antes del análisis.-

Con el fin de dilucidar si la sugerencia de Raymond ( 75 ) era acertada Alexander ( 2 ) seleccionó diez ensilajes que presentaban una amplia variedad en su composición, tipo de fermentación y métodos de preparación.-Los resultados in vivo para determinar la digestibilidad de estos ensilajes la realizó con dos animales/tratamiento, encontrando que los coeficientes de digestibilidad de la materia orgánica estaban entre 60 y 74%.-

Las muestras para las pruebas in vitro las preparó por cuatro métodos diferentes: 1) ensilaje fresco picado, pesado de manera de obtener una muestra de 0,5 g de materia seca; 2) ensilaje picado y secado al vacío a 30° C. hasta 8 a 10% de humedad residual; 3) secado y molido de acuerdo a la táctica normal, el secado posterior para la determinación in vitro lo realizó al aire obteniendo separadamente la humedad residual; 4)

4) siguió el procedimiento que usaba para todos los forrajes en su laboratorio.-

Posteriormente calculó coeficientes de correlación para los cuatro grupos de resultados, confirmando el efecto de secamiento sobre la digestibilidad in vitro (  $r = 0.62$  ).- Los ensilajes frescos dieron mejor relación (  $r = 0.94$  ).-El ensilaje seco al vacío dió un coeficiente de correlación de 0.89.-

En nuestro caso las muestras de ensilaje disponibles habían sido secadas a 90° C., molidos y fueron luego secados durante 16 horas a 100° C. antes del análisis.-El tratamiento dado a las muestras explicaría la baja relación encontrada.-

En el cuadro No. 6 se presentan las ecuaciones de regresión para estimar la digestibilidad de la materia seca.-

CUADRO No.6.- Ecuaciones de regresión para predecir el coeficiente de digestibilidad de la materia seca a partir de la digestibilidad in vitro de la materia seca.-

Ración	No. de muestras	Ecuación	Syx	C.V. %
Ryegrass	5	$Y = 0,91X + 4,90$	2,81	4,42
Mezclas	7	$Y = 0,94X + 6,05$	1,07	1,45
Ensilajes	6	$Y = 2,32X - 65,66$	2,33	4,5
Concentrados	4	$Y = 1,08X - 5,54$	5,09	6,69
Sudán	18	$Y = 1,72X - 44,37$	3,85	6,29
Henos	20	$Y = 1,01X - 2,12$	1,53	2,73

Y Coeficiente de digestibilidad de la materia seca in vivo %

X Coeficiente de digestibilidad de la materia seca in vitro %

Con el fin de determinar si podría emplearse una sola ecuación para predecir la digestibilidad de forrajes verdes, henos ensilajes y concentrados se compararon los coeficientes de regresión, encontrándose que

solamente los ensilajes necesitaban una ecuación individual.-Todas las otras raciones pueden predecirse con una ecuación comun (figura No.1).-

El coeficiente de correlación para 55 muestras fué de 0,92.-El error standard de la ecuación de 3,43 es mayor que el obtenido por Tilley y Terry ( 85 ) de 2,31.-Sin embargo debemos tener en cuenta que en su relación emplearon sólo forrajes verdes.-

Teniendo en cuenta el coeficiente de correlación obtenido con pasto sudán (  $r = 0,77$  ) y las causas que lo motivaron, se realizó una relación con henos, concentrados y forrajes verdes con excepción del pasto sudán.-En este caso (figura No.2) el error standard de la estimación fué de 3,07 y el coeficiente de variación de 4,68%, menor que en el caso en el que incluímos el sudán ( C.V. = 5,37% ), el coeficiente de correlación fué de 0,95.-

Predicción de la digestibilidad de los forrajes con la digestión in vitro de la materia orgánica.-

Teniendo en cuenta, que generalmente, la variación individual encontrada en prueba de digestibilidad in vivo se reduce considerablemente al expresar la digestibilidad en términos de materia orgánica, se examinaron los coeficientes de correlación (cuadro No.7) obtenidos de relacionar la digestibilidad de la materia orgánica por los métodos in vivo e in vitro.-

CUADRO No.7.- Coeficientes de correlación entre la digestibilidad de la materia orgánica in vivo e in vitro.-

Ración	No.de,muestras	r
Ryegrass	5	0,98 <sup>xx</sup>
Concentrados	4	0,93 <sup>x</sup>
Mezclas	7	0,69 n.s.
Sudán	18	0,89 <sup>xx</sup>
Henos	20	0,93 <sup>xx</sup>

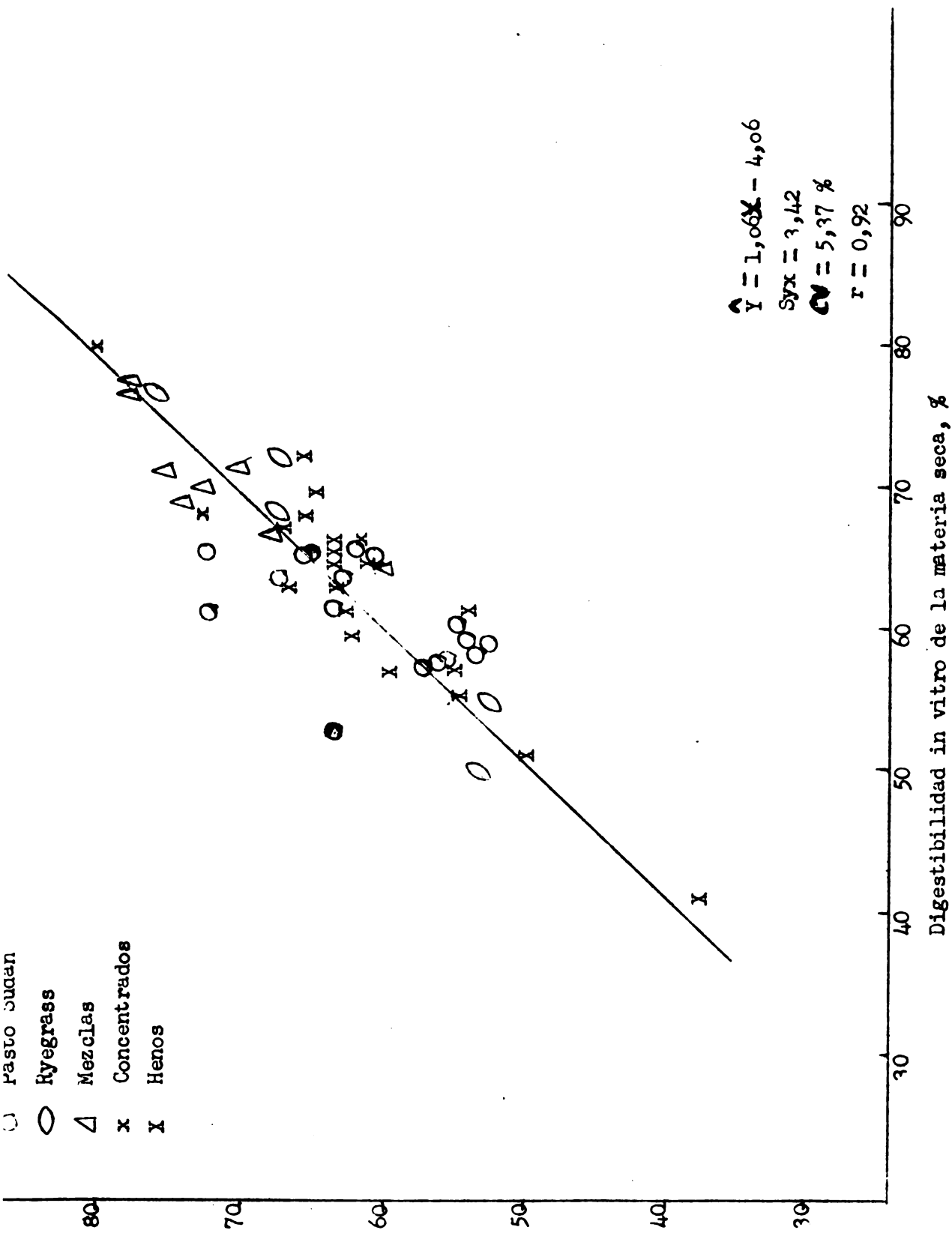
x = significativo al nivel de 5%.-

xx = significativo al nivel de 1%.-

n.s.= no significativo al nivel de 5%.-

- Pasto sudan
- Ryegrass
- △ Mezclas
- x Concentrados
- X Henos

Digestibilidad in vivo de la materia seca, %



Digestibilidad in vitro de la materia seca, %

FIGURA No.1 Relación entre coeficientes de digestibilidad de la materia seca in vivo (Y) e in vitro (X) de henos, concentrados y forrajes verdes (pasto sudán incluido).-

