



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA, INVESTIGACIÓN Y SERVICIO EN ZOOTECNIA

POSGRADO EN PRODUCCIÓN ANIMAL

INÓCULO RUMINAL LIOFILIZADO PARA PRUEBAS DE DIGESTIBILIDAD Y FERMENTACIÓN *IN VITRO*

TESIS

Que como requisito parcial
para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

Presenta:

MARÍA GUADALUPE DOMÍNGUEZ ORDÓÑEZ

Bajo la supervisión de: LUIS ALBERTO MIRANDA ROMERO, Dr.



Marzo 2010

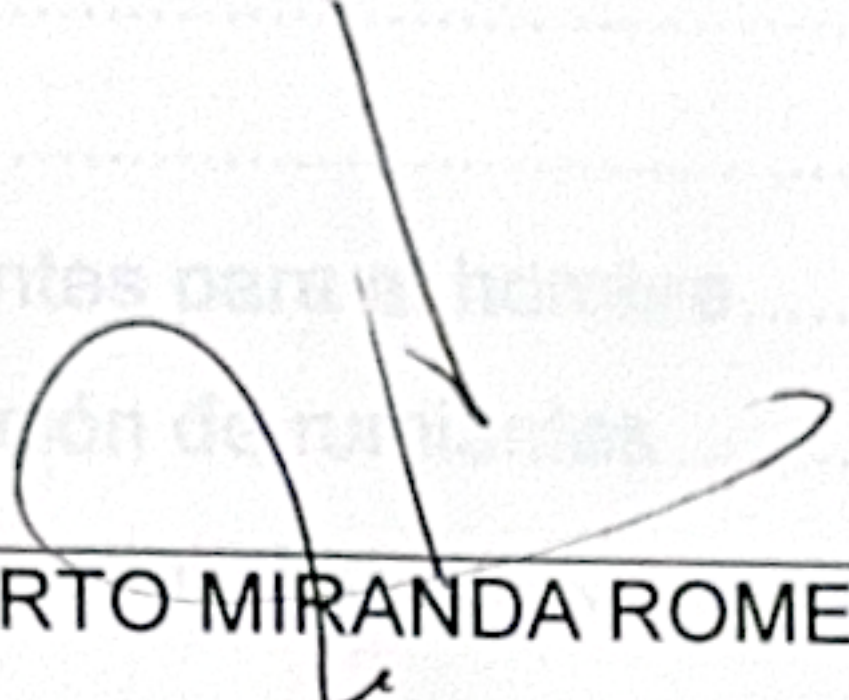
Chapingo, Estado de México

INÓCULO RUMINAL LIOFILIZADO PARA PRUEBAS DE DIGESTIBILIDAD Y FERMENTACIÓN *IN VITRO*

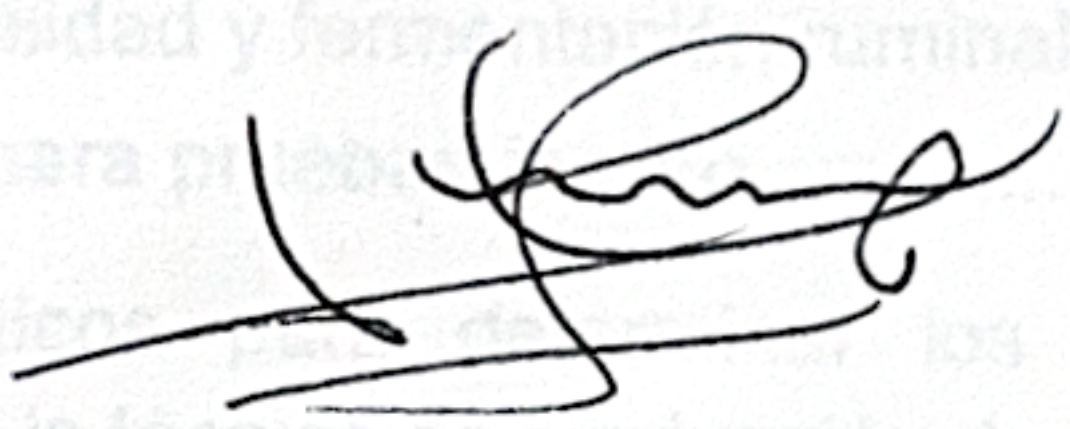
Tesis realizada por **MARÍA GUADALUPE DOMÍNGUEZ ORDÓÑEZ** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN GANADERA

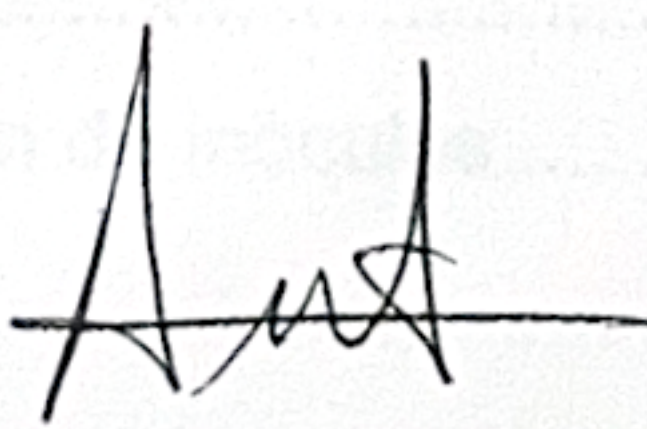
DIRECTOR:


Dr. LUIS ALBERTO MIRANDA ROMERO

ASESOR:


Ph.D. MAXIMINO HUERTA BRAVO

ASESOR:


Ph.D. PEDRO ARTURO MARTÍNEZ HERNÁNDEZ

CONTENIDO

CONTENIDO	iii
LISTA DE CUADROS	v
DEDICATORIAS	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
DATOS BIOGRÁFICOS	viii
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Importancia de los rumiantes para el hombre	3
2.2 Los forrajes en la producción de rumiantes	4
2.3 Pruebas para estimar digestibilidad	5
2.3.1 Prueba de digestibilidad <i>in vivo</i>	6
2.3.2 Prueba de digestibilidad <i>in situ</i>	7
2.3.3 Prueba de digestibilidad y fermentación ruminal <i>in vitro</i>	9
2.4 Modelos matemáticos para pruebas <i>in vitro</i>	13
2.4.1 Modelos matemáticos para determinar los parámetros de la cinética de fermentación en la técnica de producción de gas	14
2.4.2 Modelos desarrollados para estimar EM, DIVMS y DIVMO a partir de la producción de gas	18
2.5 Efecto del inóculo en los resultados de las pruebas de digestibilidad y fermentación	19
2.6 Método de conservación de inóculos	21
2.6.1 Congelación	21
2.6.2 Liofilización	23
2.6.3 Inóculos ruminales conservados y pruebas de digestibilidad <i>in vitro</i>	24
2.7 Literatura citada	25

3. FERMENTACIÓN Y DIGESTIBILIDAD RUMINAL <i>IN VITRO</i> DE FORRAJES USANDO UN INÓCULO LIOFILIZADO	31
3.1 Resumen	31
<i>IN VITRO</i> FERMENTATION AND RUMINAL DIGESTIBILITY OF FORAGES USING AN INOCULUM LYOPHILISATE	32
3.2 Abstract	32
3.3 Introducción	33
3.4 Materiales y métodos.....	34
3.4.1 Fermentación y digestibilidad <i>in vitro</i> de forrajes por inóculo ruminal fresco de tres donantes.....	34
3.4.2 Liofilización del inóculo ruminal y cuantificación de la población bacteriana	36
3.4.3 Cinética de fermentación y digestibilidad <i>in vitro</i> de forrajes por inóculos liofilizado y fresco	37
3.4.4 Análisis estadístico	39
3.5 Resultados y discusión	40
3.5.1 Fermentación y digestibilidad <i>in vitro</i> de forrajes por inóculo ruminal fresco de tres donantes.....	40
3.5.2 Liofilización del inóculo ruminal y cuantificación de la población bacteriana	43
3.5.3 Cinética de fermentación y digestibilidad <i>in vitro</i> de forrajes por inóculos liofilizado y fresco	45
3.6 Conclusiones	51
3.7 Literatura citada.....	51

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Descripción de diferentes modelos matemáticos para estimar parámetros de la cinética de fermentación.	15
Cuadro 2. Medios utilizados para la activación de microorganismos liofilizados.	39
Cuadro 3. Caracterización (%) ^z de la calidad de los sustratos usados para los ensayos de cinética de fermentación y digestibilidad <i>in vitro</i>	41
Cuadro 4. Componentes de la cinética de fermentación ^z (Vm, L y S) y digestibilidad <i>in vitro</i> ^y (DIV) a 72 h de incubación en inóculos ruminales de diferentes donadores en cuatro sustratos.	43
Cuadro 5. Población de bacterias totales y celulolíticas en muestras ruminales liofilizados con y sin glicerol.	44
Cuadro 6. Cinética de fermentación ^z y digestibilidad <i>in vitro</i> ^y de cuatro sustratos con inóculo fresco o liofilizado y activado por 12 h.	46
Cuadro 7. Parámetros de fermentación ^z y digestibilidad (24 y 72 h) <i>in vitro</i> ^y de cuatro sustratos utilizando un inóculo ruminal fresco o liofilizado y activado en diferentes medios por 24 h de incubación.	48
Cuadro 8. Coeficientes de regresión de un inóculo fresco sobre un inóculo liofilizado y activado por 24 h para las variables Vm, DIV ₂₄ y DIV ₇₂ de cuatro forrajes.	51

DEDICATORIAS

A mis padres **Leonel** y **María Flavia** quienes no sólo me dieron la vida, sino que gracias a ellos, a su apoyo, consejos y reprimendas he logrado uno de mis más anhelados triunfos, terminar mis estudios de Maestría.

A mis hermanos **Leonel**, **Ramón**, **Joel**, **Magdalena**, **Claudio**, **Demetrio** y **Cecilia**, quienes siempre han estado conmigo en todo momento.

A mi cuñada y amiga **Noemi** que además de brindarme su amistad me considero una integrante más en su familia.

