

COMPARACION DE LAS TÉCNICAS *in situ*, *in vitro* Y ENZIMÁTICA (CELULASA) PARA ESTIMAR LA DIGESTIBILIDAD DE FORRAJES EN OVINOS

COMPARISON OF THE *IN SITU*, *IN VITRO* AND ENZYMATIC (CELLULOSE) TECHNIQUES FOR DIGESTIBILITY ESTIMATION OF FORAGES IN SHEEP

Giovanna Torres G.^{1,2}, Teresa Arbaiza F.^{1,3}, Fernando Carcelén C.¹ y Orlando Lucas A.¹

RESUMEN

Se comparó los resultados de las técnicas *in vitro*, *in situ* y enzimática (celulasa) para estimar la digestibilidad de forrajes de diferente calidad nutritiva en ovinos. Se colectó muestras de forraje de tres calidades: alta (rye grass de 2-4 semanas), media (rye grass de 8 semanas y heno de alfalfa) y baja (paja de avena). Las muestras fueron secadas, molidas y pasaron por tamiz de 1 mm para la técnica *in vitro* y celulasa y 3 mm para la técnica *in situ*. Se determinó la digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS), digestibilidad *in situ* de la materia seca (DISMS) y digestibilidad a la celulasa de la materia seca (DCMS). Se emplearon tres ovinos con fístula ruminal y alimentados con maíz forrajero y heno de alfalfa. Se usó un diseño experimental con arreglo factorial de 4 x 3 (4 calidades de forraje y 3 técnicas). La DISMS fue superior ($p < 0.05$) para los cuatro forrajes en estudio en relación a la DIVMS y la DCMS: 91.8 vs 73.9 y 76.5% para el forraje de alta calidad; 74.2 vs 71.6 y 70.9 para el rye grass de 8 semanas; 77.8 vs 68.9 y 68.0 para el heno de alfalfa y 34.7 vs 29.5 y 31.7 para la paja de avena. No se observó diferencias estadísticas entre la DIVMS y DCMS en los forrajes de mediana calidad. Los valores de DIVMS y DCMS sobreestimaron la cantidad de materia seca degradable en forrajes de alta calidad y subestimaron la cantidad de materia seca degradable en forrajes de mediana y baja calidad en relación a la DISMS en ovinos. Se concluye que existen diferencias entre las técnicas *in situ*, *in vitro* y celulasa para estimar la digestibilidad de la materia seca del forraje en ovinos y estas diferencias dependen de la calidad del forraje.

Palabras clave: digestibilidad, forraje, *in vitro*, *in situ*, ovino, celulasa

ABSTRACT

The objective of the study was to compare the efficiency of the *in situ*, *in vitro* and enzymatic (cellulose) techniques in estimating the digestibility of forage with different nutritional quality in sheep. Samples of three qualities of forage were collected: high (rye grass of 2-4 weeks), medium (rye grass of 8 weeks and alfalfa hay), and low (oat straw).

¹Laboratorio de Bioquímica, Nutrición y Alimentación Animal, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima

²Hospital Central PNP "Luis N. Sáenz", Policía Nacional del Perú, Lima

³E-mail: tarbaizafe@yahoo.es

The samples were dried, grounded and passed through 1 mm sieve for the *in vitro* and cellulose technique and 3 mm sieve for the *in situ* technique. The *in vitro* digestibility of dry matter (IVDDM), *in situ* digestibility of dry matter (ISDDM), and cellulose digestibility of dry matter (CDDM) were determined. Three adult rams with ruminal fistula and fed with a diet based on alfalfa hay and corn stalk. A complete randomized 4 x 3 experimental design (4 quality forages and 3 techniques) was used. The ISDDM was higher ($p < 0.05$) in all forages as compared to IVDDM and CDDM: 91.8 vs 73.9 and 76.5% for high quality forage, 74.2 vs 71.6 and 70.9 for ray grass of 8 weeks and 77.8 vs 68.9 and 68.0 for alfalfa hay, and 34.7 vs 29.5 and 31.7 for low quality forage. None differences were observed between IVDDM and CDDM in forages of medium quality. IVDDM and CDDM values overestimated the quantity of degradable dry matter in high quality forages and underestimated it in medium and low quality forages in relation to ISDDM. It is concluded that there are differences between the *in situ*, *in vitro* and cellulose techniques when estimating the digestibility of dry matter forage in sheep, and these difference depend upon the quality of the forage.

Key words: digestibility, forage, *in vitro*, *in situ*, sheep, cellulose

INTRODUCCIÓN

La energía es considerada como el primer nutriente limitante en todo sistema de alimentación, de allí la importancia de la valoración energética de los alimentos consumidos por los animales. La determinación del valor energético de los forrajes se puede estimar indirectamente mediante digestibilidades estimadas con técnicas *in situ* e *in vitro* y, recientemente, mediante técnicas que emplean enzimas celulolíticas (Arce *et al.*, 2003).