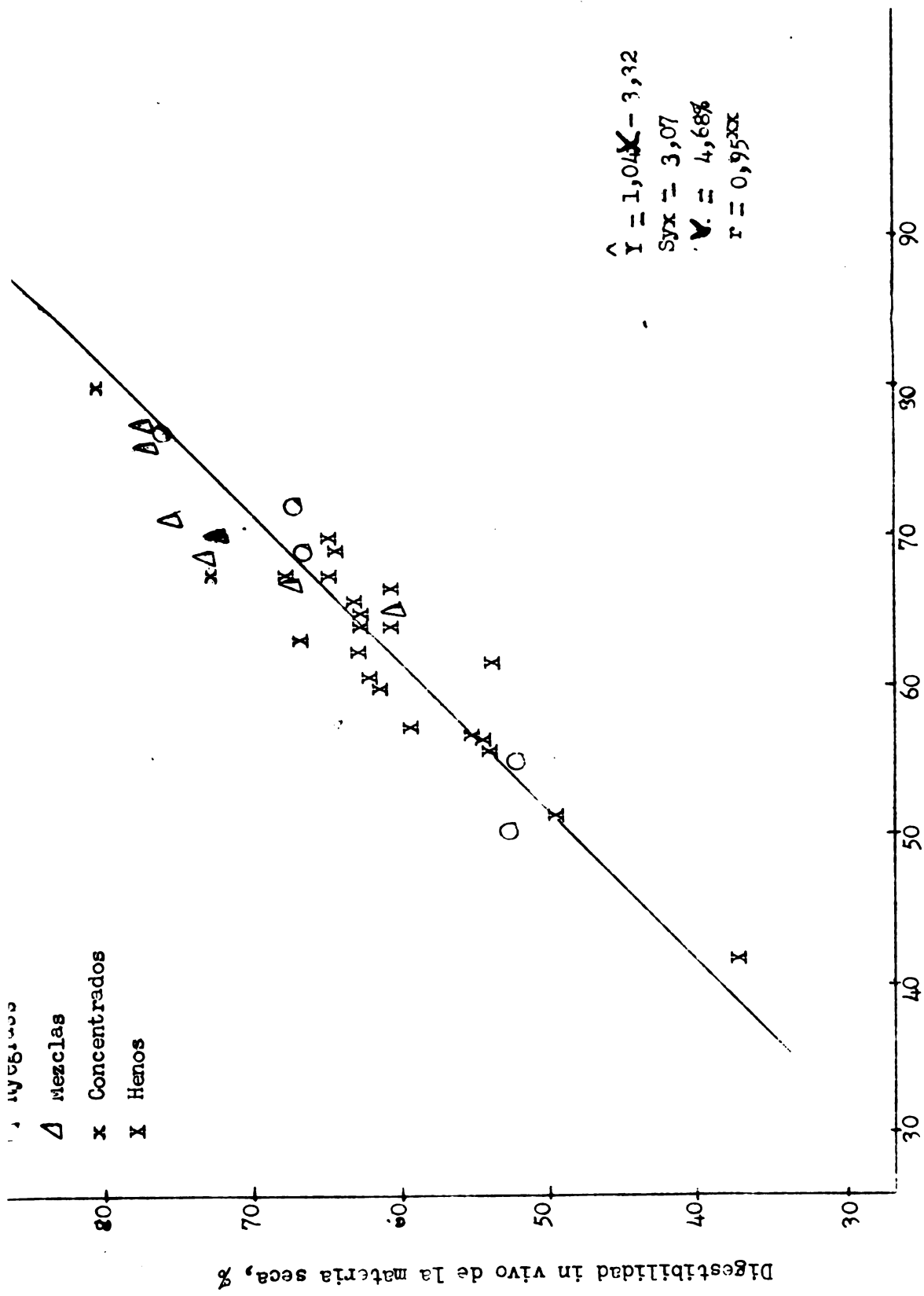


FIGURA No.2.- Relación entre coeficiente de digestibilidad de la materia seca in vivo e in vitro de henos, concentrados y forrajes verdes, (pasto sudán no incluido).-

De una manera general, podría decirse que los coeficientes de correlación se mantienen entre los límites encontrados en la relación con la digestibilidad de la materia seca.-Llama la atención el coeficiente de correlación para mezclas ( 0,69), esto podría explicarse por el hecho de que en las mezclas intervienen el trébol blanco, con un hábito de crecimiento rastroero.-En épocas lluviosas al cortarlo con guadaña para ofrecerlo a los animales en jaula, se arrastra gran cantidad de tierra que se ofrece junto con el forraje a los animales.-Al moler las muestras para las pruebas de laboratorio, se toma todo el forraje ofrecido y por lo tanto también la tierra.-Pero ésta puede perderse en parte en las etapas de secado y molido previas a los análisis.-

En el cuadro No.8 se presentan las ecuaciones de regresión para predecir la digestibilidad de la materia orgánica a partir de la digestibilidad in vitro de la materia orgánica.-

CUADRO No.8.- Ecuaciones de regresión para predecir la digestibilidad de la materia orgánica a partir de la digestibilidad in vitro de la materia orgánica.-

Ración	No. de muestras	Ecuación	Syx	C.V.%
Heno	20	$Y=0,99X+2,39$	3,05	4,93
Ryegrass	5	$Y=0,88X+10,61$	2,89	4,25
Concentrados	4	$Y=1,42X-25,69$	4,70	6,37
Mezclas	7	$Y=0,51X+40,03$	2,00	2,59
Sudán	18	$Y=1,52X-31,4$	3,17	4,92

Y = coeficiente de digestibilidad de la materia orgánica in vivo %

X = coeficiente de digestibilidad de la materia orgánica in vitro %



Como puede verse no se logró en ningún caso con las ecuaciones individuales, disminuir el error de predicción comparado con el obtenido al relacionar la digestibilidad de la materia seca in vivo e in vitro.-

Debemos resaltar que en casi todos los casos (cuadro apéndice No.3) los valores de la materia orgánica in vitro son iguales o más bajos que los de la materia seca.-Este hecho llama la atención ya que generalmente en los resultados in vivo los coeficientes de digestibilidad de la materia orgánica son dos o cuatro unidades de porcentaje superiores a los obtenidos con la digestibilidad de la materia seca.-

Alexander ( 2 ) al comparar su método con el de Tilley y Terry encontró un coeficiente de correlación de 0,994.-La relación con los resultados in vivo fué menor con el método de centrifugación, desviación standard 1,5 comparada con 0,66 obtenida con su método.-

Quizá con el método de Tilley y Terry ( 85 ) durante los lavados se eliminan parte de los minerales, en el animal si bien estos pueden ser absorbidos, podrían ser compensados por el agregado de nuevos minerales aportados por los jugos digestivos y descamaciones de los epitelios, apareciendo por tanto en las heces.-

Por lo que no creemos aconsejable, en nuestras condiciones de trabajo el empleo de la materia orgánica como parámetro del valor nutritivo.-

Posteriormente se compararon los coeficientes de regresión de las ecuaciones individuales, encontrando que no diferían estadísticamente, por lo que se calculó una ecuación general que comprendió 55 muestras (figura No.3); logrando de esta manera disminuir el coeficiente de variación a 3,68% y el error de predicción a 2,44%.-

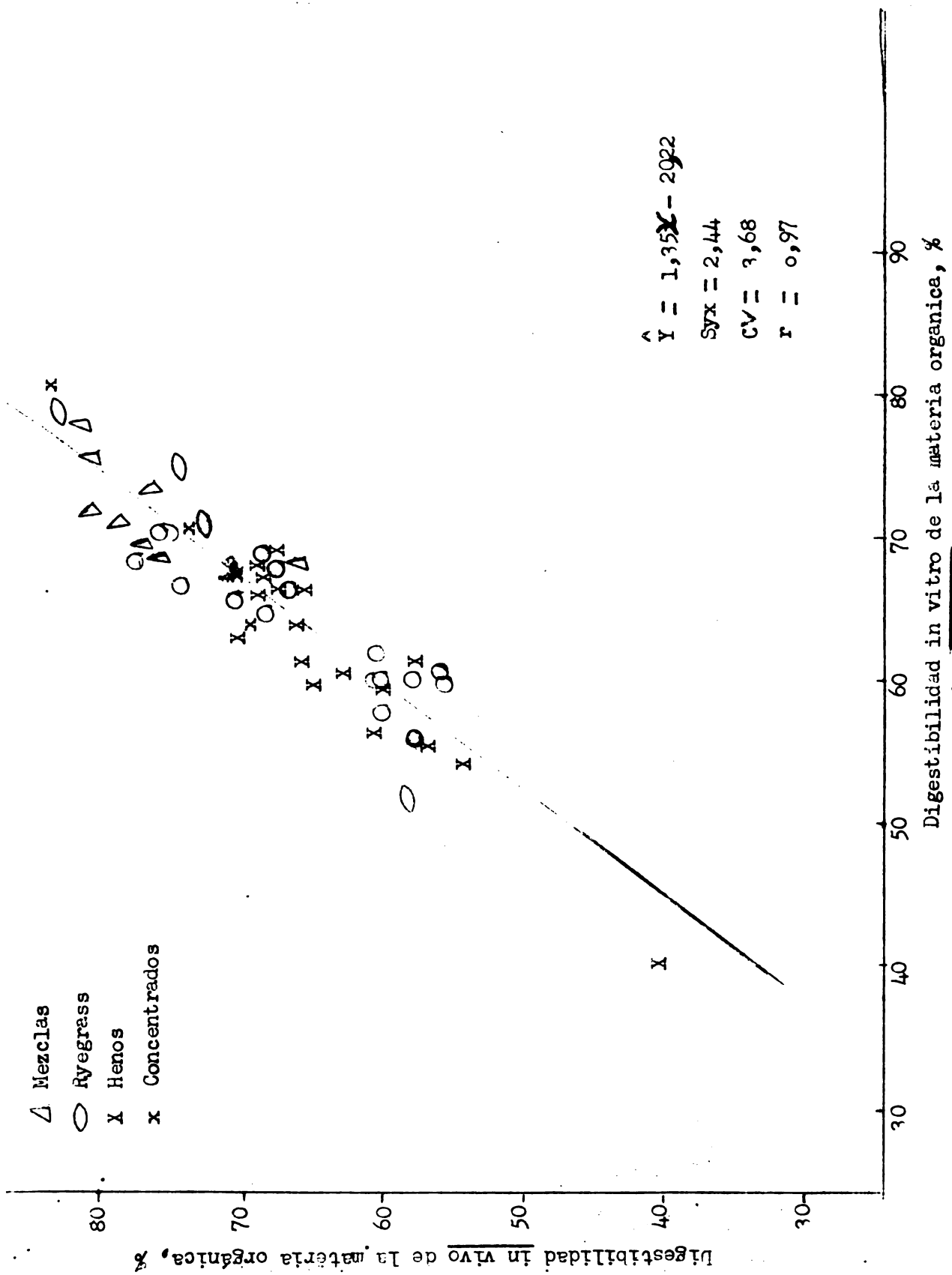


FIGURA No. 3.-Relación entre coeficientes de digestibilidad in vivo e in vitro de la materia orgánica de forrajes verdes, henos y concentrados.-