A mis amigos **René^(T)** y **Carlos^(C)** por su apoyo en la realización de esta investigación y por todo el tiempo que hemos compartido.

A mis amigos **Leslie**, **Adaí**, **Alely**, **Irma**, **Laura**, **Mayra**, **Dante**, **Omar**, **Ezequías**, **Luis Eduardo**, **Ray^(J)**, **Fabian^(J)** y **Oscar**, con los que he pasado algunos de los mejores momentos de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A mi “**Alma Mater**” Universidad Autónoma Chapingo por que en su seno he forjado una de mis grandes metas, mi formación profesional, que sin duda representa el más grande logro en mi vida.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACyT) por financiar mis estudios de maestría.

Al **Dr. Luis Alberto Miranda Romero** por su apoyo, confianza, amistad y por haberme permitido participar en este proyecto de investigación y con ello brindarme la oportunidad de complementar mi formación.

Al **Dr. Maximino Huerta Bravo** por su apoyo en la realización de esta tesis, además por las observaciones realizadas para mejorar este documento.

Al **Dr. Pedro Arturo Martínez Hernández** por sus importantes observaciones y aportaciones a esta investigación.

A **todos los profesores** de Posgrado en Producción Animal por su colaboración en mi formación académica.

*“Enseñarás a volar, pero no volarán tu vuelo.
Enseñarás a soñar, pero no soñarán tu sueño.
Enseñarás a vivir, pero no vivirán tu vida.
Sin embargo... en cada vuelo, en cada vida,
en cada sueño, perdurará siempre la huella
del camino enseñado.”*

Madre Teresa de Calcuta

DATOS BIOGRÁFICOS



Datos personales

Nombre	María Guadalupe Domínguez Ordóñez
Fecha de nacimiento	7 de enero de 1986
Lugar de nacimiento	Chignahuapan, Puebla
CURP	DOOG860107MPLMRD02
Profesión	Ing. Agrónomo Especialista en Zootecnia
Cédula profesional	5549527

Desarrollo académico

Bachillerato	Preparatoria Agrícola, UACH
Licenciatura	Depto. de Enseñanza, Investigación y Servicio en Zootecnia, UACH
Maestría	Posgrado en Producción Animal, Depto. de Enseñanza, Investigación y Servicio en Zootecnia, UACH

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

Las técnicas de fermentación y digestibilidad *in vitro* son procedimientos comúnmente usados para determinar la digestibilidad; sin embargo, la variabilidad producida por la fuente de inóculo y calidad del mismo, son la causa fundamental de la variación de resultados en dichas pruebas (Bochi-Brum *et al.*, 1999). Además, una limitante para que cualquier laboratorio pueda llevar a cabo la prueba de digestibilidad *in vitro* es que se requieren animales fistulados (Streeter, 1969), por lo que el uso de un inóculo conservado puede reducir la variabilidad y hacer accesible esta prueba a todos los laboratorios.

Existen diferentes técnicas para determinar la biodisponibilidad de los nutrientes en los forrajes entre las que se encuentran las técnicas *in vivo*, *in situ* e *in vitro*; sin embargo, todas ellas presentan desventajas como lo son: requerir animales para realizar las pruebas, altas cantidades de alimento, instalaciones, etc. En el Capítulo 2 se muestra una revisión documental en la que se describen de manera general las metodologías utilizadas para determinar la biodisponibilidad de los nutrientes en los forrajes, así como las ventajas y desventajas de cada una de ellas.

Debido a los problemas que causa el mantener una fuente viva de inóculo, se han buscado alternativas como lo es la preservación de microorganismos, desarrollando así nuevas metodologías como la congelación de cultivos a -20 °C ó -40 °C, la preservación en nitrógeno líquido a -196 °C (Arcos y Ossal, 2004) y la liofilización, mismos métodos que se describen en el Capítulo 2 así como las ventajas de usar crioprotectores para evitar la ruptura de las membranas celulares con los cristales de hielo que se forman durante la conservación de los inóculos.

Luchini *et al.* (1996a) evaluaron los efectos de la congelación y liofilización como métodos de conservación del líquido ruminal, encontrando que las tasas de degradación de la proteína pueden ser estimadas con microorganismos ruminales conservados mediante los métodos antes mencionados. Luchini *et al.* (1996b) observaron que los microorganismos conservados actúan más lentamente en las primeras horas comparado con los del líquido ruminal fresco, por lo que propusieron preincubar los microorganismos conservados de 6 a 12 h antes de realizar las pruebas de digestibilidad, para con ello poder igualar la actividad de éstos con los del líquido ruminal fresco.

Los datos de digestibilidad obtenidos por Meneses *et al.* (2000) al utilizar líquido ruminal recién extraído oscilaron entre 70 y 72%, mientras que el rango de digestibilidad de materia seca al utilizar líquido ruminal conservado osciló de 50 a 88% al utilizar líquido ruminal congelado con nitrógeno líquido, y 56% al congelarlo a -20 °C. Ellos concluyeron que esta disminución de la actividad del inóculo, puede ser debido a la pérdida de microorganismos y al agotamiento de nutrientes que se produce durante el proceso de conservación. En el Capítulo 3 se presenta un estudio que tuvo como objetivo comparar el comportamiento del inóculo fresco con el inóculo liofilizado y activado con diferentes medios y tiempos.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Importancia de los rumiantes para el hombre

La producción de rumiantes tiene una función económica-social importante para prácticamente todos los países del mundo, ya que provee aproximadamente 657 y 80.5 millones de toneladas de leche y carne, respectivamente (FAO, 2009b); estos productos son fuente importante de proteína de buena calidad (Teferedegne, 2000). En México existe un elevado número de rumiantes, 28.8, 2.2, 7.2 y 8.9 millones de cabezas de ganado bovino para carne, bovinos para leche, ovinos y cabras respectivamente (SIAP-SAGARPA, 2009), los cuales favorecen la economía de productores grandes y pequeños.

Dentro de la cadena alimenticia, los rumiantes también son importantes para el hombre debido a que se alimentan de forraje fibroso y con subproductos agrícolas e industriales en condiciones de escasez de alimento. Estos alimentos no forman parte substancial de la dieta del hombre o de los no rumiantes por lo que no compiten por ellos (FAO, 2009a).

La capacidad de los rumiantes para asimilar alimentos fibrosos se debe a las adaptaciones anatómico-metabólicas que han desarrollado a lo largo de su existencia, así como la simbiosis que realizan con los microorganismos que habitan su rumen (Church y Pond, 1994). Dichos microorganismos, entre otras múltiples actividades, fermentan los carbohidratos estructurales (celulosa, hemicelulosa y pectina) y no estructurales (azúcares y almidón) de los forrajes. Los principales productos de la fermentación son ácidos grasos volátiles (AGV; acético, propiónico y butírico) y biomasa microbiana, los cuales representan

la principal fuente de energía y proteína para la nutrición del rumiante (Calsamiglia *et al.*, 2005). Los AGV y la biomasa microbiana proporcionan 55 y 90% de los requerimientos de energía y proteína del animal (Quintero *et al.*, 2001) de acuerdo con la intensidad de producción y la especie animal. Los microorganismos ruminales también son una fuente de vitaminas del complejo B y de aminoácidos esenciales (triptófano, treonina, metionina, entre otros; McDonald *et al.*, 2006)

Aproximadamente en el 50% de la superficie terrestre no es posible producir otros productos agrícolas que no sean forrajes fibrosos, debido a sus características edáficas como baja fertilidad, pH, etc. Estas tierras serían de poca utilidad para el hombre sin el ganado rumiante (Teferedegne, 2000).

2.2 Los forrajes en la producción de rumiantes

Los forrajes se producen principalmente para la alimentación del ganado. Este recurso alimenticio es de suma importancia para la alimentación de los rumiantes, ya sea en pastoreo o como forraje de corte en condiciones de producción intensiva. El forraje es el principal recurso alimenticio para sostener la producción de leche y carne destinadas a la población humana y se produce principalmente para la alimentación del ganado (Cárdenas *et al.*, 2003). El potencial de producción dependerá, entre otros factores, del valor nutritivo del forraje que consuma el animal (Ayala *et al.*, 2006), por lo que es importante conocer los factores que determinan el valor nutritivo de los forrajes, entre ellos los climáticos, características del suelo y manejo (Ruiz *et al.*, 2005).

El valor nutritivo de un forraje está determinado por su contenido de nutrientes, la biodisponibilidad de éstos, y el nivel de consumo por los animales (Meneses *et al.*, 2000). Para determinar la biodisponibilidad de los nutrientes o la utilización de los alimentos por los rumiantes se han desarrollado diversos métodos, los cuales pueden clasificarse según sus características en métodos *in vivo*, *in situ* e *in vitro*; dentro de este último grupo se encuentra el uso de

enzimas (Arce *et al.*, 2003), la digestibilidad *in vitro* (Tilley y Terry, 1963) y la técnica de producción de gas (Theodorou *et al.*, 1994). La técnica de producción de gas permite estimar la extensión y la cinética de degradación ruminal del alimento mediante la medición del volumen de gas producido durante el proceso fermentativo (Theodorou *et al.*, 1994).

Una de las ventajas de la técnica de producción de gas en relación con las técnicas *in vivo* e *in situ*, es que se puede cuantificar el curso de la fermentación, así como los componentes solubles del sustrato, aún en un determinado momento del proceso (Pell *et al.*, 1997). Los parámetros de la cinética de fermentación describen, indirectamente, la digestión del alimento y caracterizan algunas propiedades específicas del mismo, como la proporción de nutrientes consumidos que pueden ser absorbidos y utilizados por el animal, lo cual depende de un crecimiento activo de la población microbiana del rumen (Arce *et al.*, 2003).

