

Obtención de líquido del rumen de un cordero fistulado.

La digestibilidad "in vitro" como método para determinar el valor nutritivo de los forrajes

I.—Efectos de la duración de los tiempos de incubación y del empleo de líquido del rumen liofilizado sobre los coeficientes de digestibilidad de la alfalfa (*Medicago Sativa L.*)

V. GONZÁLEZ y J. R. TARRAGÓ
Instituto de Alimentación y Productividad Animal
C. S. I. C. Madrid

RESUMEN

Se han introducido algunas modificaciones a la técnica de digestibilidad "in vitro" de Tilley y Herry (1963), acortando el tiempo de incubación de las muestras en la primera fase de digestión con líquido del rumen, suspendiéndola a las cuatro, ocho, doce y veinticuatro horas. Los resultados demuestran cómo los coeficientes de alfalfa empleada aumentan conforme se van prolongando los tiempos de incubación con líquido del rumen. Se discuten las posibles causas.

INTRODUCCIÓN

Las pruebas de digestibilidad de los forrajes son de considerable importancia para determinar su valor nutritivo para los rumiantes; sin embargo, estas pruebas realizadas con animales son largas y requieren grandes cantidades de forraje. Además, así solamente se puede analizar la digestibilidad de toda la planta y no la de sus diferentes partes (hojas, tallos, etc.) por separado.

La atención, pues, ha girado en torno a los métodos «in vitro», en las cuales los alimentos son digeridos por preparaciones de microorganismos o enzimas que ejercen una función análoga a aquellos presentes en el tracto digestivo del animal y que vienen a paliar los inconvenientes antes descritos de las pruebas de experimentación «in vivo».

La importancia de las pruebas de digestibilidad «in vitro» como método de valoración de los forrajes, se ha puesto de manifiesto en la última década a partir de los trabajos de Barnett (1957), Quick et al (1958) y Hersberger et al (1959), en los cuales demostraban la existencia de una alta correlación entre los resultados de las pruebas de digestibilidad «in vivo» e «in vitro» de los forrajes. Más tarde, Reid (1961) y Tilley (1963) comprueban en sus estudios la existencia de un «error típico» para la predicción de la digestibilidad «in vivo» a partir de los resultados «in vitro» de alrededor de una ± 2 unidades de digestibilidad.

Sin embargo, la técnica no está aún tipificada y prácticamente varía según el laboratorio que la pone en marcha. Y así, los tiempos de incubación oscilan de 24 a 72 horas; el inoculum se prepara de múltiples fuentes y distintas maneras; y el medio fermentativo unas veces se prepara solamente a base de simples sales y otras llega a una gran complejidad con inclusión de minerales, vitaminas, oligoelementos y fuentes de carbohidratos y nitrógeno. Pero existen, además, otras fuentes de variabilidad. Los estudios realizados por Dehority y Johnson (1961) llevan a la conclusión de la importancia del tamaño de la partícula del forraje en el momento de ser analizada para hallar los coeficientes de digestibilidad «in vitro», encontrando que la cantidad de celulosa digerida aumentaba en relación directa con el grado de finura del forraje.

Centrándonos en el tema de esta comunicación, recientemente, Barnes (1967) recopila en un estudio los datos aportados por 17 laboratorios y centros de experimentación americanos que llevaron a cabo unas pruebas de digestibilidad con tres muestras idénticas para todos de forraje y empleando distintas técnicas. Los resultados medios oscilaban entre 40-63,9 por 100 para el coeficiente de digestibilidad de la celulosa y entre 38,7-53,3 por 100 la digestibilidad de la S. S. En su estudio llega a la conclusión de que la precisión de una técnica llega a su máximo empleando tiempos de fermentación largos. En efecto, en las experiencias realizadas por nosotros, cuyos resultados se exponen más adelante, hemos llegado a las mismas conclusiones que las de Barnes en su estudio.