Si ~~tenemos~~ en cuenta que la predicción de la digestibilidad in vivo a partir de la digestibilidad in vitro depende no sólo de los errores analíticos de los dos métodos, sino que en los resultados in vivo influyen otros factores tales como: 1) variabilidad individual; 2) salud del animal ( 83); 3) variaciones que dependen del empleo de ovinos a bovinos en las pruebas (20); y 4) nivel de consumo ( 15 ), vemos que el empleo de las técnicas in vitro es limitado, -siendo indicado sólo para medir el valor potencial con forrajes en evaluación de variedades y/o en estudios de la contribución de los tallos y hojas sobre la digestibilidad total de la planta, explicando de esta manera los cambios en la digestibilidad que acompañan a la maduración.-

De lo *anterior* se deduce que es indispensable, el empleo de animales en las etapas finales de todo programa de evaluación de pasturas.-

Con los resultados obtenidos en este trabajo y lo dicho anteriormente se puede concluir que el uso de esta técnica in vitro se adecúa a estudios de fitotecnia, ya que los errores en la predicción de la digestibilidad son suficientemente pequeños, máxime si se tiene en cuenta - los factores que influyen en las pruebas in vivo.-

Digestibilidad in vitro como parámetro para predecir el consumo de forraje.-

#### Elección del método.-

Los trabajos de Donefer et al. ( 34 ) y Johnson et al. ( 54 ) indican que el consumo de forrajes puede estimarse por la digestión in vitro de la celulosa a las 12 horas.-El método de Chalupa y Lee ( 27 ) utiliza 18 horas de incubación ya que con este tiempo obtuvieron los coeficientes

de correlación más altos.-

Una explicación de la diferencia en los tiempos de fermentación empleados podría extraerse de los trabajos de Barnes et al. ( 5 ), donde compararon estos métodos, notándose una mayor velocidad de digestión de la celulosa con el método de Ohio ( 9 ).-Esta diferencia fué marcada hasta las 12 horas pero no después de 18, 24 y 48 horas.-Los autores atribuyen esta desigualdad al tamaño de la muestra, medio nutriente y mantenimiento de condiciones anaeróbicas.-

En nuestro caso la elección del método de Chalupa y Lee ( 27 ) se debió a la mayor simplicidad, constancia en los resultados, menor cantidad de material necesario y mayor facilidad de adaptación.-

Error dentro y entre corridas.-

Los coeficientes de digestibilidad promedio para celulosa purificada, (utilizada como standard) de 7 corridas se sometieron a un análisis de variancia (cuadro No.9).-

CUADRO No.9.- Análisis de variancia de coeficientes de digestibilidad in vitro de celulosa purificada.-

Fuentes de Variación	G.L.	C.M.	Fc.
Corridas	6	2,75	1,94 <sup>n.s.</sup>
Error	11	1.42	
Total	17		

n.s. = no significativo al nivel de 5%.-

La desviación standard entre corridas, de 1,6 (raíz cuadrada del cuadrado medio de corridas) es apreciablemente menor a la obtenida por Chalupa y Lee ( 27 ) que fué de 4,8.-La desviación standard dentro de co-

rridas (raíz cuadrada del cuadrado medio del error) fué de 1,2

Predicción del consumo de forrajes con la digestión *in vitro*  
de la celulosa a las 18 horas.-

Se relacionó el consumo de materia seca digerible/ $W^{0,75}$  con el coeficiente de digestibilidad *in vitro* de la celulosa.-

Se calcularon inicialmente coeficientes simples de correlación entre el consumo de materia seca digerible/ $W^{0,75}$  y la digestión *in vitro* de la celulosa (cuadro apéndice No.4).-

Las correlaciones (cuadro No.10) fueron significativas para todos los forrajes verdes, excepto para el rebrote tardío del pasto sudán que se estudió separadamente por comportarse como una población independiente (figura No.4).-Estos coeficientes son de la misma magnitud a los encontrados por Donefer *et al.*(34 ), Johnson *et al.* ( 54 ) Chalupa y Lee (27)

CUADRO No.10.-Coeficientes de correlación entre consumo de materia seca digerible/ $W^{0,75}$  y digestibilidad *in vitro* de la celulosa.-

Forrajes	No. de muestras	r
Pasto Sudán, ler.crecimiento rebrote temprano.-	14	0,87 <sup>xx</sup>
Pasto Sudán, rebrote tardío	4	0,37 n.s.
Ryegrass	5	0,91 <sup>x</sup>
Heno de alfalfa	8	0,54 n.s.
Ensilajes	6	0,28 n.s.
Ryegrass mezclas	13	0,82 <sup>xx</sup>
Total de forrajes verdes	27	0,87 <sup>xx</sup>

x = significativo al nivel de 5%  
xx = significativo al nivel de 1%  
n.s. = no significativo al nivel de 5%

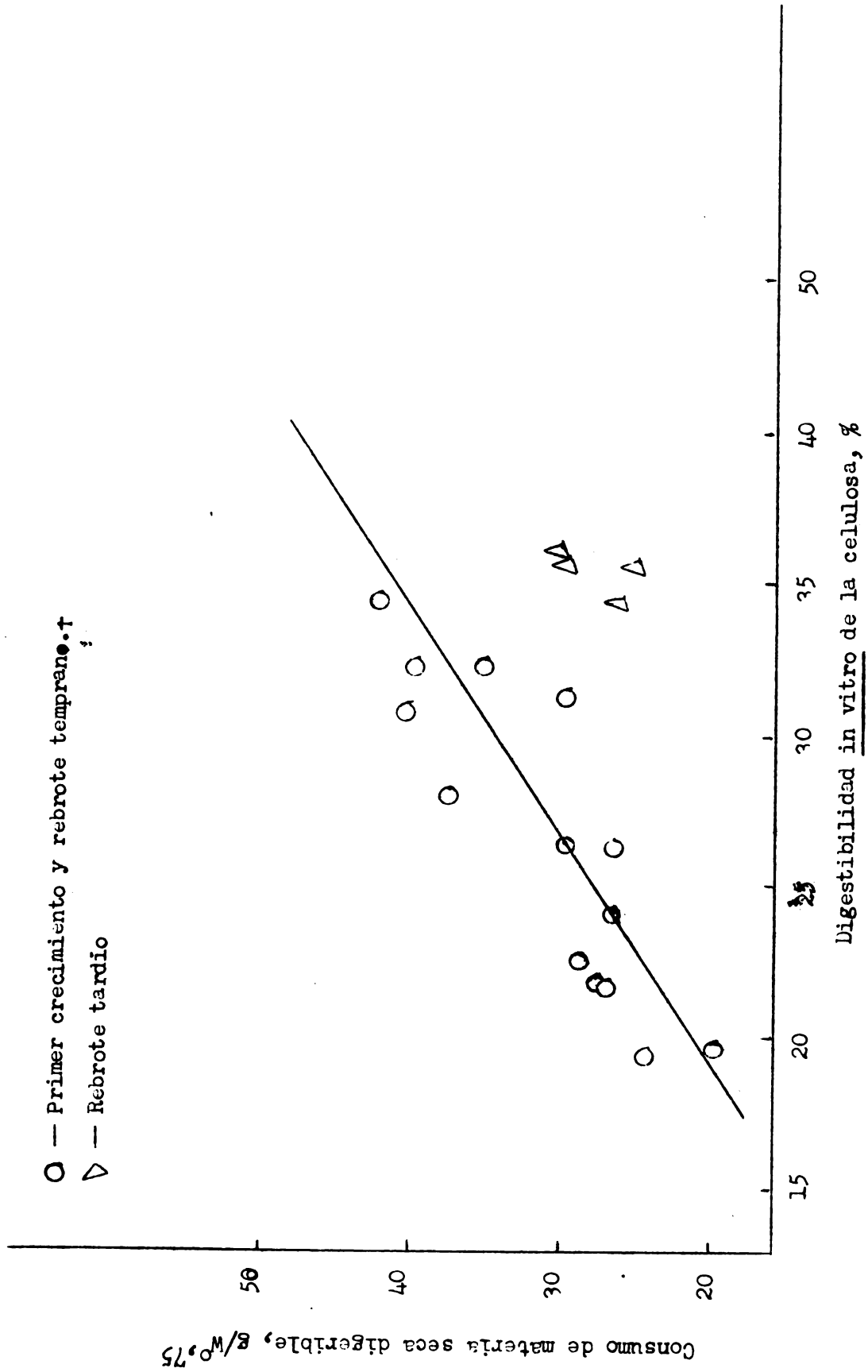


FIGURA No.4.- Relación entre coeficientes de digestibilidad in vitro de la celulosa y el consumo de materia seca digerible del pasto sudán

En el caso del heno de alfalfa el coeficiente de correlación no es significativo, Johnson et al. (54) notaron también que al incluir alfalfa en su relación, el coeficiente de correlación bajaba de 0.95 a 0.86.-Pöckett et al. ( 71 ) estudiando el efecto de la hemicelulosa A y B sobre la digestión de la celulosa in vitro, encontraron que la alfalfa(variedad Vernal) y falaris (Phalaris arundinacea L.) con igual consumo y coeficiente de digestibilidad in vivo de la celulosa, presentaban comportamiento diferente in vitro.-El coeficiente de digestibilidad in vitro de la celulosa para la alfalfa fué de 41% y para el falaris de 25%.-