2.3 Pruebas para estimar digestibilidad

El tracto gastrointestinal (TGI) de los rumiantes es diferente al de los no rumiantes, ya que los primeros tienen una serie de cavidades pregástricas (retículo, rumen y omaso; Church y Pond, 1994), de las cuales el rumen es la más grande y metabólicamente más importante. En este órgano se lleva a cabo la mayoría de la fermentación microbiana de los constituyentes químicos de los forrajes (Christie *et al.*, 1988) y donde la mayoría de los AGV, productos de la fermentación, son absorbidos a través de la pared ruminal. Paralelamente a la fermentación del alimento, la población microbiana se multiplica y parte de ella es arrastrada al abomaso e intestino delgado junto con la digesta ruminal, donde es digerida y asimilada como nutriente para el animal. El rumen es fundamental en la alimentación y nutrición de los rumiantes, ya que 90% de la proteína (Carro, 2001) y 60% de la energía que requiere el animal para

mantenimiento son generados en el rumen, a partir de la actividad fermentativa y la multiplicación bacteriana (Ferrari, 2008).

La determinación del valor nutritivo de los alimentos es fundamental para estimar el impacto de éstos en la nutrición y producción animal. Para la determinación del valor nutritivo de un alimento, no es suficiente con los análisis químicos, se debe considerar también los procesos de digestión, absorción y metabolismo animal. Las pruebas de digestibilidad permiten estimar la cantidad de nutrientes presentes en una ración que pueden ser absorbidos por el aparato digestivo quedando disponibles para el animal (Church y Pond, 1994).

La digestibilidad depende de la composición nutritiva de la ración, siendo a su vez afectada por el contenido de las heces de cantidades importantes de materiales de origen no dietético (Merchen, 1993). La digestibilidad de un forraje se relaciona inversamente con su contenido de FDN o FDA y directamente con su contenido celular, carbohidratos solubles (Barahora y Sánchez, 2005). Existen diferentes métodos para estimar la digestibilidad de los alimentos en rumiantes, las cuales pueden agruparse en pruebas: *in vivo*, *in situ* e *in vitro*.

2.3.1 Prueba de digestibilidad *in vivo*

Dentro de las pruebas de digestibilidad del alimento, la técnica *in vivo* es el procedimiento más aceptado por los nutriólogos en virtud de que en esta prueba se consideran, prácticamente todos los factores naturales involucrados en el proceso de digestión: ambiente del TGI, tasa de pasaje, de dilución, de digestión, consumo voluntario y tipo de alimento, población completa de microorganismos, especie y estado fisiológico de los animales (Meneses *et al.*, 2000).

La prueba de digestibilidad *in vivo* cuantifica la materia seca del alimento o nutrimentos (materia orgánica, PC, FDN, FDA, entre otros) consumido y la

materia seca o componentes químicos de las excretas producidas por el animal. Estas pruebas son laboriosas y costosas, puesto que se requieren animales, alimento suficiente, tiempo y personal calificado (McDonald *et al.*, 2006); dichos elementos se multiplican en función de los alimentos en investigación, el diseño experimental y el número de repeticiones. Dado que no es factible el control de todos los factores involucrados en la digestibilidad *in vivo*, la variabilidad de los resultados es grande, por lo que entre los métodos para determinar la digestibilidad resulta ser el de menor precisión. En virtud de tales dificultades se han propuesto distintos métodos *in situ* e *in vitro* para la determinación de la digestibilidad o fermentación ruminal (Bochi-Brum *et al.*, 1999).

2.3.2 Prueba de digestibilidad *in situ*

Ningún método indirecto de estimación de la digestibilidad es universalmente aceptado; sin embargo, se pueden hacer estimaciones admisibles con algunos métodos indirectos (Streeter, 1969). La técnica de digestibilidad *in situ* permite evaluar alimentos para rumiantes en cuanto a su potencial de degradación. Esta metodología es simple, ya que sólo se introducen bolsas (generalmente de nylon) con una cantidad determinada del sustrato a evaluar en el lugar o sitio del TGI donde se desea medir la degradación del alimento (rumen, abomaso, intestino, etc.). Las bolsas se mantienen en la sección del TGI elegida por un tiempo definido previamente, el cual varía de 2 a 72 h (Vanzant *et al.*, 1998), posteriormente las bolsas se extraen, se lavan y secan para cuantificar el residuo y estimar la digestibilidad de la materia seca, o bien hay que someter la muestra a determinaciones de algún componente químico (materia orgánica, proteína cruda, fibra detergente neutra, etc.) para estimar la digestibilidad de un nutrimento en particular.

La técnica *in situ* se ha cuestionado argumentando que presenta limitaciones serias entre las que destacan que es un procedimiento altamente invasivo que afecta directamente el consumo de alimento y no permite evaluar con precisión

alimentos con altos contenidos de material soluble, con pequeño tamaño de partícula (1 mm) o con alto contenido de almidones y lípidos, ya que este material puede escapar de las bolsas sin ser degradado (Ceballos *et al.*, 2008).

Una ventaja de la técnica *in situ* es que las bolsas con el alimento son sometidas al ambiente de la sección del TGI determinado (rumen, intestino, ciego, etc.) y a los factores naturales que afectan la digestibilidad, pero a pesar de eso los resultados obtenidos son variables como lo demuestra la investigación de Wilkerson *et al.* (1995). Estos investigadores compararon los resultados de digestibilidad *in situ* obtenidos por diferentes laboratorios en los que aplicaron la misma metodología y sustrato. La comparación mostró que los resultados fueron diferentes ($p < 0.01$) y concluyeron que existen dos puntos de la metodología que determinan tal variación: la ubicación de la bolsa dentro del rumen y la claridad del agua que se obtiene después del lavado de la bolsa, ya que al extraer la bolsa del rumen se deben eliminar por completo las partículas adheridas a la bolsa y esto se logra cuando el agua con la que se lava la bolsa es transparente.

Los resultados de las pruebas de digestibilidad *in situ* puede verse afectada por el tamaño de partícula del forraje que se va a evaluar, el tiempo de permanencia de las bolsas en el rumen, el tamaño de los poros de la bolsa y la especie animal. Damiran *et al.* (2008) al estimar la digestibilidad *in situ* de 15 forrajes molidos a diferente tamaño de partícula y diferentes cantidades de muestra, encontraron que el tamaño de partícula afectó el valor de la digestibilidad y concluyeron que con un tamaño de partícula de 2 mm no se afectan los resultados de digestibilidad.

Van Keuren y Heinemann (1962) demostraron que la digestibilidad de los forrajes se estabiliza a las 48 h y cuando el tiempo de permanencia de la bolsa dentro del rumen era menor a 48 h, había una gran variación en cuanto a digestibilidad. En un estudio realizado por Haugen *et al.* (2006) donde evaluaron

la degradación de los sustratos a diferentes tiempos, encontraron que en las primeras 10 h se degrada 75% del total de nutrientes digestibles, por lo que en lo sucesivo la tasa de degradación disminuyó, por consiguiente el tiempo fijado para determinar la digestibilidad de un alimento no debe ser menor a 48 h, pero en cuanto a la determinación de la cinética de digestión deberá tenerse cuidado con los datos obtenidos a tiempos menores de 48 h, por la variación que presentan éstos.

El tamaño de los poros de la bolsa deben ser lo suficientemente amplios para permitir que el líquido ruminal fluya libremente a través de la bolsa y con ello los microorganismos, pero también lo suficientemente pequeño para minimizar la pérdida de alimento sin degradar o que obstruyan el flujo del líquido ruminal ya que esto puede afectar el microambiente interno de la bolsa y la adecuada actividad microbiana (Pedraza, 2001). Un tamaño de poro entre 40 a 60 μm es adoptado como estándar (Ceballos *et al.*, 2008).

Aunque la técnica de digestibilidad *in situ* es usada ampliamente en nutrición de rumiantes y evaluación de alimentos, debido a que es una técnica menos costosa y laboriosa que la prueba *in vivo* y por lo tanto, se puede tener un elevado número de repeticiones en un mismo animal (Ortega y Carranco, 1993), es necesario estandarizarla tomando en cuenta los factores mencionados tanto intra como interlaboratorios.

2.3.3 Prueba de digestibilidad y fermentación ruminal *in vitro*

Por su practicidad y precisión, la técnica de digestibilidad *in vitro* (DIV) descrita por Tilley y Terry (1963) es el procedimiento, con ligeras modificaciones, más utilizado en investigación para la estimación de la digestibilidad ruminal de forrajes; sin embargo, la técnica modificada por Georing y Van Soest (1970) permite una valoración más rápida de los alimentos sin afectar negativamente la precisión del valor obtenido.

La DIV consiste en incubar a 39 °C una mezcla de muestra de alimento e inóculo ruminal durante 48 h. El residuo se filtra, se pesa y pone en ebullición durante 1 h en una solución detergente neutro a 100 °C. El tratamiento con detergente neutro elimina la población de microorganismos adheridos a las partículas de alimento, de no hacerlo así, los valores de digestibilidad serían subestimados. Con los datos de materia seca inicial en la bolsa y la de FDN del residuo se obtiene una estimación de la digestibilidad verdadera de los alimentos (Bochi-Brum *et al.*, 1999).

La DIV de los forrajes en el que se usa un inóculo de microorganismos ruminales es probablemente la determinación de laboratorio que mejor se correlacionan con la digestibilidad *in vivo*. Meyer *et al.* (1971) compararon cuatro métodos de digestibilidad *in vitro*: Wisconsin (Baumgardt *et al.*, 1962), Tilley y Terry (Tilley y Terry, 1963), VIVAR (Fina *et al.*, 1962) y digestibilidad de la FDN (Van Soest y Wine, 1966), con lo que concluyeron que el método de digestibilidad de la FDN y el método desarrollado por Tilley y Terry son superiores para estimar la digestibilidad *in vivo*.

Las técnicas de digestibilidad *in vitro* que utilizan líquido ruminal han supuesto grandes ventajas, ya que a pesar de sobrevalorar los datos *in vivo* se consideran buenos predictores de la digestibilidad. Estas técnicas reducen sustancialmente el número de animales y la cantidad de alimento requeridos para el ensayo; sin embargo, estas técnicas también plantean otros problemas, siendo una grave limitante de utilización por los laboratorios comerciales (Meneses *et al.*, 2000); entre los problemas más comunes están: la variación en la actividad del fluido ruminal, variaciones incontrolables que se dan dentro del laboratorio y entre laboratorios, y la disponibilidad de animales ruminalmente fistulados (Arce *et al.*, 2003).