También Karn Et al. (1967) llevan a cabo pruebas para determinar los tiempos de incubación con que se obtienen los máximos valores de digestibilidad. Empleando los coeficientes de digestibilidad de la celulosa y de la S. S. como criterio, se estableció que con la técnica empleada, los períodos de incubación durante los cuales se obtenían los máximos índices de digestibilidad estaban comprendidos entre 5 y 11 horas. Estos límites se hallaron por medio de una serie de análisis de 65

muestras de forraje a 5,8 y 11 horas de tiempo de fermentación. Los valores e índices de digestibilidad estaban correlacionados en cada intervalo de tiempo con los datos de digestibilidad «in vivo» que se obtenían paralelamente.

A la vista de estos datos estimamos oportuno realizar unas pruebas previas en las que se estudia la digestibilidad «in vitro» de tres muestras de heno de alfalfa y se introducen algunas modificaciones a la técnica.

MATERIAL Y METODOS

1. MUESTRAS

Para la obtención de las muestras de alfalfa, se contó con una parcela de Medicago sativa L. var. Aragón, situada en Puerta de Hierro (Madrid). La alfalfa recolectada se henificó y a partir del heno se obtuvieron las muestras empleadas para los análisis de digestibilidad.

Se prepararon tres tipos de muestras por separado. La muestra A (hojas), la B (tallos) y la muestra AB (tallos y hojas al 50 por 100); la separación de tallos y hojas se hizo a mano. Se siguió este proceder a fin de obtener tres muestras de alfalfa con distintos coeficientes de digestibilidad cada una, siendo así que la de hojas ofreciera los mayores coeficientes; la de tallos, los más bajos, y la mezcla tallos-hojas, intermedios.

Una vez separados tallos y hojas, se les sometió a desecación durante 24 horas en una estufa de aire forzado a 100° C, a fin de que el material estuviera completamente seco al molerlo. La trituración y mollienda de las muestras se hizo por medio de un molino de martillos.

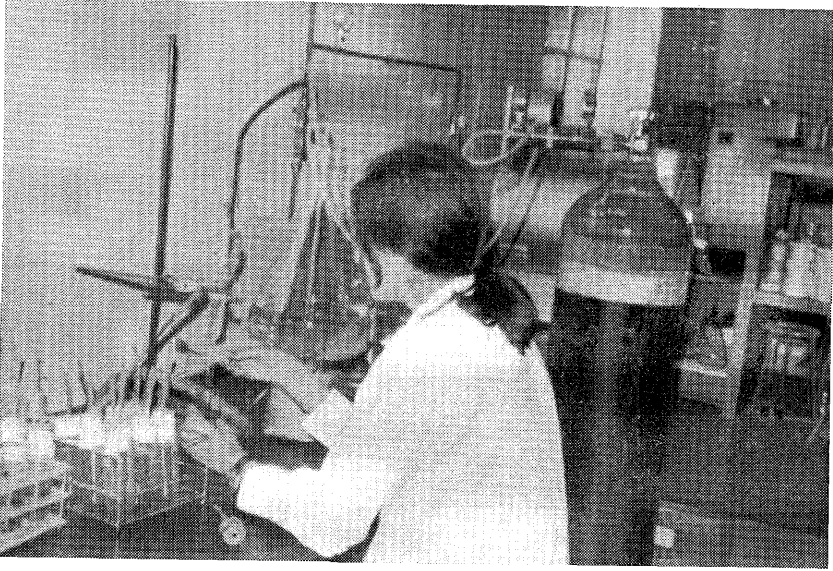
2. DETERMINACIÓN DE LA DIGESTIBILIDAD «IN VITRO»