Los autores sugieren que estas diferencias se pueden deber a que la microflora del rumen utiliza en forma preferencial las pentosanas y sólo utiliza celulosa cuando estas son escasas.-En ese caso los análisis químicos indicaban que el falaris tenía dos veces más hemicelulosa B y pentosanas que la alfalfa, en tanto que el contenido de lignina era 34% mayor en la alfalfa que en el falaris.-

El hecho que a igual nivel de consumo la alfalfa presente una digestibilidad in vitro más alta que el falaris explicaría la baja relación encontrada entre estas dos especies.-

Por otro lado los resultados obtenidos con ensilaje (  $r = 0,28$  ) indican, que en este caso es limitado el uso de esta técnica in vitro para predecir el consumo de materia seca digerible.-

En ensayos in vivo Harris y Raymond ( 45 ) encontraron, que si bien la digestibilidad del silo es similar a la del forraje original, el consumo voluntario de materia seca es menor que la del forraje correspon-

diente.-Esto explicaría, por lo menos en parte, la baja correlación encontrada.-

Campling ( 19 ) investigó si el consumo ~~si~~ el consumo voluntario del ensilaje era controlado por el volumen de ingesta y la velocidad de desaparición de ésta del retículo rumen como sucedía en el heno.-El autor concluye, que aunque los datos son preliminares y requirieron confirmación, el consumo voluntario de ensilaje no está limitado por la capacidad del retículo rumen, ya que las vacas dejaron de comer ensilaje antes que el contenido del retículo rumen fuera igual al encontrado con heno.-

Otro factor de importancia en el consumo de ensilaje constituye el contenido de materia seca.-Alguna información publicada ( 46, 43 ) demuestra que el consumo de ensilaje aumenta en forma lineal con el aumento en materia seca.-Esta relación es más precisa en los ensilajes con menos de 50% de materia seca y más variable, pero aún positiva, por sobre este nivel.-

Gordón et al. ( 43 ) observaron que un aumento en el contenido de materia seca estaba asociado generalmente con una disminución el contenido de nitrógeno amoniacal, de lo que se puede inferir que el aumento de compuestos nitrogenados fácilmente desaminables, influirían sobre el consumo.-

Moore et al. ( 67 ) y Thomas et al. ( 87 ) estudiaron el efecto del agua per-se sobre el consumo voluntario de ensilaje en vacas, agregando el agua directamente antes de suministrar el alimento.-La adición de agua no afectó la cantidad de forraje consumido.-De estas observaciones los autores concluyeron que contenido de agua per-se, no afecta el consumo de materia seca de ensilaje por los rumiantes.-

Posteriormente Moore et al.( 67 ) alimentaron a nueve vacas con heno humedecido con efluente del silo para determinar si la aceptabilidad dis-



minuía por la presencia de algunos constituyentes que se desarrollaban en el proceso de fermentación del ensilaje y que se recogían en el efluente.- Los autores encontraron una reducción en el consumo de materia seca, lo que indicaría que algunos constituyentes del efluente, modificarían la aceptabilidad del ensilaje o apetito de los rumiantes.-

Se probó entonces dar el efluente directamente en el rumon de vacas fistuladas ( 25 lb./día con un contenido de materia seca de 6-7%) notandose una reducción en el consumo de materia seca del heno.-Lo que sugiere un efecto directo sobre el apetito del animal.-Resultados similares obtuvieron Thomas et al. ( 87 ).-

De lo anterior, se deduce que los factores que regulan el consumo del forraje ensilado son muchos y no están aclarados, por lo que es lógico no encontrar correlación entre las variables estudiadas, ya que la digestibilidad in vitro de la celulosa mide un atributo básico del alimento y no puede reflejar los cambios que se producen como consecuencia de otros procesos impuestos sobre el forraje.-

Al relacionar el consumo de materia seca/ $W^{0,75}$  con la digestibilidad in vitro de la celulosa (cuadro No.11) se encontró en todos los casos coeficientes de correlación bajos salvo con pastos sudán (1er. crecimiento y rebrote temprano) y mezclas más ryegrass.-

Con ryegrass reto se encontro una relación negativa (  $r = 0,63$  ). Sin embargo, este resultado que no parece lógico está de acuerdo con los datos in vivo de consumo (cuadro apéndice No.4), ya que éste fué menor en las primeras etapas de crecimiento de ryegrass y fué aumentando a medida que el forraje maduraba.-Esto podría deberse a que los primeros cor-

tes se hicieron tardíamente, con el forraje muy alto, produciéndose fermentaciones ( putrefacción) que lo hacían menos apetecible.-

CUADRO No.11.-Relaciones entre consumo de materia seca, (C.M.S.) y digestibilidad in vitro de la celulosa (D.C.)

Ración	No.de muestras	C.M.S./D.C.
Sudán ler.crecimiento, rebrote temprano	14	0,78 <sup>xx</sup>
Sudán rebrote tardío	4	0,65 n.s.
Ryegrass	5	-0,63 n.s.
Alfalfa	9	0,20 n.s.
Ensilajes	6	0.50 n.s.
Mezclas Ryegrass	15	0,65 <sup>xx</sup>

n.s. = no significativo al nivel de 5%.

xx = significativo al nivel de 1%.

Las ecuaciones de regresión para estimar el consumo de materia seca digerible/W 0.75 in vivo por la digestión in vitro de la celulosa a las 18 horas para forrajes verdes se presentan en el cuadro No.12.-

CUADRO No.12.- Ecuaciones de regresión para predecir el consumo de materia seca digerible/W 0,75 a partir de la digestión in vitro de la celulosa a las 18 horas.-

Ración	No.de muestras	Ecuación	S <sub>xy</sub>	C.V.%
Ryegrass	5	Y=17,4+0,52X	1.68	5,53
Ryegrass-mezclas	13	Y=15,9+0,58X	2.29	6.45
Sudán ler, croc, rebrote temprano	14	Y=0,27+1,16X	3,52	11,37
Total	27	Y=12,47+0,69X	3,44	10,4

Y = Consumo de materia seca, g/W 0,75

X = Digestibilidad in vitro de la celulosa a las 18 horas,%.-

Si consideramos los errores standard de las estimaciones y los coeficientes de variación, podemos observar que las estimaciones son bastantes precisas ya que las medidas de consumo in vivo son variables.-

El error standard para la ecuación general (figura No.5) que en nuestro caso comprende 27 muestras fué de 3,44, mayor que el obtenido por Chalupa y Lee ( 27 ) que fué de 2,81.-El coeficiente de variación de 10,4% contrasta con el de Chalupa y Lee ( 27 ) que fué 5,15%. Hay que notar sin embargo que nosotros no ajustamos los resultados por medio de un forraje standard, como lo hicieron ellos en todas las corridas.-De esta manera ellos obtuvieron una reducción en el coeficiente de variación de 16,14% a 7,33% en las comparaciones hechas con los forrajes standard.-

La ecuación y el coeficiente de variación presentados en su trabajo ( 27 ) están ajustados no dando el coeficiente de variación obtenido cuando no ajustaban los valores, de ahí la diferencia entre los dos coeficientes de variación ajustados, presentados en esta discusión.-

Se debe resaltar, el aumento en el coeficiente de variación, cuando se incluyen las observaciones de pasto sudán de 6,45% a 10,4%. -El error standard de la ecuación aumentó también cuando se incluyó el pasto sudán de 2,29 a 3,44.-Como se recordará al emplear el método de Tilley y Torry ( 85 ) los resultados con el pasto sudán no eran muy satisfactorios y las mismas causas que motivaron la baja correlación en aquel caso deben también ser consideradas.-