Método enzimático de determinación de la digestibilidad *in vitro*

Arce *et al.* (2003) estimaron y compararon la digestibilidad de forrajes con un método enzimático en comparación con el método *in vitro*, encontraron que la digestibilidad obtenida por el métodos enzimático fue menor ($p<0.001$) con relación al método *in vitro* para un mismo sustrato; esto fue atribuido a la riqueza microbiana y enzimática del inóculo ruminal, el cual causa una mayor degradación de los forrajes, mientras que en el método enzimático se trabaja sólo con celulasa proveniente del hongo *Penicillium funiculosum*.

En la determinación *in vitro* utilizando enzimas el grado de ataque de éstas depende de la calidad del forraje, es decir, se obtienen diferentes resultados para un mismo forraje cuando se utilizan enzimas de diferente especificidad. Arce *et al.* (2003) concluyeron que el método enzimático puede ser una alternativa para evaluar la digestibilidad de los forrajes en laboratorio siempre y cuando se utilicen mezclas de enzimas necesarias para degradar el forraje.

Técnicas de producción de gas para determinar la fermentación ruminal *in vitro*

La mayoría de los procedimientos *in vitro* desarrollados hasta el momento miden la desaparición de sustrato en un punto final de medida y el hacerlo a diferentes tiempos para estimar la cinética de digestión complica, y encarece aún más estos métodos. Se ha propuesto como una alternativa a la desaparición de sustrato, la medición de la producción acumulada de gas (CO_2 , CH_4 y AGV) como indicador de la fermentación ruminal del alimento. Este sistema tiene la ventaja de medir algunos de los productos finales del metabolismo microbiano, en lugar de registrar la desaparición del sustrato, lo cual no siempre se debe al ataque microbiano (Pell y Schofield, 1993; Bruni y Chilbroste, 2001). La cantidad de gas producido por la incubación *in vitro* de un

substrato está íntimamente relacionada con su digestibilidad y por tanto con su valor energético (Pedraza, 2001).

Se han utilizado tres aproximaciones para medir la producción de gas: 1) medir el volumen de gas a presión atmosférica constante; 2) medir la presión de gas a un volumen fijo; y 3) una combinación de los métodos 1 y 2. La elección del método para medir la producción de gas depende del supuesto que los excesos de presión acumulada afectan el crecimiento microbiano y generan cambios en la solubilidad de los gases en el medio, lo cual puede generar errores en las mediciones (Posada y Noguera, 2005).

La energía para el crecimiento microbiano es derivada de la fermentación de los carbohidratos, principalmente almidón y celulosa, cuya fermentación anaerobia produce ácidos grasos volátiles, succinato, formato, lactato, etanol, dióxido de carbono, metano y trazas de hidrógeno; sin embargo, los carbohidratos también aportan esqueletos de carbono esenciales para la síntesis de biomasa microbiana. La producción de gas desde la fermentación de proteína es relativamente pequeña y la derivada de la grasa es insignificante, por lo que se supone que el gas proviene básicamente de la fermentación de carbohidratos (Posada y Noguera, 2005)

Las curvas de producción de gas presentan forma sigmoideal y en ellas se pueden distinguir tres fases: una inicial, de lenta producción de gas; una exponencial, de rápida producción de gas; y una asintótica, donde existe una lenta o casi nula producción de gas. Durante la fase inicial ocurre la hidratación y colonización del sustrato insoluble por los microorganismos ruminales, cuando el sustrato es saturado con microorganismos y enzimas, la fase exponencial toma lugar; durante esta fase, la parte más degradable del sustrato insoluble es degradada primero, y el sustrato menos digestible precisa de más tiempo para ser degradado. Finalmente, cuando la fracción potencialmente degradable ha sido digerida, la producción de gas tiende a cero (Posada y Rosero, 2007).

McBee (1952) fue uno de los primeros que describió un método para medir la producción de gas, denominado método manométrico; para ello utilizó líquido ruminal proveniente de ovinos alimentados con heno de alfalfa, incubado a 37 °C y con suministro constante de CO₂, al cual le adicionó el sustrato (glucosa, almidón, hemicelulosa y celulosa) y bicarbonato de sodio como buffer, para asemejar las condiciones ruminales, y posteriormente midió la producción de gas con un manómetro; mismo método usado por Trei *et al.* (1970) al evaluar el efecto que tenía el procesamiento de los granos en la fermentación *in vitro*. El método manométrico fue modificado por Czerkowski y Grace (1975), quienes midieron la producción de gas utilizando una jeringa.

Pell y Schofield (1993) desarrollaron un método para medir la producción de gas que constaba de un sensor conectado a una botella que contenía la muestra y el inóculo ruminal. El sensor de presión de gas se conectaba a una computadora que registraba cada uno de los datos en un software, el cual puede ser instalado en Windows versión 3.0 y 3.1 (Microsoft y Redmond). Esta metodología la aplicaron en la medición de producción de gas de diferentes cantidades de alfalfa y diferentes cantidades de inóculo ruminal.

Una limitación de la técnica de producción de gas es la falta de uniformidad en la metodología, lo que hace difícil comparar resultados entre diferentes estudios. Además, como otros métodos de bio-ensayo, se requieren animales fistulados en el rumen para la obtención del inóculo (Posada y Noguera, 2005).

2.4 Modelos matemáticos para pruebas *in vitro*

La mayor limitante en la producción bovina de los países en desarrollo es la fluctuación en la cantidad y la calidad de los recursos forrajeros. Por tanto, la descripción de los alimentos en términos de la cinética de digestión provee una base útil para su evaluación y eficiente utilización (Rosero y Posada, 2007).

Los procesos de degradación y tránsito de las partículas por el tracto gastrointestinal son afectados por factores inherentes al animal y características intrínsecas del alimento. Estos factores deben ser considerados en los modelos matemáticos para estimar con mayor precisión los parámetros de la cinética de degradación del alimento en el tracto digestivo (Rosero y Posada, 2007).

Cuando los alimentos son incubados en fluido ruminal y solución tampón, su digestibilidad y tasas de degradación pueden ser estimadas por la medición de la producción de gas *in vitro*. La descripción estadística por modelos matemáticos de las curvas de producción de gas permite la comparación de los sustratos, la evaluación de diferentes ambientes de fermentación, y proporciona información referente a la tasa de fermentación de los constituyentes solubles y estructurales. Para evaluar los resultados es necesario un modelo que describa la producción de gas en el tiempo, que permita un adecuado ajuste estadístico de los datos y cuantifique con precisión los parámetros con significado biológico (Posada y Rosero, 2007).

El ajuste de los perfiles acumulados de gas a una apropiada ecuación permite resumir la información de la cinética. Así, la descripción matemática de las curvas de producción de gas permite la comparación de los sustratos y la evaluación de diferentes ambientes de fermentación de los constituyentes solubles y estructurales (Posada y Noguera, 2005).

2.4.1 Modelos matemáticos para determinar los parámetros de la cinética de fermentación en la técnica de producción de gas

Diferentes modelos están disponibles para estimar los parámetros de fermentación (Cuadro 1) a través de las curvas de producción de gas, todos ellos con diferencias de ajustes estadísticos dependiendo de las condiciones experimentales y del tipo de sustrato, lo que hace necesaria su evaluación. No obstante, la selección del modelo no debe tener solamente en cuenta

consideraciones de ajuste matemático, sino también la coherencia biológica de los parámetros (Posada y Rosero, 2007).

Cuadro 1. Descripción de diferentes modelos matemáticos para estimar parámetros de la cinética de fermentación.

Modelo	No. de parámetros	Ecuación
Exponencial	3	$Y = Y_{\infty} \exp[-\mu(t - \lambda)]$
Logístico	3	$Y = \frac{Y_{\infty}}{1 + \exp[-\mu(t - t_i)]}$
Gompertz	3	$Y = Y_{\infty} \exp\{-\exp[-\frac{\mu_0}{D} \exp(-Dt)]\}$
Richards	4	$Y = \frac{Y_{\infty}}{1 + v \exp[-\mu(t - t_i)]^{1/v}}$
Schnute	4	$Y = \{Y_1^b + (Y_2^b - Y_1^b) \frac{1 - \exp[-a(t - t_1)]}{1 - \exp[-a(t_2 - t_1)]}\}^{1/b}$
Gompertz modificado	5	$Y = Y_{\infty} \exp\{-\frac{\mu_{or}}{D_r} \exp(-D_r t) - \frac{\mu_{os}}{D_s} \exp(-D_s t)\}$

Fuente: Posada y Rosero (2007).

Modelos exponenciales simples: el método de digestión *in vitro* de la fibra desarrollado por Tilley y Terry (1963) ha sido ampliamente utilizado para determinar las tasas de digestión de la fibra soluble. Los datos de estos experimentos son ajustados a través de funciones exponenciales (Mertens y Loftén, 1980):

$$S_T = S_I + S_0 \quad (t < L)$$

$$S_T = S_I + S_0 \times \exp(-k \times (t - L)) \quad \text{con } (t > L)$$

donde, S_T es el residuo del total de fibra en el tiempo t , S_I es la fibra indigestible, S_0 es la fibra inicial digestible, k es una tasa constante de digestión (h^{-1}) y L es el tiempo de colonización. Para utilizar este modelo en la técnica de producción

de gas, la ecuación debe ser modificada porque la aparición de un producto es considerada antes de la desaparición de un sustrato (Posada y Rosero, 2007):

$$V_T = 0 \quad (t < L)$$

$$V_T = V_F \times (1 - \exp(-kx(t - L))) \quad \text{con } (t > L)$$

donde, V_T corresponde al volumen de gas en el tiempo t , V_F es el volumen de gas correspondiente a la digestión completa del sustrato (asíntota), k es la tasa de producción de gas (h^{-1}) y L es el tiempo de colonización. Esta ecuación exponencial simple puede ser derivada del supuesto de que la tasa de producción de gas depende únicamente del sustrato disponible para la fermentación una vez alcanzado el tiempo de colonización (Posada y Rosero, 2007).