a) *Fundamentos.*

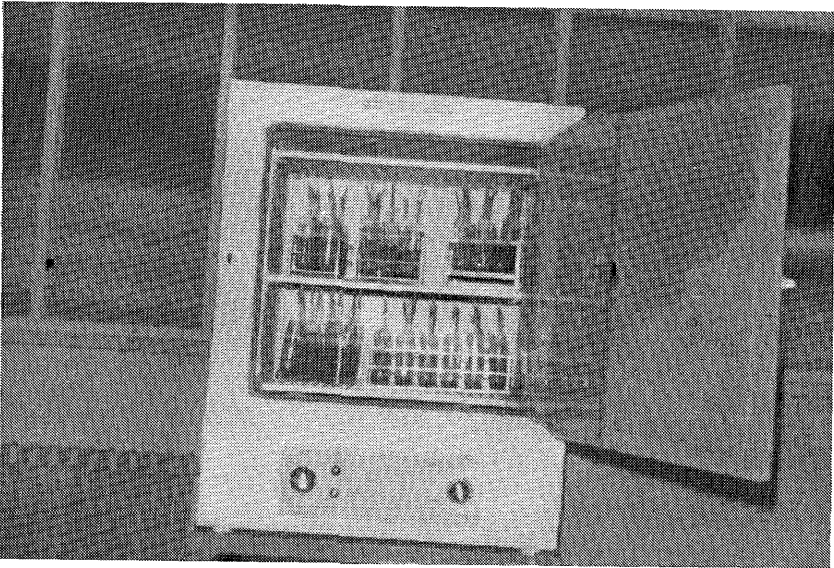
Con esta técnica se trata de reproducir las dos etapas naturales que ocurren en los procesos de digestión de los rumiantes. Para ello se somete primeramente el forraje a un proceso de digestión utilizando los microorganismos que se obtienen del líquido del rumen de una oveja fistulada. Posteriormente se continúa este proceso de digestión usando pepsina ácida (Pepsina — HCl). Durante la primera etapa los hidratos de carbono complejos (celulosa y hemicelulosa) se digieren y convierten en productos solubles por acción de los enzimas de los microorganismos inoculados. Los productos resultantes (azúcares simples) son convertidos, a su vez, en ácidos grasos volátiles, produciéndose además metano, anhídrico carbónico, etc. La mayoría de los otros compuestos digestibles, solubles, se transforman también durante este proceso. Sin embargo, solamente se solubiliza una proporción de la proteína bajo la acción de los citados microorganismos, y para que se realice la segunda parte del proceso de digestión, se requiere la acción de la pepsina, que convierte la proteína en una fracción hidrosoluble.

b) *Método (Técnica de Tilley y Terry en 1963).*

Se pesan por duplicado muestras de medio gramo de forraje secado a la estufa a 100° C y se colocan en tubos, dejando dos como testigos sin forraje alguno.



Adición de solución tampón fosfato-bicarbonato.



Estufa de incubación

Seguidamente se agregan a cada tubo 40 ml de solución tampón de fosfato-bicarbonato (saturado con CO_2 y a una temperatura de 38°C).

Composición de la saliva artificial, solución tampón, empleada por nosotros:

PO_4HNa_2	9,3 gr.
CO_3HNa	9,8 gr.
ClNa	0,47 gr.
ClK	0,57 gr.
Cl_2Ca	0,04 gr.
Cl_2Mg	0,06 gr.

(A enrasar con un litro de agua.)

Inmediatamente después se agregan 10 ml de líquido del rumen a cada tubo. Cada tubo se burbujea con CO_2 para desplazar todo el aire y se tapa con un tapón con válvula de seguridad, manteniendo todo en incubación a $38-39^\circ\text{C}$ en ambiente oscuro, durante cuarenta y ocho horas, agitándolos unas cuatro o cinco veces a mano durante este tiempo. Se determina el pH a las seis y veinticuatro horas, ajustándolo a un valor de 6,9 con solución normal de Na_2CO_3 (1 ml de Na_2CO_3 N subirá el pH en 0,2 unidades, aproximadamente). Antes de volver a colocarlos en la estufa de incubación vuelven a burbujearse los tubos con CO_2 .

Después de las susodichas cuarenta y ocho horas, se sacan los tubos de la estufa de incubación y se paraliza la actividad bacteriana adicionando 1 ml de solución de HgCl_2 al 5 por 100 y guardándolos a 1°C hasta el momento de centrifugarlos. La centrifugación, que dura quince minutos, a 1.800 g, permite eliminar las partículas que sobrenadan, y los residuos insolubles se lavan con agua una vez solamente.