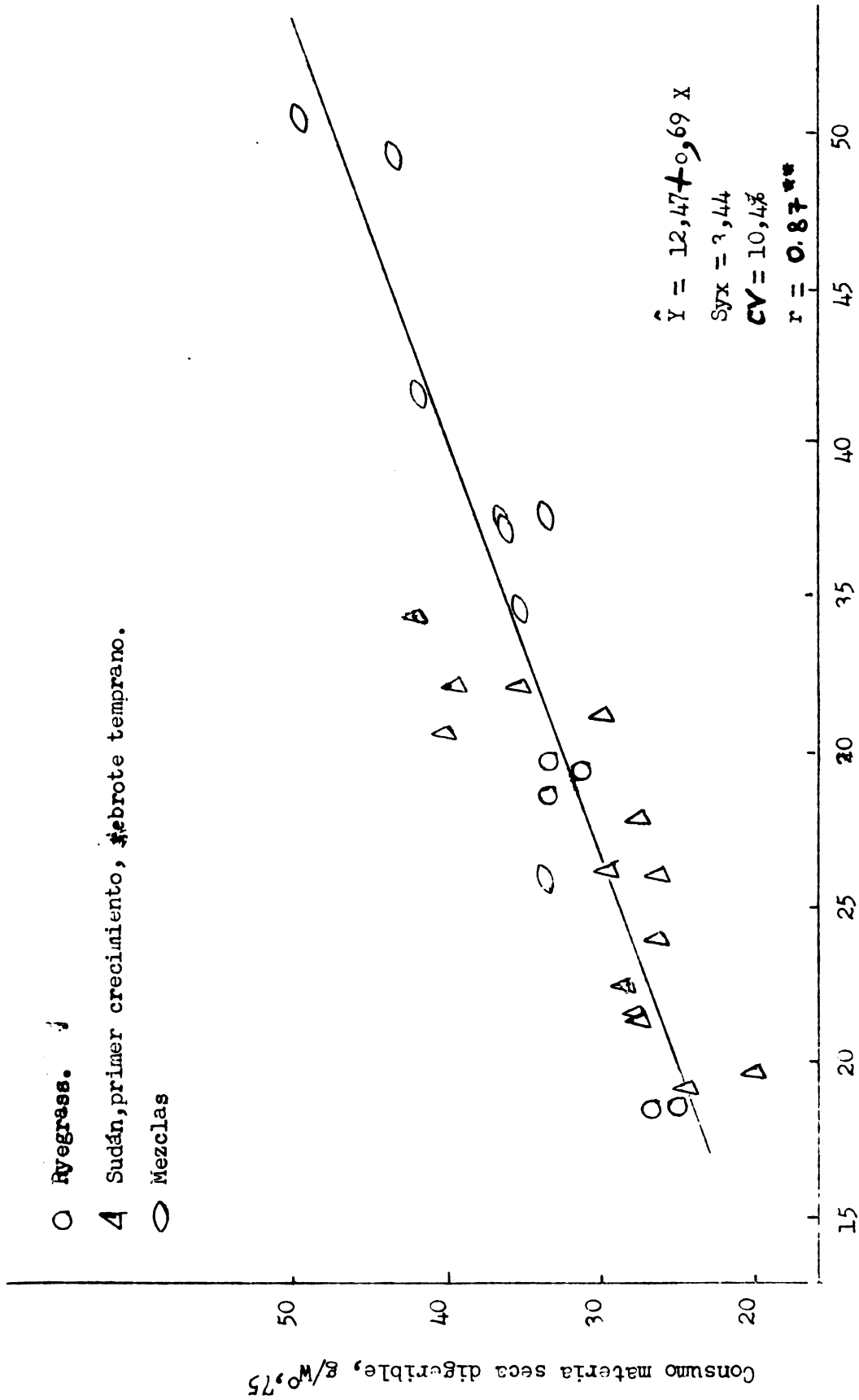


FIGURA No.5.- Relación entre consumo de materia seca digerible y la digestibilidad in vitro de la celulosa a las 18 horas en forrajes verdes

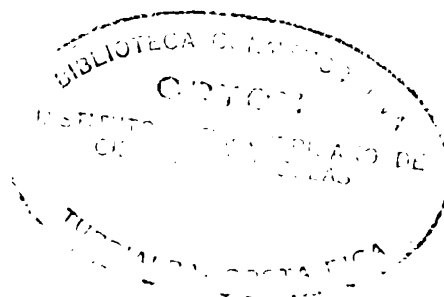
CONCLUSIONES

1o.- Empleando el método de Tilley y Terry ( 85 ) para predecir la digestibilidad.-

- a) La constancia de los resultados es satisfactoria (error dentro y entre corridas para el standard alto fué de 0,93 y 1,85 para el standard bajo de 0,84 y 1,12).-
- b) Los coeficientes de correlación elevados, obtenidos en un rango amplio de forrajes, permite la aplicación de este método en la evaluación de forrajes.-
- c) El error de predicción de 3,43 de los resultados in vivo es pequeño, esto se cumple también en las ecuaciones individuales.-
- d) La digestibilidad puede predecirse por una única ecuación para forrajes verdes, henos y concentrados; los ensilajes necesitan una ecuación individual.-

2o.- Empleando el método de Chalupa y Lee ( 27 ) para predecir el consumo.-

- a) La constancia de los resultados es satisfactoria (error dentro y entre corridas de 1,2 y 1,6 respectivamente).-
- b) El error de predicción en el consumo de materia seca digerible para forrajes verdes permite el empleo de esta técnica máxime teniendo en cuenta las variaciones obtenidas al medir el consumo in vivo.-
- c) No es posible predecir el consumo de materia seca digerible en los ensilajes a partir de la digestibilidad in vitro de la celulosa.-
- d) Con heno de alfalfa no se encontró relación significativa entre consumo de materia seca digerible y la digestibilidad in vitro de la celulosa.-



RESUMEN

Con el fin de establecer la técnica de digestibilidad in vitro, sus limitaciones y la exactitud en la predicción de digestibilidad y consumo de forrajes verdes, henos, ensilajes y concentrados se realizó un estudio comparativo de los resultados obtenidos in vivo e in vitro.-

Las muestras de forrajes estudiadas, provenían de experimentos realizados en el Laboratorio de Nutrición de La Estanzuela durante los años 1964-1966 inclusive; con un total de 54 muestras.-Para obtener mayor información se realizaron pruebas in vivo con heno de alfalfa, paja de lino, trigo, maíz, harina de girasol y torta de lino.-La digestibilidad de los concentrados se obtuvo por diferencia, usando como diota básica al heno de alfalfa.-

La técnica in vitro empleada para determinar la digestibilidad de la materia seca y materia orgánica fué la de Tilley y Terry ( 85 ).-

Para predecir el consumo se empleó la técnica de Chalupa y Lee ( 27 ).-Se encontró que la correlación entre la digestibilidad in vitro de la materia seca, determinada con éste método (Tilley y Terry, (85) y la digestibilidad in vivo fué de 0,92, cuando se realizó una relación general que incluyó las observaciones realizadas en forrajes verdes - ( gramíneas y leguminosas ), henos y concentrados.-La correlación elevada y el error standard de la predicción de 3,43 unidades de digestibilidad hacen el empleo de esta técnica adecuado.-La constancia de las determinaciones in vitro se midió en el análisis repetido de dos muestras de forrajes standard de digestibilidad alta y baja, encontrándose que el error dentro de corridas y entre corridas para los standards alto y bajo fué de 0,93 y 1,85 respectivamente.-Este grado de constancia se conside-

ra adecuado para este tipo de trabajo, máxime si se toma en cuenta la variabilidad de las pruebas in vivo.-

Los ensilajes presentaron un comportamiento diferente siendo necesario emplear en su predicción una ecuación individual.-

Con forrajes verdes la técnica in vitro empleada fué satisfactoria para predecir el consumo de materia seca digerible; siendo el error de predicción de 3,44% y el coeficiente de variación de 10,4%. Cuando se incluyeron las observaciones de pasto sudán, aumentó el coeficiente de variación de 6,45 a 10,4%. El error standard aumento de 2.29 a 3,44%.-

Para ensilajes y heno de alfalfa (método de Chalupa y Lee (27)) los coeficientes de correlación fueron de 0,28 y 0,54 no significativos estadísticamente, por lo que en estos dos casos el empleo del método in vitro es limitado.-

SUMMARY

The objectives of this work were to establish in vitro techniques in the laboratory, and to assess their limitations and accuracy in predicting in vivo digestibility and feed intake of fresh forage, hay, silage and concentrates.- A comparative study was made of the results obtained by in vivo and in vitro methods.-

A total of 54 forages samples of known in vivo digestibility were obtained from trials carried out by the IICA Nutrition Unit at La Estanzuela during the years 1964-66.-To obtain more in vivo digestibility data for comparison with in vitro results, further in vivo trials were carried out with alfalfa, hay flax straw and concentrates (corn, wheat and sunflower meal and linseed cake).-The concentrates were fed with alfalfa hay and the digestibility in each case was calculated by difference.-Dry matter and ash on all feed and faeces samples were determined.-

The method of Tilley and Terry (35) was used as a direct measurement of organic and dry matter in vitro digestibility .-The technique was found to be adequate for predicting in vivo dry matter digestibility of fresh forage, hays and concentrates.-Prediction errors were greater with silage and a separate regression equation was found necessary.-Organic matter digestibility results gave a poor correlation with in vivo results, but it was noted that whereas organic matter in vivo results are normally 2-4 digestibility units higher than those of dry matter this was not so with in vitro analysis where they were principally the same or less.-This indicates a marked difference in the apparent digestibility of the ash content of the feed between in vitro and



in vivo results, and that further work is necessary to determine what factors in in vitro analysis give a biased result with in vivo.-

The method of Chalupa and Lee ( 27 ) was used for predicting feed intake.-The technique was found to be significantly accurate for fresh forage but not so for alfalfa hay or silage.-The large differences between in vivo and in vitro digestibilities of alfalfa hay have been found by other workers ( 71 ) and confirm the need to study the difference in behaviour of grasses and legumes as conserved pasture in in vitro cellulose digestibility analyses.-The statistically insignificant prediction of intake found with silage samples is in agreement with other workers ( 45, 19, 46, 43, 67, 87 ) who found that many factors inherent in the preparation of silage affect its palatability and/or consumption.-

LITERATURA CITADA

- 1.- ALEXANDER, R.H. y MCGOWAN, M. 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.
- 2.- ----- Establecimiento de un sistema de digestibilidad in vitro en el laboratorio. In Simposio sobre determinación del valor nutritivo de los forrajes. Colonia Suiza, Uruguay, 1966. La Estanzuela (Colonia). Centro de Investigaciones y Enseñanza para la Zona Templada, 1966. p. irr. (Mimeografiada).
3. ARROYO-AGUILU, J.A., EVANS, I.L. y TAYLOR, M.W. The artificial technique for estimating the nutritive value of forage. Journal of Agriculture of University of Puerto Rico 47:169. 1963. (Original no consultado, citado por Chalupa, W. y Lee, D.D. Jr. Estimation of forage Nutritive Value from in vitro cellulose digestion. Journal of Dairy Science 49(2):192. 1966.
4. BALCH, D.A. y ROWLAND S.J. Volatile fatty acids and lactic acid in the rumen of dairy cows receiving a variety of diets. British Journal Nutrition 11(3):288-298. 1957.
5. BARNES R.F. et al. Comparison of in vitro rumen fermentation methods. Journal of Animal Science 23(4):1061-1065. 1964.
6. ----- Use of in vitro rumen fermentation technique for estimating forage digestibility and intake. Agronomy Journal 57(2):213-216. 1965.
7. ----- The development and application of in vitro rumen fermentation techniques. In International Grassland Congress, 10th Helsinki, 1966. Proceedings. Reading 1966. pp. 434-438.
8. ----- Colaborativo in vitro rumen fermentation studies on forage substrates. Journal Animal Science 1966. En prensa (Original no consultado citado por Johnson R.R. Techniques and procedures for in vitro and in vivo rumen studies. Journal of Animal Science 25(3):872. 1966.
9. BENTLEY, O.G. et al. Studies on factors needed by rumen microorganisms for cellulose digestion in vitro. Journal of Animal Science 13(3): 581-593. 1954.
10. 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.
11. BAUMGARDT, B.R., TAYLOR, M.W. y GASON J.L. Evaluation of forages in Laboratory. II. Simplified artificial rumen procedure for obtaining repeatable estimations of forage nutritive value. Journal of Dairy Science 45(1):62-68. 1962.