Muchos alimentos para animales contienen una mezcla de carbohidratos que presentan diferentes tasas de degradación. Para el análisis de la cinética de producción de gas, el sustrato puede ser considerado como una única entidad con una tasa de degradación que no varía con el tiempo (monocompartimental) o como una entidad múltiple constituida por una fracción de rápida degradación y otra fracción de lenta fermentación, cada una de las cuales presenta una tasa de degradación característica (multicompartimental). La ecuación anterior puede ser modificada para estimar cada una de estas fracciones (Posada y Rosero, 2007):

$$V_T = \sum V_{Fn} \times (1 - \exp(-k_n x(t - L_n)))$$

donde, n representa cada una de las fracciones fermentables dentro del sustrato.

Modelos logísticos: el modelo exponencial supone que el único factor limitante en la tasa de producción de gas es la cantidad de fibra digestible. Una función de crecimiento logístico supone que la producción de gas es proporcional al

tamaño de la población microbiana y al sustrato digestible. En el inicio de la fermentación, la población microbiana constituye el factor limitante; y ya en el final de la fermentación es la disponibilidad de sustrato fermentable lo que limita la tasa de producción de gas. En consecuencia, una curva logística es inherentemente sigmoideal y la máxima tasa de producción de gas ocurre cuando la mitad del sustrato ha sido fermentado (Schofield *et al.*, 1994). El modelo que representa este tipo de comportamiento puede ser descrito como:

$$V_T = V_F \times (1 + \exp(2 - 4 \times S \times (t - L)))^{-1}$$

donde, V_T corresponde al volumen de gas en el tiempo t , V_F es el volumen de gas correspondiente a la digestión completa del sustrato (asíntota), S representa una tasa específica semejante a la tasa de degradación y L es el tiempo de colonización.

Modelos empíricos: para el ajuste de las curvas de producción de gas se tiene la siguiente ecuación (Groot *et al.*, 1996):

$$V = \Sigma V_F \times (1 + (B/t)^C)^{-1}$$

donde, V_F es el volumen de gas producido, B corresponde al tiempo (h) en el cual la mitad del volumen total de gas ha sido producido, y C es un valor positivo que cambia simultáneamente con B y determina la forma de la curva. Cuando $C \leq 1$, la curva no tiene punto de inflexión y presenta la forma de una función exponencial; y cuando $C \geq 1$, la curva es sigmoideal. La ecuación es muy versátil y permite reproducir las curvas de producción de gas con una buena aproximación, aunque desafortunadamente el parámetro C es difícil de interpretar en términos biológicos.

2.4.2 Modelos desarrollados para estimar EM, DIVMS y DIVMO a partir de la producción de gas

Energía metabolizable

El método de producción de gas ha sido ampliamente utilizado para evaluar los valores de energía en diferentes tipos de alimento particularmente pajas, subproductos de la agroindustria y varios forrajes tropicales. Getachew *et al.* (2002) realizaron un experimento en donde compararon los resultados de producción de gas de diferentes alimentos y a partir de éste la estimación de la energía metabolizable (EM) con la fórmula desarrollada por Menke y Steingass (1988); tales datos fueron estimados por laboratorios ubicados en diferentes países. Según la fórmula desarrollada para el cálculo de la EM se debe de reportar la producción de gas a las 24 h expresada por cada 200 mg de materia seca. La EM (MJ kg MS^{-1}) la calcularon con la siguiente ecuación:

Para forrajes

$$\text{EM (MJ kg MS}^{-1}\text{)} = 2.20 + 0.136\text{PG} + 0.057\text{PC} + 0.0029\text{CF}^2 \quad (\text{R}^2 = 0.94)$$

donde, PG es la producción de gas a las 24 h, PC es el porcentaje de proteína cruda del forraje y CF es el contenido de extracto etéreo del forraje.

Para alimentos concentrados

$$\text{EM (MJ kg MS}^{-1}\text{)} = 1.06 + 0.157\text{PG} + 0.084\text{PC} + 0.22\text{CF}^2 - 0.081\text{CA}$$

donde, PG es la producción de gas a 24 h, PC es el porcentaje de proteína cruda del forraje, CF es el contenido de extracto etéreo del forraje y CA es el contenido de cenizas.

Getachew *et al.* (2002) concluyeron que la predicción de los valores de EM a partir de la producción de gas a 24 h con el método de Menke y Steingass

(1988) no debe ser considerado absoluto, debido a que sólo tres de siete obtienen valores de EM similares a los obtenidos en laboratorios.

Digestibilidad in vitro de la materia seca

Blümmel *et al.* (2005) realizaron una investigación en la que efectuaron una fermentación *in vitro* y midieron la producción de gas a diferentes tiempos, así como la digestibilidad de la materia seca (DIVMS); con esos datos obtuvieron una ecuación donde relacionan ambas variables y estiman la DIVMS con la siguiente ecuación:

$$\text{DIVMS} = 68 + 2.3 \times \text{PG} \quad (R^2 = 0.38 \text{ y } p = 0.0013)$$

Donde se considera el dato de la PG a 24 h de iniciada la fermentación.

Digestibilidad de la materia orgánica

$$\text{DMO (\%)} = 14.88 + 0.889\text{PG} + 0.45\text{PC} + 0.0651\text{CA} \quad (R^2 = 0.92)$$

donde, se requiere tener el dato de la producción de gas a 24 h, además de la proteína cruda y el contenido de cenizas.

2.5 Efecto del inóculo en los resultados de las pruebas de digestibilidad y fermentación

Debido a que la población microbiana ruminal se ve afectada por numerosos factores (tipo de alimentación, salud del animal, tiempo post-alimentación, etc.), la procedencia del inóculo ruminal se considera la mayor fuente de variación en la determinación de la digestibilidad y fermentación *in vitro*. En este sentido, la ración ingerida por los animales utilizados como donantes es uno de los principales factores que afectan al número y actividad de los microorganismos ruminales y que consecuentemente, pueden afectar los valores de la digestibilidad *in vitro* (DIV) de los alimentos (Araujo y Vergara, 2007).

Bochi-Brum *et al.* (1999) alimentaron animales donantes de líquido ruminal con diferentes proporciones forraje:concentrado y posterior a ello midieron la DIV de diferentes forrajes y concentrados, los autores concluyeron que la ración de los animales donantes sí afectó a la DIV de los forrajes estudiados, siendo inferiores los valores obtenidos al utilizar como inóculo el líquido ruminal de los animales que recibieron la ración alta en concentrado (80%).

Los valores inferiores de DIV de forrajes con inóculos provenientes de animales alimentados con dietas altas en concentrados puede deberse a que las raciones altas en carbohidratos de fácil fermentación, aumentan la energía y disminuyen el componente estructural (fibra), por lo que disminuye la secreción de saliva y con ello la afluencia de sustancia buffer al rumen, por lo que el pH cae a un nivel favorable para la flora amilolítica y sacarolítica (Araujo y Vergara, 2007). Este hecho causaría una disminución en el número de microorganismos celulolíticos del inóculo ruminal procedente de estos animales, como consecuencia del descenso del pH ruminal ocasionado por el consumo de altas cantidades de concentrado.

Brooks y Urness (1984) realizaron un estudio en el que evaluaron la digestibilidad de nueve forrajes y utilizaron ovinos y bovinos como fuente de inóculo ruminal; además estimaron la digestibilidad *in vivo* de forrajes para estas mismas especies y para alces, que fueron alimentados de la misma manera. La conclusión de esta investigación fue que se puede utilizar inóculo de diferente especie animal para predecir la digestibilidad de forraje en una especie determinada. Salem (2005) determinó la producción de gas y digestibilidad *in vitro* de leguminosas forrajeras, colectadas en diferente época del año y utilizó diferentes fuentes de inóculo (bovinos, ovinos y búfalos); en su investigación encontró que la digestibilidad y fermentación *in vitro* de las leguminosas son afectadas por la época del año cuando se utiliza como donador de líquido ruminal a los bovinos y ovinos, pero no así para los búfalos, donde no se encontraron diferencias en la digestibilidad y fermentación *in vitro*

de los forrajes, por lo que el autor concluye que no es posible utilizar líquido ruminal de ovinos y bovinos para estimar dichos parámetros en búfalos.

Bueno *et al.* (2005) realizaron un experimento donde compararon la producción de gas, durante la fermentación de diferentes sustratos utilizando como donadores de líquido ruminal a ovinos y bovinos; llegaron a la conclusión que la producción total de gas no se ve afectada por la fuente de líquido ruminal; sin embargo, la fase *lag* fue menor al utilizar líquido ruminal de bovinos comparado con el de ovinos, además también encontraron diferencias en la dinámica de la producción de gas.

2.6 Método de conservación de inóculos

En cualquier laboratorio de microbiología es fundamental el mantenimiento y conservación de las colecciones de microorganismos con los que se trabajan. Existen una gran variedad de métodos de mantenimiento y conservación de los microorganismos cuya utilización va a depender en parte del tiempo previsto y de las características de los diferentes microorganismos. El mantenimiento *in vitro* de cultivos activos requiere una cantidad considerable de trabajo, y ocasiona inestabilidad genética de los aislados microbianos. Por esta razón, para la preservación de microorganismos se han desarrollado nuevas metodologías como la congelación de cultivos a -20 °C ó -40 °C, y la preservación en nitrógeno líquido a -196 °C (Arcos y Ossal, 2004).

2.6.1 Congelación

Los microorganismos pueden ser conservados para su posterior estudio o utilización a través de diferentes métodos como la congelación y liofilización, que sólo reducen su actividad metabólica para que estos se mantengan viables. La congelación es un método físico-químico que permite conservar microorganismos viables sin sufrir cambios genotípicos. En este proceso se involucra el agua como microambiente y ella es la que cambia su estado de

líquido a sólido; por otro lado la bacteria inmersa en este medio debe adaptarse a las condiciones de este nuevo ambiente, transformar la velocidad de su metabolismo, conservar su viabilidad y evitar que los cristales de hielo formados por el cambio de temperatura del agua les cause algún daño (Joo y Dupré, 2002).