La técnica de digestibilidad *in vitro* (DIVMS) simula la digestibilidad del tracto digestivo del rumiante y requiere de la preparación de un inóculo que contenga microorganismos ruminales viables (Tilley y Terry, 1963). El inconveniente de esta técnica reside en la variabilidad de sus resultados, debido a que la microflora ruminal está influenciada por el tipo y cantidad de dieta proporcionada al animal.

La técnica de digestibilidad *in situ* (DISMS) utiliza bolsas sintéticas para medir la digestión de los forrajes a nivel ruminal.

Este método ha ganado gran aceptación cuando se requiere medir la digestibilidad aparente de la materia seca, fibra, y nitrógeno, debido principalmente a la rapidez con que se puede obtener resultados y porque no demanda de equipos y materiales que requieren las otras técnicas (Quinn *et al.*, 1938; Mehrez y Orskov, 1977). Sin embargo, la utilidad y confiabilidad de esta técnica depende de factores tales como la cantidad de la muestra, y del tamaño de la bolsa y de la partícula de la muestra.

Otra alternativa para medir la digestibilidad de los forrajes es mediante el uso de enzimas (DCMS). Aquí, el licor ruminal es reemplazado por una solución de celulasa, enzima proveniente del hongo *Penicillium funiculosum*. Este método es de fácil aplicación y de bajo costo, no siendo necesario el uso de animales de experimentación (Burghara y Sleeper, 1986).

El presente trabajo se hizo con la finalidad de comparar la digestibilidad de forrajes de diferente calidad mediante el uso de estas tres pruebas.

Cuadro 1. Análisis proximal en base seca (g/100 g) de cuatro tipos de forrajes

Forraje	Humedad (%)	Base seca (g/100 g)				
		Proteína cruda	Fibra cruda	Extracto libre de N	Extracto etéreo	Cenizas
Rye grass (4 sem)	79.0	20.9	19.1	47.4	2.2	10.4
Rye grass (8 sem)	76.0	9.0	32.0	49.5	2.9	6.6
Alfalfa	81.9	16.9	28.6	42.4	1.1	11.0
Paja de avena	8.1	4.9	51.8	38.3	1.0	4.0

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron cuatro forrajes de la Estación Experimental IVITA - El Mantaro, Junín. Los forrajes, en función a su calidad nutricional, fueron el rye grass de 2-4 semanas (alta calidad; 20.9% de proteína cruda - PC), rye grass de 8 semanas (mediana calidad; 16.9% PC), heno de alfalfa (mediana calidad) y paja de avena (baja calidad; 4.9% PC). Además, para evaluar las técnicas *in vitro* e *in situ* se utilizaron tres ovinos machos Merino, de 2 años de edad y 45 kg de peso vivo en promedio, los cuales presentaban una fístula ruminal. La dieta de los ovinos consistió en chala picada, heno de alfalfa y agua *ad libitum*. Los análisis de laboratorio se realizaron en el Laboratorio de Bioquímica, Nutrición y Alimentación Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.

Se calculó la digestibilidad de la materia seca mediante el uso de las tres técnicas en los cuatro tipos de forraje. Para la técnica *in situ* se utilizó el procedimiento descrito por San Martín *et al.* (1984) y Carcelén (2000), colocando las bolsas de nylon en los animales

fistulados. Para la técnica *in vitro* se aplicó la técnica de dos etapas, según Tilley y Terry (1963). Para la técnica de celulasa se siguió el procedimiento descrito por Mc Queen y Van Soest (1975) con las modificaciones realizadas por Arce *et al.* (2003).

El contenido de nutrientes digestibles totales (NDT) se estimó a partir de la energía digestible, que a su vez fue obtenida de los valores de digestibilidad de la materia seca obtenidos por las técnicas *in situ*, *in vitro* y enzimática (celulasa).

Para el cálculo de la NDT se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$\text{NDT (\%)} = \frac{\text{Energía Digestible (ED), Mcal.kg}^{-1}}{0.04409}$$

$$\text{ED, Mcal.kg}^{-1} = 0.04409 \times \text{Digestibilidad de la materia seca (DMS)}$$

$$\text{EM, Mcal.kg}^{-1} = 0.82 \text{ ED}$$

El coeficiente 4.4 propuesto como constante por el MAFF (1975) representa la energía total contenida en un alimento (EB), correspondiente a la energía o calor liberado cuando un alimento es oxidado.

Cuadro 2. Comparación de los porcentajes de digestibilidad *in vitro* (DIVMS), digestibilidad *in situ* (DISMS) y digestibilidad en celulasa (DCMS) de la materia seca de cuatro forrajes

Forraje	Técnica de medición de digestibilidad de forraje		
	DIVMS	DCMS	DISMS
Rye grass (4 sem)	73.9 ^a	76.5 ^b	91.8 ^c
Rye grass (8 sem)	71.6 ^a	70.9 ^a	74.2 ^b
Alfalfa	68.9 ^a	68.0 ^a	77.8 ^b
Paja de avena	29.3 ^a	31.7 ^b	34.7 ^c

^{a,b,c} Superíndices diferentes dentro de filas indican diferencia significativa ($p < 0.05$)