Al residuo de cada tubo se agregan 50 ml de solución de pepsina; se incuban nuevamente durante otras cuarenta y ocho horas, a $38-39^\circ\text{C}$, agitándolos de vez en cuando. A continuación se sacan del incubador y se guardan a 1°C hasta el momento de centrifugarlos. Después de centrifugarlos, durante quince minutos a 1.800 g, se eliminan las partículas que sobrenadan y los residuos «indigeridos» se lavan nuevamente con agua. Cada residuo se pasa a crisoles porosos de peso conocido (50-100 ml de capacidad). Se colocan en la estufa a 100°C hasta peso constante. La sustancia seca residual se calcula restando el peso del recipiente (crisoles porosos).

El peso del residuo en los tubos testigos (a los que se añadió solamente líquido de la panza y la solución tampón) comprende la fracción indigestible de las partículas alimenticias y los microorganismos extraídos con los 10 ml del líquido del rumen originales. Este peso se resta del peso del residuo encontrado en cada tubo de «muestra problema» (de digestibilidad conocida), para determinar el peso del residuo indigestible de cada 0,5 g de forraje. A partir de esta cifra puede calcularse fácilmente la sustancia digestible en cada 100 g de forraje (materia seca). Conocido el porcentaje «digerido» en las muestras testigo (de digestibilidad alta y baja previamente conocidas), se puede comparar la eficacia digestiva de la combinación de los inóculos del rumen con la preparación de pepsina usados en cada experimento.

3. MODIFICACIONES INTRODUCIDAS EN LA TÉCNICA

Se acortó el tiempo de incubación de las muestras en la primera fase de digestión con líquido del rumen, suspendiendo la digestión a las 4, 8, 12 y 24 horas.



Paso a la segunda fase.

Los tubos con las muestras de alfalfa se dividieron en cuatro grupos cada uno de los cuales era sacado de la estufa a un tiempo determinado de incubación. El primer grupo se sacaba a las cuatro horas, otro a las ocho horas, el siguiente a las doce y el último a las veinticuatro horas de incubación. Una vez acabado el período de incubación previsto por nosotros, en cada uno de los casos, se continuaba con la pauta normal de la técnica hasta el fin del proceso.

La segunda prueba realizada consistió en sustituir en una serie de muestras los 10 c. c. de líquido del rumen fresco que se añaden en la técnica de Tilley, por 0,5 gr. de líquido del rumen liofilizado. Para este ensayo se dispuso de una planta liofilizadora LEYBOLD existente en el Instituto de Alimentación y Productividad Animal (C. S. I. C.). El líquido ruminal se colocaba en placas de Petri de 10 cm. de diámetro y 1 cm. de altura y éstas se introducían dentro de la cámara de liofilización en donde sufrían los procesos sucesivos de congelación y sublimación al vacío.

RESULTADOS Y DISCUSION

Del análisis de los resultados expuestos en la tabla 1 se desprende que los coeficientes de digestibilidad de las muestras de alfalfa empleadas aumentan conforme se van prolongando los tiempos de incubación en la primera fase con líquido del rumen y solución tampón (saliva artificial). Esta observación concuerda con los estudios realizados por Barnes (1967), según los cuales los mayores coeficientes de digestibilidad para la s. s. se obtienen a mayores tiempos de incubación; lo mismo sucede al acortar éstos en la técnica seguida por nosotros (Tilley y Terry, 1963). Sin embargo, los incrementos de los coeficientes de las tres muestras no siguen el mismo ritmo en los distintos períodos. La muestra A arroja unos coeficientes de digestibilidad altos a las primeras cuatro horas de incubación. Entre los períodos de cuatro y ocho horas el coeficiente de digestibilidad aumenta en un 2,7 por 100, de ocho-doce horas de incubación aumenta en un 7,5 por 100; de doce-catorce, en 13,8 por 100, y de veinticuatro-veintiocho horas, en 13,4 por 100. Si comparamos estos porcentajes de incremento de la muestra A con los de las muestras B y AB (tabla 2) vemos que son notoriamente más bajos hasta las veinticuatro horas de incubación; o sea que los coeficientes de digestibilidad de las muestras B y AB aumentan más rápidamente durante las primeras veinticuatro horas de incubación, mientras que de las veinticuatro a las cuarenta y ocho horas los incrementos son prácticamente despreciables, siendo así que alcanzan a las veinticuatro horas cifras de digestibilidad prácticamente iguales a las alcanzadas a las cuarenta y ocho horas (gráfico 1). Sin embargo, la digestibilidad de la muestra A alcanza de veinticuatro a cuarenta y ocho horas un incremento de 13,4 por 100 muy notorio, y que indica que la digestión de los componentes del forraje ha continuado durante las últimas veinticuatro horas de incubación más intensamente en la muestra A que en las otras dos.