El mecanismo de daño celular por congelación más significativo es la formación de cristales y es necesario entender dicho mecanismo para prevenirlo. Se han considerado como crioprotectores a diversas sustancias que evitan la formación de estos cristales, tales como el glicerol que es una de las mejores sustancias por sus características moleculares que le permiten simular una vitrificación alrededor de la bacteria, lo cual impide que la formación de cristales de hielo lesione las membranas citoplasmáticas (Sánchez y Corrales, 2005).

En el proceso de congelación, la velocidad metabólica bacteriana se reduce significativamente, a tal punto que su metabolismo se hace imperceptible, pero suficiente para mantener al microorganismo vivo. Algunas adaptaciones de la célula bacteriana son: la producción de enzimas resistentes al frío, sistemas de transporte a través de membrana adaptados a bajas temperaturas, aumento de la concentración de ácidos grasos en la misma cadena de fosfolípidos de la membrana celular, esta última para que continúe el estado semifluido de la membrana y evitar la congelación (Joo y Dupré, 2002).

Sánchez y Corrales (2005) evaluaron la congelación como método de conservación de bacterias y sus resultados les permiten concluir que la actividad bioquímica de la bacteria se ve afectada por el estrés, pero que es un estado transitorio. Cuando el microorganismo se estabiliza y se elimina la causa de estrés, los procesos moleculares son recuperados en su totalidad; sin embargo, el estrés producido por el procedimiento de congelación debe ser mitigado en el momento del procedimiento de descongelación y el medio que se provea a los microorganismos bacterianos debe ser líquido para que facilite el

intercambio molecular iónico y se restituya la actividad bioquímica de la membrana rápidamente.

2.6.2 Liofilización

La liofilización es un método muy utilizado para conservar microorganismos; sin embargo, algunas bacterias son sensibles a esta técnica porque los niveles de supervivencia disminuyen significativamente después de ser sometidas a este proceso, e incluso su mantenimiento prolongado hace que la viabilidad celular disminuya aún más. Tal es el caso de las especies del género *Mycobacterium* (Espinosa *et al.*, 2001).

Entre los factores que afectan la viabilidad de los microorganismos liofilizados, se encuentran: la naturaleza de la cepa, las condiciones de cultivo, la fase de crecimiento, la concentración celular, la formulación de los medios protectores contra la liofilización, los parámetros de la liofilización y el modo de rehidratación (Espinosa *et al.*, 2001).

Los microorganismos ruminales pueden ser protegidos del proceso de congelación-deshielo, mediante el uso de compuestos que son solubles, no tóxicos y capaces de penetrar en las células (crioprotectores), con lo que actúan previniendo el aumento de las concentraciones de electrolitos y en consecuencia la menor muerte de microorganismos; existen sustancias que se utilizan comúnmente con buenos resultados como protectores en la liofilización de bacterias (Sánchez y Corrales, 2005).

Los crioprotectores son sustancias que protegen del daño que se pueda producir en las células microbianas en el momento de la congelación. Existen muchos compuestos que se pueden utilizar como crioprotectores entre los que están leche descremada, las peptonas, el glutamato de sodio, los azúcares y otros (Sánchez y Corrales, 2005), pero el que se utiliza con mayor frecuencia es el glicerol, a una concentración del 5 al 20%. También se pueden utilizar el

dimetilsulfóxido y carbohidratos como glucosa, lactosa, sacarosa e inositol. En su elección influye el tipo de microorganismos que se quiera conservar (García y Uruburu, 2000).

El glicerol se recomienda como crioprotector, debido a su elevado punto de evaporación y a su higroscopicidad, que provoca que los “líofilos” queden muy viscosos. No es conveniente utilizar el dimetilsulfóxido, porque es algo tóxico, y al concentrarse por la evaporación del agua puede dañar a las células microbianas. Por tanto, para la liofilización se recomiendan como crioprotectores el inositol para la mayoría de las bacterias, y la leche descremada para los hongos y actinomicetos, pero para algunos microorganismos pueden ser más convenientes otros crioprotectores, por ejemplo, el glutámico-glutamato para las bacterias lácticas, mezclas de glucosa con caldo de hígado, etc. (García y Uruburu, 2000).

2.6.3 Inóculos ruminales conservados y pruebas de digestibilidad *in vitro*

Conservar inóculos ruminales podría reducir la variabilidad de resultados en las pruebas de digestibilidad y fermentación *in vitro* por efecto de la fuente de inóculo y composición microbiana del mismo, además los inóculos serían accesibles para cualquier laboratorio para realizar dichas prueba sin requerir de animales (Meneses *et al.*, 2000).

Luchini *et al.* (1996a) evaluaron los efectos de la congelación y liofilización como métodos de conservación del líquido ruminal, encontrando así que las tasas de degradación de la proteína pueden ser estimadas con microorganismos ruminales conservados mediante los métodos antes mencionados. Luchini *et al.* (1996b) observaron que los microorganismos conservados actúan más lentamente en las primeras horas comparado con los del líquido ruminal fresco, por lo que propusieron preincubar los microorganismos conservados de 6 a 12 h antes de realizar las pruebas de

digestibilidad, para con ello poder igualar la actividad de éstos con los del líquido ruminal fresco.

Los datos de digestibilidad obtenidos por Meneses *et al.* (2000) al utilizar líquido ruminal recién extraído oscilaron entre 70 y 72%, mientras que el rango de digestibilidad de materia seca al utilizar líquido ruminal conservado osciló de 50 a 88% al utilizar líquido ruminal congelado con nitrógeno líquido, y 56% al congelarlo a -20 °C. Ellos concluyeron que esta disminución de la actividad del inóculo, puede ser debido a la pérdida de microorganismos y al agotamiento de nutrientes que se produce durante el proceso de conservación.

Meneses *et al.* (2000) realizaron un experimento similar al de Luchini *et al.* (1996a), con el cual concluyeron que el líquido ruminal conservado subestima los datos que se obtienen con líquido ruminal fresco; sin embargo, mencionan que los métodos estudiados se pueden utilizar para conservar el líquido ruminal que se usa para estimar la digestibilidad *in vitro*.

2.7 Literatura citada

- Araujo F., O., y J. Vergara L. 2007. Propiedades físicas y químicas del rumen. Archivos Latinoamericanos de Producción Animal 15: 133-140.
- Arce P., C., T. Arbaiza F., F. Carcelén C., y O. Lucas A. 2003. Estudios comparativos de la digestibilidad mediante dos métodos de laboratorio. Revista de Investigación Veterinaria del Perú 14: 1609-9117.
- Arcos, M. L., F. Ossal, y T. E. Diaz. 2004. Criopreservación de aislados nativos de la bacteria ruminal *Fibrobacter succinogenes*. Revista CORPOICA 5: 60-63.
- Ayala, R., C. Ardy, R. Pierruguez, y R. Piedra. 2006. Valor nutritivo del ensilado de pastos tropicales III. Fermentación ruminal en carneros alimentados con ensilado sólo o suplementado con energía y/o proteína. Revista Electrónica de Veterinaria 3. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n030306/030602.pdf>. Consultada el 20 de noviembre de 2009.
- Barahona R., R., y S. Sánchez P. 2005. Limitaciones físicas y químicas de la digestibilidad de pastos tropicales y estrategias para aumentarla. Revista CORPOICA 6. <http://www.corpoica.org.co/SitioWeb/Archivos/oferta/v6n1>

_p69_82_limitaciones_fisicoquimicas_digestpastos.pdf. Consultada el 2 de enero de 2010.

- Baumgardt, B. R., M. W. Taylor, and J. L. Cason. 1962. Evaluation of forages in the laboratory II. Simplified artificial rumen procedure for obtaining repeatable estimates of forage nutritive value. *Journal of Dairy Science* 45: 62-78.
- Blümmel, M., J. W. Cone, A. H. Van Gelde, I. Nashalai, N. N. Umunnac, H. P. Makkara, and K. Becker. 2005. Prediction of forage intake using *in vitro* gas production methods: comparison of multiphase fermentation kinetics measured in an automated gas test, and combined gas volume and substrate degradability measurements in a manual syringe system. *Animal Feed Science and Technology* 123-124: 517-526.
- Bochi-Brum, O., M. D. Carro, C. Valdés, J. S. González, and S. López. 1999. *In vitro* digestibility of forages and concentrates: Effect of diet on donor animals. *Archivos de Zootecnia* 48: 51-61.
- Brooks, J., and J. P. Urness. 1984. Comparison of *in vivo* and *in vitro* digestibility of forages by elk. *Journal of Animal Science* 58: 963-970.
- Bruni, M. A., y P. Chilibroste. 2001. Simulación de la digestión ruminal por el método de la producción de gas. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal* 9: 43-51.
- Bueno, C. S., L. S. Cabral, S. P. Gobbo, H. Louvandini, D. M. Vitti, and L. Abdalla. 2005. Influence of inoculum source in a gas production method. *Animal Feed Science and Technology* 123-124: 95-105.
- Calsamiglia, S., L. Castillejos, y M. Busquet. 2005. Estrategias nutricionales para modificar la fermentación ruminal en vacunos. *In: XXI Curso de Especialización FEDNA*. 7 y 8 de noviembre. Madrid, España. pp: 161-185.
- Cárdenas M., J. V., C. A. Sandoval C., y F. J. Solorio S. 2003. Composición química de ensilajes mixtos de gramíneas y especies arbóreas de Yucatán, México. *Técnica Pecuaria en México* 3: 283-294.
- Carro M., D. 2001. La determinación de la síntesis de proteína microbiana en el rumen: comparación entre marcadores microbianos (Revisión). *Investigación Agropecuaria: Sanidad Animal* 16: 5-27.
- Ceballos, A., R. R. Noguera, D. M. Bolívar, y S. L. Posada. 2008. Comparación de las técnicas *in situ* de los sacos de nylon e *in vitro* (DAISY^{II}) para estimar la cinética de degradación de alimentos para rumiantes. *Livestock Research for Rural Development*. <http://www.lrrd.org/lrrd20/7/ceba20108.htm>. Consultada el 7 de marzo de 2009.