12. ----- y HO, HIKON. 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.
13. ----- y HO, HIKON. Estimation of forage digestibility by laboratory methods. *Journal Dairy Science* 48(6):824. 1965. (extracto).
14. BOWDEN, D.M. y CHURCH, D.C. Artificial rumen investigations. II. Correlations between in vitro and in vivo measures of digestibility and chemical components of forages. *Journal of Dairy Science* 45(8):980-985. 1962.
15. BLAXTER, K.L. The energy metabolism of ruminants. London, Hutchinson. 1962. pp 192-194.
16. ----- WAINMAN, F.W. y WILSON, R.S. The regulation of food intake by sheep. *Animal production* 3(1):51-61. 1961.
17. BRIGGS, P.K., HOGAN, J.P. y REID, R.L. The effect of volatile fatty acids, lactic acid, and ammonia on rumen pH in sheep. *Australian Journal of Agricultural Research* 8(6):674-690. 1957.
18. CAMPLING, R. Factors affecting the voluntary intake of grass. *Journal of the British Grassland Society* 19(1):110-118. 1964.
19. ----- The intake of hay and Silage by cows. *Journal of the British Grassland Society* 21(1):41-48. 1966.
20. CIPOLLONI, M.A. et al. Significance of the differences in digestibility of feeds by cattle and sheep. *Journal of Animal Science* 10(2):337-343. 1951.
21. CONRAD, R.H. y HIBBS, J. A high roughage system for raising dairy calves based on the early development of rumen function. III. Effect of rumen inoculations and the ratio of hay to grain on digestion and nitrogen retention. *Journal of Dairy Science* 36(12):1326-1334. 1953.
22. CLANCY, M.J. y WILSON R.R. Development and application of a new chemical method for predicting the digestibility and intake of herbage sample. In International Grassland Congress, 10th Holsinski, 1966. Holsinski, 1966. pp.445-453.
23. CLARK, K.W. y MOTT, C.O. The Dry matter digestion in vitro of forage crops. *Canadian Journal of Plant Science* 40(1):123-129. 1960.

24. CRAMPTON, E.W. Interrelations between digestible nutrient and energy content, voluntary dry matter intake, and overall feeding value of forages. *Journal of Animal Science* 16(3); 546-522. 1957.
25. ----- y MAYNARD, L.A. The relation of cellulose and lignin content to nutritive value of animal feeds. *Journal of Nutrition* 15:383-395. 1938. (fotocopia).
26. -----, DONEFER, E. y LLOYD, L.E. A nutritive value index for forages. *Journal of Animal Science* 19(2):538-544. 1960.
27. CHALUPA, W. y LEE, D.D. Jr. Estimation of forage nutritive value from in vitro cellulose digestion. *Journal of Dairy Science* 49(2):188-192. 1966.
28. DEHORITY, B.A. Effect of particle size on the digestion rate of purified cellulose by rumen cellulolytic bacteria in vitro. *Journal of Dairy Science* 44(4):687-692. 1961.
29. ----- y JOHNSON, R.R. Forage cellulose solubility as an estimate of cellulose digestibility and nutritive value of forage. *Journal of Animal Science* 20(4):959. 1961.
30. ----- y JOHNSON, R.R. Effect of particle size upon the in vitro cellulose digestibility of forages by rumen bacteria. *Journal of Dairy Science* 44(12):2242-2249. 1961.
31. ----- y JOHNSON, R.R. Cellulose solubility as an estimate of cellulose digestibility and nutritive value of grasses. *Journal of Animal Science* 22(1):222-225. 1963.
32. ----- y JOHNSON, R.R. Estimation the digestibility and nutritive value of forages by cellulose and dry matter solubility methods. *Journal of Animal Science* 23(1):203-207. 1964.
33. DENT J.W. Applications of the two stage in vitro digestibility method to variety-testing. *Journal of the British Grassland Society* 18(3):181-189. 1963.
34. DONEFER, E. CRAMPTON, E.W. y LLOYD, L.E. Prediction of nutritive value index of a forage from in vitro rumen fermentation data. *Journal of Animal Science* 19(2):245-522. 1960.
35. ----- 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.
36. ----- 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.

- 37.- ----- CRAMPTON, E.W. y LLOYD, L.E. The prediction of digestible energy intake potencial (NVI) of forages using a simple in vitro technique. In International Grassland Congress, 10th. Helsinki 1966. Proceedings. Helsinki, 1966. pp.442-445.
38. ----- El uso de métodos in vitro y otro método de laboratorio para predecir el consumo potencial de energía digerible de los forrajes. In Simposio sobre determinación del valor nutritivo de los forrajes. Métodos in vitro. La Estanzuela. Colonia. Centro de Investigaciones y Enseñanza para la Zona Templada, 1966. pp. (Mimeografiada).
39. DYNE, G.M. VAN. Micro-methods for nutritive evaluation of range forages. Journal of Range management 15(6):303-314. 1962.
40. EL SHAZLY, K., DEHORITY, B.A. y JOHNSON, R.R. A comparison of the all glass, semipermeable membrane and continous flow types of aparatus for in vitro rumen fermentations. Journal of Dairy Science 43(10):1445-1451. 1960.
41. ERWIN E.S. y ELLISTON, N.G. Rapid method of determining digestibility of concentrates and roughages in cattle. Journal of Animal Science 18(4):1518. 1959. (extracto).
42. FERRANDO, R. y CATSAQUIS, N. Etude comparative chez le mouton de la digestibilité appaarente in vivo et de la digestion des fours au niveau du rumen a L'aide de sacs en nylon suspendus a l'intérieur. Recueil de Medicine Veterinaire de l'ecole D'Alfort, 141 (4):331-343. 1965.
43. GORDON, J.C. et al. Consumption and feeding value of silages as effected by dry matter content. Journal of Dairy Science 43(6): 866-867. 1960.
44. HARRIS, C.E. Comparison of in vivo and in vitro measurements of digestibility of fodder crops. Journal of the British Grassland Society 18(3):189. 1963.
45. ----- y RAYMOND, W.F. The effect of insiling on crop digestibility. Journal of the British Grassland Society 18(3):204-212. 1963.
46. ----- y WILSON, R.F. Studies in herbage conservation. In Experiments in Progress No.17. Hurley, 1964. pp.62-63.
47. HEAD, M.S. The effect of quality and quantity of carbohydrate and protein in the ration of the sheep on the digestibility of cellulose and other constituents of the ration, with a note on the effect of adding vitamins of the B complex on the digestibility and retention of the nutrients of a hay ration. Journal of Agricultural Science 43(3):281-293. 1953.

48. HOPSON, D.J. JOHNSON R.R. y DEHORITY, B.A. Evaluation of the dracon bag technique as a method for measuring cellulose digestibility and rate of forage digestion. Journal of Animal Science 22(2):448-453. 1963.
49. HUHTANEN, C.N. SAUNDERS, R.K. y GALL, L.S. Fiber digestion using the miniature artificial rumen. Journal of Dairy Science 37(3):328-335. 1954.
50. ----- y ELLIOT, R. Factors influencing in vitro rumen cellulose digestion. Journal Animal Science 15(4):1180-1187. 1956.
51. JOHNSON, R.R. DEHORITY, B.A. y BENTLEY, O.G. Studies on the in vitro rumen procedure improved inoculum preparation and the effect of volatile fatty acids on cellulose digestion. Journal of Animal Science 17(3):841-850. 1958.
52. ----- EL SHAZLY, K. y DEHORITY, B.A. Effect of starch on the digestion of cellulose in vitro and in vivo by rumen microorganisms. Journal of Animal Science 19(4):1268. 1960. (extracto).
53. ----- et al. Relationship of in vitro cellulose digestibility of undried and dried mixed forages to their in vivo dry matter digestibility. Journal of Dairy Science 45(2):250-252. 1962.
54. ----- et al. Discrepancies between grasses and alfalfa when estimating nutritive value from in vitro cellulose digestibility by rumen microorganisms. Journal Animal Science 21(4): 892-896. 1962.
55. ----- et al. A comparison of in vitro fermentation and chemical solubility methods in estimating forage nutritive value. Journal of Animal Science 23(4):1124-1128. 1964.
56. ----- Symposium on microbial digestion in ruminants in vitro rumen fermentation techniques. Journal of Animal Science 22(3):792-800. 1963.
57. ----- Techniques and procedures for in vitro and in vivo rumen studies.. Journal of Animal Science 25(3):855-875. 1966.
58. KAMSTRA, L.D., MOXON, A.L. y BENTLEY, O.G. The effect of stage of maturity and lignification on the digestion of cellulose in forage plants by rumen microorganisms in vitro. Journal of Animal Science 17(1):199-208. 1958.
59. KEUREN, R.W. VAN y HEINEMANN, W. Study of a nylon bag technique for in vivo estimation of forage digestibility. Journal of Animal Science 21(2):340-345. 1962.