Cuadro 3. Estimación del contenido energético (NDT, ED, EM¹) de cuatro forrajes a partir de la digestibilidad *in vitro* (DIV), digestibilidad *in situ* (DIS) y digestibilidad enzimática (celulasa, DC) de la materia seca

		DC	DIV	DIS
Rye grass (4 sem)	DMS	76.4	73.9	91.8
	NDT	76.3	73.7	91.6
	EM	2.76	2.67	3.31
	ED	3.36	3.25	4.04
Alfalfa	DMS	68.0	68.8	77.7
	NDT	67.9	68.7	77.6
	EM	2.45	2.48	2.81
	ED	2.99	3.03	3.42
Rye grass (8 sem)	DMS	70.9	71.6	74.2
	NDT	70.8	71.4	74.1
	EM	2.56	2.58	2.68
	ED	3.12	3.15	3.26
Paja de avena	DMS	31.7	29.5	34.7
	NDT	31.7	29.4	34.7
	EM	1.15	1.06	1.25
	ED	1.40	1.30	1.53

¹ DMS: Digestibilidad de la materia seca; NDT: nutrientes

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del análisis proximal de los forrajes experimentales se muestran en

el Cuadro 1. El rye grass de 2 a 4 semanas mostró la mejor calidad con 20.9% de proteína cruda (PC) y 19.1% de fibra cruda (FC), seguido del heno de alfalfa, que registró un 16.9% de PC y 28.6% de FC.

El Cuadro 2 muestra las tasas de digestibilidad obtenidas por los tres métodos en los cuatro tipos de forraje. La técnica de la DISMS mostró mejores tasas de digestibilidad que la DIVMS y la DCMS en todos los tipos de forrajes ($p > 0.05$), mientras que la DCMS fue superior a la DIVMS en el rye grass de 4 semanas (76.5 vs 73.9%) y en la paja de avena (31.7 vs. 29.3%).

San Martín *et al.* (1984) encontraron una mayor digestibilidad acumulativa *in situ* en la alpaca con respecto a la técnica *in vitro*, atribuyéndola a las ventajas fisiológicas digestivas de esta especie. Los mayores valores en la DISMS se deberían a que esta técnica aseguraría una mezcla constante de las fases sólida y líquida de la digesta, dando lugar a que el forraje contenido en las bolsas se encuentre expuesto al ataque continuo de bacterias celulolíticas, resultando en una mayor degradación de las paredes celulares. Otra ventaja sería la estabilidad del pH ruminal, gracias a la secreción de sustancias tampón (saliva) que mantienen al rumen en un pH entre 6 y 7 (Church y Pond, 1994).

CONCLUSIONES

Existen diferencias entre las técnicas *in situ*, *in vitro* y celulasa para estimar la digestibilidad de la materia seca del forraje en ovinos y estas diferencias dependen de la calidad del forraje.

LITERATURA CITADA

1. Arce C, Arbaiza T, Carcelén F, Lucas O. 2003. Estudio comparativo de la digestibilidad en forrajes mediante dos métodos de laboratorio. *Rev Inv Vet*, Perú 14(1): 7-12.
2. Avendaño E, San Martín F, Arbaiza T, Carcelén F, Lucas O. 2003. Estudio comparativo de las técnicas de digestibilidad *in vitro*, *in situ* y enzimática con forrajes de diferente calidad nutritiva en alpacas. *Rev Acad Per Cienc Vet*. 4: 1-10.
3. Burghara SS, Sleeper DA. 1986. Digestion of several temperate forage species by a prepared cellulase solution. *Agron J* 78: 94-98.
4. Carcelén F. 2000. Evaluación nutricional de residuos de cosecha tratados químicamente en alpacas. Tesis de Maestría. Lima: Facultad de Medicina Veterinaria, Univ. Nacional Mayor de San Marcos. 60 p.
5. Church DC, Pond WG. 1994. Fundamentos de nutrición y alimentación de animales. México: Ed. Limusa. 438 p.
6. [MAFF] Ministry of Agriculture, Feed and Fisheries. 1975. Energy allowances and feeding systems for ruminants. London: Technical Bulletin. 33 p.
7. Maynard L, Losli J. 1981. Nutrición animal. México: McGraw-Hill. 208 p.
8. Mc Queen R, Van Soest PJ. 1975. Fungal cellulase and hemicellulase prediction of forage digestibility. *J Dairy Sci* 58: 1482-1491.
9. Mehrez AZ, Orskov ER. 1977. A study of the artificial fibre bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. *J Agric Sci* 88: 645-650.
10. Quin JJ, Wathvan der JG, Myburgh S. 1938. Studies on the alimentary tract of Merino sheep in South Africa. 4. Description of experimental technique. *Ondersteport J Vet Sci Anim Ind* 11: 341-360.
11. San Martín F, Rosales A. Valdivia. 1983. Tasas de digestión y digestibilidad del forraje en alpaca y vacuno. En: San Martín F, Bryant FC (eds.). Investigación sobre pastos y forrajes. Texas, USA: Texas Tech Univ. p 3-52.
12. Tilley JMA, Terry RA. 1963. A two stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *J Brit Grassland Soc* 18: 104-111.