Una explicación de estas diferencias entre los incrementos de las cifras de digestibilidad a distintos tiempos de incubación la podemos encontrar en la distinta composición química (haciendo referencia principalmente a la relación nitrógeno-celulosa) de las tres muestras. La muestra A evidentemente contiene un mayor porcentaje proteico que las B y AB, que, a su vez, y sobre todo la primera, son más ricas en celulosa. Durante el perio-

do de incubación comprendido entre cuatro y 12 horas, los resultados hacen suponer que habría una predominancia de la digestión de la celulosa que va descendiendo hasta las 24 horas, en que en las muestras pobres en proteína (B y AB) la digestibilidad se hace prácticamente igual a la de las 48 horas. En la muestra A, que contiene más proteína y menos fibra, no son tan acusados los incrementos de digestibilidad, debido precisamente a su pobreza en celulosa, siendo sus coeficientes más altos al principio (primeras cuatro horas) y al final (24 horas últimas) por predominar en estas fases la digestión proteica. Estos resultados concuerdan con los realizados por Hale (1947) «in vivo», que mediante el empleo de animales fistulados demostró que durante las primeras seis horas después de la ingesta la actividad ruminal predominante se centra en la digestión de proteína e hidratos de carbono fácilmente atacables o más lábiles, mientras que en el segundo período de seis horas predomina la ruptura de las estructuras celulósicas, indicando asimismo en su estudio que después de las 12 horas de haber ingerido el alimento, y sin haber tomado algún otro posteriormente, cesa prácticamente la fase de digestión en el rumen.

Los resultados de la tabla 3 nos muestran que la sustitución del líquido del rumen fresco por líquido del rumen liofilizado lleva consigo un descenso en los niveles de digestibilidad del 17,0 por 100 y 8,0 por 100 para las muestras A y B, respectivamente. Indudablemente, esta caída en la digestibilidad está condicionada a que no existe en los tubos de incubación actividad protozoaria, debido a que éstos murieron en el proceso de liofilización. En el examen microscópico de las muestras del líquido del rumen liofilizado pudimos comprobar que los protozoos tenían la membrana del protoplasma rota en la mayoría de los casos. En efecto, como el papel exacto de los protozoos en el rumen («in vivo» e «in vitro») no está completamente claro debido a la dificultad que supone el aislarlos en cultivos puros (sin bacterias), podemos presumir que la única actividad habida en nuestro experimento fue debida a la población bacteriana que no sufrió ningún cambio con el proceso de liofilización. Los problemas generales de las interrelaciones protozoo-bacteria son muy complejos (E. F. Annyson y D. Lewis, 1962) y es posible que alguno de los mecanismos que se les achacan a los protozoos sean debidos a la contaminación por bacterias. En un futuro intentaremos profundizar más intensamente sobre estos problemas.

TABLA 1

Coefficientes medios de digestibilidad de tres muestras de alfalfa (A, hojas; B, tallos, y AB, tallos-hojas 1:1) empleando diferentes tiempos de incubación con líquido del rumen (fase 1)

Tiempos de incubación	4 horas	8 horas	12 horas	24 horas	48 horas
Número de experiencias	22	22	22	22	41
	%	%	%	%	(*) %
Muestra A... ..	55,4	57,9	62,3	70,9	80,4
Muestra AB	42,5	53,7	60,5	67,0	67,8
Muestra B... ..	30,5	39,8	49,8	60,9	61,3

(*) Tiempo empleado en la técnica de Tilley y Terry.