60. LEWIS, D. Fisiología digestiva y nutrición de los rumiantes. Traducido del inglés por Pascual López Lorenzo. Zaragoza, Acribia, 1962. 339 p.
61. LLOYD, L.E. Effect of four maturity stage of timothy hay on its chemical composition, nutrient digestibility and nutritive value index. *Journal of Animal Science* 20(3):468-473. 1961.
62. OWEN, J.G. WILLIAMS, H.H. y MYNARD, L.A. A new method for the study of in vitro rumen digestion. *Science* 110:478. 1949. (original no consultado citado por Johnson, R.R. Symposium on microbial digestion in ruminants, in vitro rumen fermentation technique. *Journal of Animal Science* 22(3):792-800. 1963.
63. LUSK, J.W. BROWNING, C.B. y MILES, J.T. Small sample in vivo cellulose digestion procedure for forage evaluation. *Journal of Dairy Science* 45(1):69-73. 1962.
64. MARSTON, H.R.. The fermentation of cellulose in vitro by organisms from the rumen of sheep. *Biochemical Journal* 42(4):564-574. 1948.
65. MERRILL, W.G. et al. Effect of foliar application of urea on the yield and nutritive value of some grass hays. *Journal of Animal Science* 20(4):785-795. 1961.
66. Mc DOUGALL, E.I. Studies on ruminant saliva. I. The composition and output of sheep's saliva. *Biochemical Journal* 43(1):99-109. 1948.
67. MOORE, L.A., THOMAS, J.W. y SYKES, J.F. The acceptability of grass legume silage by dairy cattle. In International Grassland Congress, 8th., University of Reading, 1960. Proceeding. Reading, 1960. pp. 701-704.
68. O'SHEA, J. y WILSON, R.K. Relationship between in vitro and in vivo dry matter digestibility. *Irish Journal of Agricultural Research* 4:235-237. 1965. (Original no consultado compendiado en *Nutrition Abstracts e Reviews* 36(3):854. 1966.
69. CHAIKON y BAUMGARDT, B.R. Evaluation of forages in the laboratory. V. Comparison of chemical analyses solubility tests and in vitro fermentation. *Journal of Dairy Science* 49(7):850-855. 1966.
70. PALADINES, O.L. et al. Energy utilization by sheep as influenced by the physical form, composition and level of intake of diet. *Journal of Nutrition* 83(1):49-59. 1964.

71. PACKETT, L.V. et al. Influence of hemicellulose A y B on cellulose digestion, volatile fatty acid production and forage nutritive evaluation. *The Journal of Nutrition* 85(1):89-101. 1965.
72. PIGDEN, W.J. y BELL, J.M. The artificial rumen as procedure for evaluation forage quality. *Journal of Animal Science* 14(4): 1239-1240. 1955.
73. QUICKE, G.V. et al. Cellulose digestion in vitro as a measure of the digestibility of forage cellulose in ruminants. *Journal of Animal Science* 18(2):275-287. 1959.
74. RAYMOND, W.F. y TERRY, R.A. Estudios sobre la digestibilidad de los forrajes por medio de un método in vitro. In Simposio sobre determinación del valor nutritivo de los forrajes. Métodos in vitro. La Estanzuela (Colonia) Centro de Investigaciones y Enseñanza para la Zona Templada, 1966. p. irr. (Mimeografiada).
75. ----- Studies of herbage digestibility by an in vitro method. *Outlook on Agriculture* 5(2):60-68. 1966.
76. REID, R.L. et al. Relationship of forage digestibility and intake data to in vitro and in vivo fermentation indices. *Journal of Animal Science* 19(4):1312. 1960. (extracto).
77. ----- J.T. El valor relativo de los resultados agronómicos y con animales en investigaciones sobre pasturas. In Simposio sobre empleo de animales en las investigaciones sobre pasturas. La Estanzuela (Colonia). Centro de Investigaciones y Enseñanza para la Zona Templada, 1966. pp.31-72.
78. SALSURY, R.L. SMITH, C.K. y HUFFMAN. C.F. The Effect of high levels of cobalt on the in vitro digestion of cellulose by rumen microorganisms. *Journal of Animal Science* 15(3):863-869. 1956.
79. SHELTON, D.C. y REID, R.L. Measuring the nutritive value of forages using in vitro rumen technique. In International Grassland Congress, 8th. University of Reading 1960. Proceedings. Reading, 1960. pp.524-528.
80. SIMPOSIO SOBRE DETERMINACION DEL VALOR NUTRITIVO DE LOS FORRAJES METODOS IN VITRO. COLOMBIA SUIZA-URUGUAY, OCTUBRE 3-7, 1966. Centro de Investigaciones y Enseñanza para la Zona Templada, Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, 1966. p. irr. (Mimeografiada).
81. SOEST, P.J. VAN. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for determination of fiber and ligning. *Journal of the A.O.A.C.* 46(5):829-835. 1963. (separata).



82. ----- WINE, R.H. y MOORE, L.A. Estimation of true digestibility of forages by the in vitro digestion of cell walls. In International Grassland Congress 10th.Helsinki, 1966. Proceedings, Helsinki, 1966. pp.438-441.
83. SPEDDING, C.R.W. Effect of subclinical worm-burden on the digestive efficiency of sheep. Journal of Comparative Pathology 64(1):5-14. 1954. (Material no consultado citado por Spedding C.R.W. Sheep Production and grazing managment. London, Bailliere, Tindal e Cox, 1965. p.123.
84. 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.University of Reading, 1960. Proceedings. Reading, 1960. pp.533-537.
85. ----- y TERRY, R.A. A two stage technique for the in vitro digestion of forage crops. Journal of the British Grassland Society 18(2):104-111. 1963.
86. ----- et al. Studies of herbage digestibility using the in vitro method. In Experiments in Progress, No.16. Hurley, Grassland Research Institute, 1963. pp.64-67.
87. THOMAS, G.W. et al. A study of factors affecting rate of intake of heifers feed silage. Journal of Dairy Science 44(8): 1471-1483. 1961.
88. WALKER, D.M. The in vitro digestion of roughage dry matter. Journal of Agricultural Science 53(2):192-197. 1959.
89. WELLER, R.A. PILGRIM, A.F. y GRAY F.V. Digestion of food stuff in the rumen of the sheep and the passage of digesta through its compartments. III. The progress of nitrogen digestion. British Journal of Nutrition 16(1):83-90. 1962.

A P E N D I C E

CUADRO APENDICE No.1.- Porcentaje de ceniza y celulosa de las muestras de alimento ofrecido.-

Autor	Ración	% ceniza	% celulosa
	<u>FORRAJES WERDES</u>		
Moraga	<u>Pasto Sudán</u>		
	1er. crecimiento		
	Vegetativo	14,7	28,5
	Vegetativo	15,8	26,7
	Floración	10,5	28,1
	Floración	10,6	29,0
	Grano pastoso	9,1	31,7
	Grano pastoso	9,3	32,2
	Grano duro	9,6	30,4
	Grano duro	8,7	30,5
	rebrote temprano		
	Vegetativo	13,4	29,1
	Vegetativo	12,1	29,9
	Floración	11,4	31,7
	Floración	11,7	29,4
	Grano lechoso duro	9,3	33,1
	Grano duro	11,3	34,7
	rebrote tardío		
	Emergencia espiga	10,6	35,6
	Emergencia espiga	9,3	34,3
	Floración	12,3	36,8
	Floración	11,9	36,3
	<u>Mezclas</u>		
Wittke	T. subterráneo + hyegrass	9,7	29,6
	Trébol blanco + dactylis	12,9	28,8
	T. Blanco 70% + gramíneas	11,4	29,6
Rojas	T. blanco + falaris 1er. crecimiento	12,5	30,2
	T. blanco + falaris segundo corte	15,1	21,4
	T. blanco + falaris floración	-	26,8
Paladines	Trébol blanco	12,2	-
Kachele	Sorgo congelado	10,6	33,7

CUADRO APENDICE No.1.- (continuación)

Autor	Ración	% ceniza	% celulosa
	<u>Ryegrass</u>		
Wittke	1er.corte	13,5	30,7
	2o.corte	10,7	25,2
	Floracion	10,1	28,5
	Maduro	9,1	33,0
	Muy maduro	8,9	37,9
	<u>HEÑOS</u>		
	<u>Alfalfa</u>		
Borrajo	1er.corte emerg.	9,1	28,5
	50% floracion	8,1	38,2
	100% floracion	7,5	41,3
	2o.corte 50%		
	floración entero	12.0	32,2
	50% floracion		
	picado	10,1	40,7
	50% floración		
	picado 1er,corte	7,4	37,8
Paladines	100% floración	8,0	40,8
	50% floración	8,3	41,9
Paladines		8,5	-o-
Buzy		4,2	33,8
	<u>Mezclas</u>		
Paladines	T.blanco+ festuca		
	picado	11,3	35,9
	T.blanco+ festuca		
	convencional	10,9	35,0
Paladines	T.blanco+ festuca		
	convencional	10,5	-o-
	T.blanco+ festuca		
Buzy	picado	12,6	-o-
	Paja de lino	-o-	-o-
	<u>Sudán</u>		
Moraga	Inicio de flor	11,7	-o-
	Inicio de flor	11,3	-o-
	Grano lechoso	9,7	-o-
	Grano lechoso	10,0	-o-