- Christie, W. W., A. W. Bell, C. G. Harfoot, J. H. Moore, R. C. Noble, and R. G. Vernon. 1988. Lipid metabolism in farm animals. *Proceedings of the Nutrition Society* 47: 287-293.
- Church, D. C., y W. G. Pond. 1994. *Fundamentos de Nutrición y Alimentación de Animales*. Limusa, S. A. de C. V. Grupo Noriega Editores. México. 438 p.
- Czerkawski, J. W., and B. Grace. 1975. New inhibitors of methane production by rumen microorganisms. Experiments with animals and other practical possibilities. *British Journal of Nutrition* 34: 447-457.
- Damiran, D., T. DelCurto, D. W. Bohnert, and S. L. Findholt. 2008. Comparison of techniques and grinding size to estimate digestibility of forage based ruminal diets. *Animal Feed Science and Technology* 141: 15-35.
- Espinosa M., E., M. E. Carballo, T. Moreira, E. Martí, y A. Ramírez. 2001. Comportamiento de tres mutantes de micobacterias productoras de precursores de esteroides conservadas por liofilización durante 10 años. *Biotecnología Aplicada* 18: 85-87.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2009a. El ganado en apoyo a la población. <http://www.fao.org/docrep/x5320s/x5320s02.htm>. Consultada el 22 de julio de 2009
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2009b. Perspectivas alimentarias. <http://www.fao.org/docrep/009/j8126s/j8126s09.htm> Consultado el 23 de noviembre de 2009.
- Ferrari, O. 2008. Suplementación estratégica en pastoreo. *Tiempos Agroempresarios* 5: 136-140.
- Fina, L. R., C. L. Keith, E. E. Bartley, P. A. Hartman, and N. L. Jacobson. 1962. Modified *in vivo* artificial rumen (VIVAR) techniques. *Journal of Animal Science* 20: 930-942.
- García L., M. D., y F. Uruburu F. 2000. La conservación de cepas microbianas. *Actualidad* 30: 6-12.
- Georing, H. K., and P. J. Van Soest. 1970. Forage Fiber Analysis (apparatus. Reagents, Procedures, and Some Applications). *Agricultural Handbook No 379*. ARS-USDA, Washington, DC. 90 p.
- Getachew, G., G. M. Crovetto, M. Fondevila, U. Krishnamoorthy, B. Singh, M. Spanghero, H. Steingass, P. H. Robinson, and M. M. Kailas. 2002. Laboratory variation of 24 h *in vitro* gas production and estimated

- metabolizable anergy values of ruminant feed. *Animal Feed Science and Technology* 102: 169-180.
- Groot, J. C. J., J. W. Cone, B. A. Williams, F. M. A. Debersaques, and E. A. Lantinga. 1996. Multiphasic analysis of gas production kinetics for *in vitro* fermentation of ruminant feed. *Animal Feed Science and Technology* 64: 77-89.
- Haugen, H. L., M. J. Lamothe, T. J. Klopfenstein, D. C. Adams, and M. D. Ullerich. 2006. Estimation of undegradable intake protein in forage using neutral detergent insoluble nitrogena a single *in situ* incubation time point. *Journal of Animal Science* 84: 651-659.
- Joo, R., y E. Dupré. 2002. Efecto de diferentes crioprotectores sobre la motilidad espermatica de la macha *Mesoderma donacium* (Mollusca, Bivalvia). *Investigaciones Marinas* 30: 75-79.
- Luchini, N. D., G. A. Broderick, and D. K. Combs. 1996a. *In vitro* determination of ruminal protein degradation using freeze-stored ruminal microorganisms. *Journal of Animal Science* 74: 2488-2499.
- Luchini, N. D., G. A. Broderick, and D. K. Combs. 1996b. Preservation of ruminal microorganisms for *in vitro* determination of ruminal protein. *Journal of Animal Science* 74: 1134-1143.
- McBee, R. H. 1952. Manometric method for the evaluation of microbial activity in the rumen with application to utilization of cellulose and hemicelluloses. *Applied and Environmental Microbiology* 1: 106-110.
- McDonald, P. R., J. F. D. Greenhalgh, R. A. Edwards, y C. A. Morgan. 2006. *Nutrición Animal*. 6a. ed. Acribia S. A. Zaragoza, España. 578 p.
- Meneses M., M., S. J. Madrid, R. F. Hernández, y M. D. Megias. 2000. Evaluación de diferentes métodos de conservación del líquido ruminal para pruebas *in vitro*. *Nutrición y Alimentación* 25: 315-317.
- Menke, K. H., and H. Steingass. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development* 28: 7-55.
- Merchen, N. R. 1993. Digestión, Absorción y Excreción en los Rumiantes. Tomo I. Acribia, S. A. Zaragoza, España. pp: 191-223.
- Mertens, D. R., and J. R. Loften. 1980. The effect of starch on forage fiber digestion kinetics *in vitro*. *Journal of Dairy Science* 63: 1437-1446.
- Meyer, R. M., E. E. Bartley, F. Julios, and L. R. Fina. 1971. Comparison of four *in vitro* methods for predicting in vivo digestibility of forages. *Journal of Animal Science* 32: 1030-1036.

- Ortega C., M. E., y M. E. Carranco J. 1993. Factores que afectan la digestibilidad *in situ* de los alimentos en el rumen. Veterinaria México 24: 55-60.
- Pedraza O., R. M. 2001. Estimación del valor nutritivo de los alimentos para rumiantes con énfasis en la técnica *in sacco* y de producción de gas *in vitro*. Revista en Producción Animal 13: 45-51.
- Pell, A. N., and P. Schofield. 1993. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. Journal of Dairy Science 76: 1063-1073.
- Pell, A. N., P. H. Doane, and P. Schofield. 1997. *In vitro* digestibility and gas production. In: Simpósio sobre Tópicos Especiais em Zootecnia. pp: 109-132. <http://www.sbz.org.br/anais1997/Simp/palest7.pdf> Consultada el 17 de marzo de 2009
- Posada O., S. L., y R. R. Noguera. 2005. Técnica *in vitro* de producción de gases: una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. Livestock Research Rural Development 17. <http://www.lrrd.org/lrrd17/4/posa17036.htm>. Consultada el 13 de agosto de 2009.
- Posada O., S. L., y R. Rosero N. 2007. Comparación de modelos matemáticos: una aplicación en la evaluación de alimentos para animales. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias 20: 141-148.
- Quintero, H., M. Rodríguez M., G. Páez F., Z. Mármol, y M. Rincón. 2001. Producción continua de proteína microbiana (*K. fragilis*) a partir de suero de leche. Revista Científica, FCV-LUZ 2: 87-94.
- Rosero N., R., y S. L. Posada O. 2007. Modelación de la cinética de degradación de alimentos para rumiantes. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias 20: 174-182.
- Ruiz V., J., J. Cruz, y R. Carrillo. 2005. Selección de cultivares forrajeros de sorgo (*sorghum bicolor*) y mijo (*Pennisetum americanum*) por índices de eficiencia de producción y calidad. Agronomía Mesoamericana 16: 153-160.
- Salem, Z. M. 2005. Impact of season of harvest on *in vitro* gas production and dry matter degradability of Acacia saligna leaves with inoculums from three ruminant species. Animal Feed Science and Technology 123-124: 67-79.
- Sánchez L, L. C., y L. C. Corrales R. 2005. Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. Bulletin of the World Health Organization 79: 43-47.

- Schofield, P., R. E. Pitt, and A. N. Pell. 1994. Kinetics of fiber digestion from *in vitro* gas production. *Journal of Animal Science* 72: 2980-2991.
- SIAP-SAGARPA (Sistema de Información Agropecuaria y Pesquera-Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural y Pesca). 2009. Población ganadera. <http://www.siap.gob.mx/index.php?idCat=143&idSegCat=1>. Consultada el 2 de marzo de 2009.
- Streeter, L. C. 1969. A review of techniques used to estimate the *in vivo* digestibility of grazed forage. *Journal of Animal Science* 29: 757-768.
- Teferedegne, B. 2000. New perspectives on the use of tropical plants to improve ruminant nutrition. *Proceedings of the Nutrition Society* 59: 209-214.
- Theodorou, M. K., B. A. Williams, M. S. Dhanoa, A. B. McAlla, and J. France. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology* 48: 185-197.
- Tilley, M. A., and R. A. Terry. 1963. A two-stage technique for *in vitro* digestion of forage crop. *Journal of the British Grassland Society* 18: 104-111.
- Trei, J., W. Hale, and B. Theurer. 1970. Effect of grain processing on *in vitro* gas production. *Journal of Animal Science* 30: 825-831.
- Van Keuren, R. W., and W. W. Heinemann. 1962. Study of a nylon bag technique for *in vivo* estimation of forage digestibility. *Journal of Animal Science* 21: 340-345.
- Van Soest, P. J., and R. H. Wine. 1966. Estimation of the true digestibility of forages by the *in vitro* digestion of cell walls. *In: 10th International Grassland Proceeding. Helsinki, Finland.* p: 438-441.
- Vanzant, E. S., R. C. Cochran, and C. Titgemeyer. 1998. Standardization of techniques for ruminant feedstuff evaluation. *Journal of Animal Science* 76: 2717-2729.
- Wilkerson, V. A., T. J. Klopfenstein, and W. W. Stroup. 1995. A collaborative study of *in situ* forage protein degradation. *Journal of Animal Science* 73: 583-588.