TABLA 2

Incrementos de los coeficientes de digestibilidad a distintos tiempos de incubación expresados porcentualmente

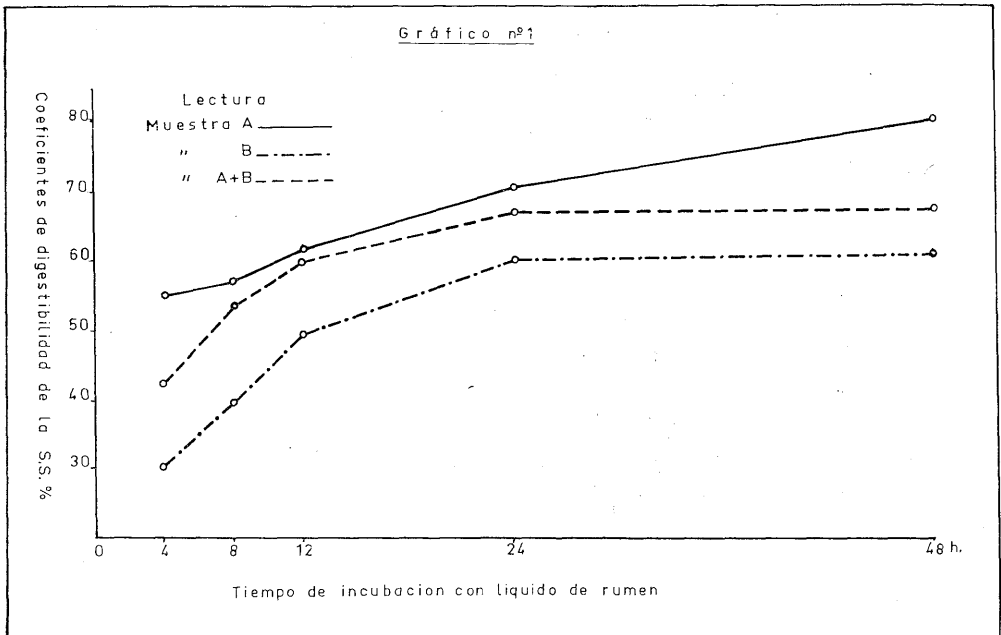
Intervalos	4	8	12	24	48
	%	%	%	%	%
Muestra A...	2,5	7,5	13,8	13,4	13,4
Muestra AB ...	26,3	12,7	10,7	1,2	1,2
Muestra B...	30,4	25,1	22,3	0,6	0,6

TABLA 3

Coeficientes de digestibilidad con líquido del rumen liofilizado (cuarenta y ocho horas de incubación)

	L. R. L. (1)	L. R. F. (2)	Diferencia (%)
Muestra A ...	68,7 %	80,5 %	17,0
Muestra B ...	56,6 %	61,3 %	8,3

- (1) L. R. L.=Líquido del rumen liofilizado.
 (2) L. R. F.=Líquido del rumen fresco.



BIBLIOGRAFIA

- (1) Annyson, E. P., y Lewis, D. (1959): *Metabolism in the rumen*. Methuen's. Monographs. London.
- (2) Barnes, R. F. (1967): *J. Anim. Sci.*, 26:1120.
- (3) Barnett, A. J. G. (1957): *J. Agr. Sci.*, 49:467.
- (4) Dehority, B. A., y Johnson, R. R. (1961): *J. Dairy Sci.*, 44:2242.
- (5) Hale, E. B., et al. (1947): *J. Nutr.*, 34:747.
- (6) Hershberger, J. V., et al. (1959): *J. Anim. Sci.*, 18:770.
- (7) Karn, J. F.; Johnson, R. R., y Dehority, B. A. (1967): *J. Anim. Sci.*, 26:381.
- (8) Quicke, C. V., et al. (1959): *J. Anim. Sci.*, 18:275.
- (9) Tilley, J. M. A., y Terry, R. A. (1963): *J. Brit. Grassl. Soc.*, 18:104.

Los autores agradecen al Director del Instituto, Prof. Dr. G. González, las facilidades dadas para la realización del trabajo. Asimismo agradecemos a la señorita Natividad Ramos la escurpulosidad con que ha llevado las pruebas de laboratorio.



Lavado de los residuos indigeridos con agua sobre crisoles porosos.