CUADRO APENDICE No.1 (continuación)

Autor	Ración	% ceniza	% celulosa
<u>SILOS</u>			
Kachele	Feterita(urea en silo)	-o-	28,7
	Testigo	-o-	30,2
	Urea en campo	-o-	31,0
Moraga	Sudán inicio flor	27,8	30,3
	Sudán grano lech.	24,0	32,3
	Sudán grano lech.	25,0	27,0
<u>Concentrados</u>			
Buzy	Maíz molido	3,9	-o-
	Trigo molido	1,8	-o-
	Torta de lino	5,2	-o-
	Harina de girasol	5,6	-o-

CUADRO No.2.- Coeficientes de digestibilidad de la materia seca y de la materia orgánica individuales, obtenidos in vivo.-

No. Fba.	No. Anim.	Ración	Nivel de Alimentación	M.S.	M.O.
1					
a	1	Heno de alfalfa	ad-libitum	66,7	66,3
	2			64,4	63,9
	3			69,5	68,9
	4			68,1	68,1
	5			70,5	71,6
	6			67,8	67,2
	9			64,9	64,9
	10			67,6	67,6
b	1	Maíz molido	ad-libitum	88,8	90,5
	2			75,3	75,2
	4			78,4	81,5
c	5	Trigo molido	ad-libitum	93,5	94,7
	9			91,8	93,0
	10			82,4	87,9
2					
a	6	Heno de alfalfa	mantenimiento	62,5	62,5
	7			60,8	61,3
	9			68,4	73,2
	8			61,6	63,9
b	1	Harina de girasol	mantenimiento	58,9	63,2
	3			60,6	69,8
	4			63,7	73,0
c	7	Torta de lino	mantenimiento	73,9	74,1
	8			76,9	78,2
	9			68,6	66,4
3					
a	13	Paja de lino	mantenimiento	34,8	35,2
	14			38,8	39,7
	15			35,9	36,6
	16			40,2	41,1

CUADRO No.3.- Coeficientes de digestibilidad de la materia seca y de la materia orgánica in vivo e in vitro.-

Autor	Ración	in vivo		in vitro	
		M.S. %	M.O.	M.S. %	M.O.
	<u>FORRAJES VERDES</u>				
Moraga	<u>Pasto Sudán</u>				
	ler.crecimiento				
	Vegetativo	72,4	76,1	63,6	66,6
		72,4	75,1	61,5	69,6
	Floración	63,1	66,0	63,8	65,3
		63,3	65,5	63,7	64,8
	Grano pastoso	55,6	59,0	58,0	56,4
		56,3	58,9	57,8	58,7
	Grano duro	52,8	54,5	59,1	58,7
		53,9	54,7	59,4	59,1
	rebrote tardío				
	Emergencia espiga	62,7	66,5	63,7	66,8
		65,0	66,9	65,3	65,6
	Floración	54,9	59,5	59,9	60,6
		60,9	65,0	60,3	64,7
	rebrote temprano				
	Vegetativo	67,4	73,4	61,9	65,6
		63,3	69,1	62,9	64,2
	Floración	63,7	66,5	61,6	63,9
		64,3	67,3	65,8	66,9
	Grano lechoso duro	56,7	59,2	57,5	58,8
	Grano duro	53,5	56,4	58,4	58,7
	<u>Mezclas</u>				
Wittke	T.subterráneo + Ryegrass	70,4	75,4	71,4	72,6
	T.blanco + dactilis	77,7	79,4	76,8	74,5
	T.Blanco 70% + gramineas	76,7	80,5	77,5	76,7
	T,blanco + falaris ler.c.	67,7	75,0	67,1	67,8
	T.blanco + falaris 2o.c.	73,6	79,6	69,0	71,0
	T.blanco + falaris florac.	75,5	77,6	71,4	70,5
Paladines	T.blanco	72,8	75,5	70,1	68,7
Kachele	Sorgo congelado	60,8	65,2	65,6	67,1
	<u>Ryegrass</u>				
wittke	ler.corte	76,4	81,9	76,9	77,6
		67,8	73,3	72,0	73,8

CUADRO APENDICE No.3 (continuación)

Autor	Ración	<u>in vivo</u>		<u>in vitro</u>	
		M.S. %	M.O.	M.S. %	M.O.
	Floración	67,7	71,9	68,6	69,6
	Maduro	52,6	56,2	54,9	54,8
	Muy maduro	53,1	57,1	50,1	50,1
HENOS					
<u>Alfalfa</u>					
Borrajo	1er.corte emergencia	64,8	66,5	69,6	67,9
	50% floración	62,4	63,6	60,9	58,5
	100% floración	55,7	56,8	57,1	54,9
	2o.corte 50% flor,ent.	61,0	61,7	64,4	59,5
	50% floración picado	67,0	68,9	63,2	61,6
	1er,corte 50% floración	62,0	64,5	60,2	60,4
	100% floración	54,3	56,0	55,9	54,7
Paladines	50% floración	49,9	53,0	51,1	52,9
		59,4	59,5	57,5	54,4
		67,4	67,3	67,4	67,5
		63,3	65,2	65,7	63,0
<u>Mezclas.-</u>					
Paladines	T.blanco + festuca picado	53,6	65,0	66,0	65,5
	T.blanco + festuca conve.	65,3	67,1	70,8	66,0
	T.blanco + festuca conve.	65,5	67,1	67,9	65,2
	T.blanco + festuca picado	63,1	66,2	65,8	64,9
Buzy	Paja de lino	37,4	38,7	41,6	38,8
<u>Sudán</u>					
Moraga	Inicio flor	63,5	66,4	64,3	64,0
		63,9	68,2	62,9	62,9
	Grano lechoso	54,5	56,6	61,0	60,0
		55,7	58,3	56,7	58,6
SILOS					
<u>Feterita</u>					
Kachele	Urea en silo	59,4	-o-	52,7	-o-
	Testigo	50,4	-o-	50,9	-o-
	Urea en campo	47,9	-o-	49,3	-o-



CUADRO APENDICE No.3.- (continuación)

Autor	Ración	in vivo		in vitro	
		M.S.	M.O.	M.S.	M.O.
<u>Sudán</u>					
Moraga	Inicio flor	49,9	65,3	48,9	57,9
	Grano lechoso	52,3	65,0	51,7	55,4
		49,8	59,5	50,0	60,8
CONCENTRADOS					
Buzy	Maíz molido	80,8	82,4	80,0	79,4
	Trigo molido	89,2	91,8	88,1	87,2
	Torta de lino	73,2	72,9	68,0	69,5
	Harina de girasol	61,0	68,6	66,2	66,4

CUADRO APENDICE No.4.- Consumo de materia seca. $W^{0,75}$ , consumo de materia seca digerible/ $W^{0,75}$  y coeficiente de digestibilidad in vitro de la celulosa.-

Autor	Ración	Consumo $g/W^{0,75}$		D.C.	
		M.S.	M.S.D.		
<u>FORRAJES VERDES</u>					
<u>Pasto Sudán</u>					
Moraga	1er.crecimiento				
	Vegetativo	58	42,0	34,5	
		56	40,5	30,9	
	Floración	63	39,8	32,1	
		59	37,3	28,0	
	Grano pastoso	47	26,1	26,1	
		52	29,3	26,3	
	Grano duro	45	24,1	19,3	
		51	27,5	21,9	
		rebrote temprano			
		Vegetativo	42	28,3	22,5
			43	27,2	21,6
		Floración	47	29,9	31,3
			55	35,3	32,1
		Grano lechoso duro	46	26,1	24,0
	Grano duro	37	19,8	19,7	
	rebrote tardío				
	Emergencia espiga	42	26,6	33,4	
		45	29,4	35,7	
	Floración	47	25,5	35,5	
		50	30,0	36,1	
<u>Mezclas</u>					
Wittke	T.subterráneo +Ryegrass	48	33,8	26,0	
	T.blanco+dactylis	63	49,0	50,6	
	T.blanco 70%+gramíneas	54	41,9	41,7	
	T.blanco+falaris 1er.c.	50	33,8	36,8	
	T.blanco+falaris 2o.c.	59	43,4	49,4	
	T.blanco+falaris florac.	47	35,4	37,6	
Kachelo	Sorgo congelado	60	36,4	37,6	

CUADRO APENDICE No.4. (continuación)

Autor	Ración	Consumo g/W <sup>0,75</sup>		D.C.
		M.S.	M.S.D.	
<u>Ryegrass</u>				
Wittke	1er.corte	44	33,6	28,6
	2o.corte	46	31,2	29,4
	Floración	49	33,2	29,9
	Maduro	50	28,4	18,5
	Muy maduro	48	25,5	18,5
HENOS				
<u>Alfalfa</u>				
Borrajo	1er.corte emergencia	61	39,5	38,0
	50% floración	58	37,2	29,2
	100% floración	52	29,0	24,2
	2o.corte 50% florac.ent.	55	33,5	23,4
	50% floracion picado	63	42,2	30,7
	1er.corte 50% floración	50	31,0	30,3
	100% floración	51	31,1	29,9
	50% floración	46	22,9	30,3
Buzy		96	64,9	34,6
<u>Mezclas</u>				
Paladines	T.blanco+ festuca picado	61	38.8	38.9
	T.blanco+ festuca conven.	63	41.1	39,7
SILOS				
<u>Feterita</u>				
Kachole	Urea en silo	35	20,5	29,9
	Testigo	31	15,5	34,8
	Urea en campo	33	15,8	40,6
<u>Sudán</u>				
Moraga	Floración	24	13,7	30,9
	Grano lechoso	29	14,9	29,0
		24	11,7	24,8