3. FERMENTACIÓN Y DIGESTIBILIDAD RUMINAL *IN VITRO* DE FORRAJES USANDO UN INÓCULO LIOFILIZADO

3.1 Resumen

La prueba de digestibilidad *in vitro* requiere de animales donadores de inóculo ruminal. El manejo que se les dé a éstos es la principal fuente de variación en los resultados y considerando el bienestar animal, en un futuro cercano pocos laboratorios podrán tener animales fistulados. En esta investigación se determinaron los parámetros de la cinética de fermentación (V_m , L y S) y digestibilidad *in vitro* a 24 y 72 h (DIV_{24} y DIV_{72}) con inóculo ruminal liofilizado (IL) en comparación con un inóculo fresco (IF). Se realizaron dos estudios independientes: la activación del IL a 12 h de incubación en un medio de cultivo, y la activación del IL a 24 h de incubación en tres medios de cultivo (MCC, MCS, MCSA). El IL tuvo una baja población bacteriana total y celulolítica. La incubación por 12 h no fue suficiente para compensar la baja población en el IL por lo que los parámetros de la cinética de fermentación y digestibilidad *in vitro* fueron menores ($p < 0.01$) que con el inóculo fresco. La incubación por 24 h en diferentes medios de activación mejoró todos los parámetros. La DIV_{24} , DIV_{72} y L en medio MCC fue igual ($p > 0.01$) entre IL e IF, L fue similar sólo cuando se usó como sustrato leguminosas. Las diferencias entre los IF e IL dependieron ($p < 0.01$) de la calidad nutrimental del sustrato utilizado en la fermentación y digestibilidad. Se concluyó que el IL necesita mayor tiempo de incubación y un medio de activación rico en nutrientes para dar resultados similares a los del IF, y que la calidad de los sustratos juega un rol importante en los parámetros de la cinética de fermentación y digestibilidad *in vitro*.

Palabras clave: liofilización, digestibilidad *in vitro*, fermentación *in vitro*, inóculo ruminal, líquido ruminal.

IN VITRO FERMENTATION AND RUMINAL DIGESTIBILITY OF FORAGES USING AN INOCULUM LYOPHILISATE

3.2 Abstract

In vitro digestibility trials require ruminal inoculum from donor animals. Animal handling is one of the main sources of variation on the results. Taking into account animal welfare issues, there might be only a few laboratories that will have fistulated animals in the near future. On this research, parameters of the fermentation kinetics (V_m , L and S) and *in vitro* digestibility at 24 and 72 h (DIV_{24} and DIV_{72}) were determined with lyophilized ruminal inoculum (IL) compared to fresh inoculum (IF). Two independent trials were carried out: the first one was on the activation of the IL at 12 h of incubation in culture medium, and the second was on the activation of the IL at 24 h of incubation in three culture media (MCC, MCS, MCSA). The IL had low total bacterial population as well as low cellulolytic bacteria. Incubation for 12 h was not enough to compensate the low population of the IL, therefore the parameters of the *in vitro* fermentation kinetics and digestibility were lower ($p < 0.01$) compared to the fresh inoculum. The incubation for 24 h in different activation media improved all parameters. The DIV_{24} , DIV_{72} and L in MCC medium were the same ($p > 0.01$) between IL and IF, L was only similar when legumes were used as substrate. Differences observed between IF and IL depended on ($p < 0.01$) nutrient quality of the substrate that was used on the fermentation and digestibility. In conclusion, IL needs more incubation time and as well as an incubation medium rich in nutrients in order to display similar results as those observed on IF. In addition, substrate quality plays an important role on the parameters of fermentation kinetics and *in vitro* digestibility.

Keywords: lyophilization, *in vitro* digestibility, *in vitro* fermentation, ruminal fluid inoculum.

Master of Science Thesis, Universidad Autónoma Chapingo.
Author: María Guadalupe Domínguez Ordóñez.
Advisor: Dr. Luis Alberto Miranda Romero.

3.3 Introducción

La determinación de la digestibilidad de los forrajes es útil en investigación pecuaria, ya que permite predecir el comportamiento productivo de los animales cuando se les ofrece una determinada dieta (McDonald *et al.*, 2006). Las técnicas de fermentación y digestibilidad *in vitro* son procedimientos comúnmente usados para determinar la digestibilidad; sin embargo, la variabilidad producida por la fuente de inóculo y calidad del mismo, son la causa fundamental de la variación de resultados en dichas pruebas (Bochi-Brum *et al.*, 1999). Además el que se requiera de animales fistulados para realizar la prueba, es una limitante para que cualquier laboratorio pueda llevarla a cabo (Streeter, 1969), por lo que el uso de un inóculo conservado puede reducir la variabilidad y hacer accesible esta prueba a todos los laboratorios.

Se ha investigado la factibilidad de utilizar inóculos conservados en las pruebas de fermentación ruminal y digestibilidad *in vitro*, y entre los métodos de conservación estudiados están la congelación y liofilización (Luchini *et al.*, 1996; Meneses *et al.*, 2000).

Los inóculos conservados pueden presentar una menor actividad, por lo que Luchini *et al.* (1996) y Meneses *et al.* (2000) consideran que el método de conservación del inóculo debe acompañarse con una fase de pre-incubación que permita al inóculo conservado superar la más lenta actividad registrada en las primeras horas en comparación al inóculo fresco. La pobre actividad inicial del inóculo conservado puede originar una subestimación del patrón de fermentación y digestibilidad *in vitro* de los forrajes o alimentos evaluados. Por tanto, el objetivo de esta investigación fue determinar los parámetros de la cinética de fermentación y digestibilidad *in vitro* de cuatro especies forrajeras de uso común al usar inóculo ruminal liofilizado activado a dos tiempos de incubación (12 y 24 h) y distintos medios de cultivo.

3.4 Materiales y métodos

El experimento se llevó a cabo en el laboratorio de Microbiología Pecuaria y en las instalaciones de la Granja Experimental del Departamento de Zootecnia de la Universidad Autónoma Chapingo; consistió de tres etapas: determinación de la fermentación y digestibilidad *in vitro* de cuatro forrajes, usando inóculo fresco de tres ovinos donantes; en la segunda etapa se determinó el efecto del proceso de liofilizado y la adición de glicerol en la población bacteriana de un inóculo ruminal compuesto; y en la tercer etapa se determinaron los parámetros de la cinética de fermentación (CF) y digestibilidad *in vitro* (DIV) del inóculo liofilizado y fresco.

3.4.1 Fermentación y digestibilidad *in vitro* de forrajes por inóculo ruminal fresco de tres donantes

Los sustratos usados en todas las pruebas de fermentación y digestibilidad ruminal *in vitro* fueron cuatro forrajes de uso común: una gramínea (ovillo; *Dactylis glomerata* cv. Potomac) y una leguminosa (alfalfa; *Medicago sativa* cv. San Miguel) de clima templado; una gramínea (Tanzania; *Panicum máximum* cv. Tanzania) y una leguminosa (cocuite (*Gliricidia sepium*) de clima tropical. De los tres primeros se colectó todo el material aéreo presente por arriba de los 7 cm con respecto del suelo, para cocuite sólo se usaron las hojas ya que es una especie leñosa.

Los materiales colectados fueron secados a 65 °C por 96 h, una vez secos se les molió a tamiz de 1 mm. Posteriormente se les determinó el contenido de proteína cruda, cenizas, extracto etéreo, fibra cruda y extracto libre de nitrógeno (AOAC, 2000); fibras insolubles en detergentes ácido y neutro (Goering y Van Soest, 1970); y azúcares solubles (Witham *et al.*, 1971).

Tres ovinos machos mayores de un año de edad, con peso promedio de 35 kg y fistulados en rumen, fueron alimentados dos veces al día con una dieta 80%

forraje y 20% concentrado, durante 60 días antes de ser usados como donadores de líquido ruminal. Posteriormente, dos horas después de alimentarlos se extrajo contenido ruminal de cada donante e inmediatamente después se filtró a través de cuatro capas de gasa y se diluyó una parte del líquido ruminal con nueve partes de una solución mineral reducida (SMR) compuesta de (g L⁻¹): Na₂CO₃ (4 g), K₂HPO₄ (0.045 g), KH₂PO₄ (0.045 g), (NH₄)₂SO₄ (0.045 g), NaCl (0.09 g), MgSO₄ (0.0184 g), CaCl₂·H₂O (0.0075 g), Na₂S (0.047 g), Cisteína (0.047 g) y una gota de resarzurina (0.1%). En todo momento se mantuvo un ambiente anaeróbico mediante el flujo continuo de bióxido de carbono.

La determinación de los parámetros de la CF se basó en el procedimiento para la medición de producción de gas descrito por Theodorou *et al.* (1994); en recipientes de 125 mL de capacidad se colocaron 50 mg de sustrato, 90 mL de inóculo ruminal diluido e incubación en baño maría a 39 °C. La presión de gas (kg cm⁻²) se registró a las 0, 1, 2, 4, 6, 10, 14, 18 24, 30, 38, 48 y 72 h de incubación, luego de cada registro se liberó el gas para retornar la presión a cero. Los valores de presión de gas fueron transformados a volumen de gas (mL g⁻¹ MS de sustrato) con la ecuación de regresión obtenida con la presión generada por volúmenes conocidos de gas:

$$\text{Volumen de gas (mL g}^{-1}\text{ de sustrato)} = \text{Presión (kg (cm}^2\text{)}^{-1}) * 39.46 \text{ (R}^2 = 0.94)$$

El volumen acumulado de gas para cada tiempo de incubación se utilizó para estimar los parámetros de la CF: volumen máximo de gas (Vm; mL g⁻¹), fase de *lag* (L; h) y tasa de producción de gas (S; h⁻¹), mediante el modelo logístico (Schofield *et al.*, 1994):

$$\text{Volumen de gas} = \frac{Vm}{1 + \exp^{(2 - 4 \times S \times (t-L))}}$$

Al término de las 72 h de incubación se filtró el contenido de cada recipiente a través de papel filtro Whatman No. 4, el residuo fue secado a 100 °C y pesado, este peso se restó del peso original del sustrato y con ello se determinó la digestibilidad *in vitro* a 72 h de incubación (DIV₇₂).

3.4.2 Liofilización del inóculo ruminal y cuantificación de la población bacteriana

Previo a su alimentación matutina de los donantes, se obtuvo una muestra del contenido ruminal de cada uno y se mezcló en volúmenes iguales para tener una muestra compuesta. Una parte del inóculo fue mezclado con glicerol para tener una concentración final de 5% de éste y la otra parte del inóculo se manejó tal cual, sin nada adicional. En recipientes de 10 mL de capacidad esterilizados en autoclave (121 °C por 15 min) se agregaron 4 mL de inóculo ruminal, se cerraron herméticamente y se mantuvieron en congelación a -70 °C por tres días. Posteriormente, los recipientes se introdujeron en la liofilizadora (Labconco® LypH Lock, modelo 195) con vacío a 0.096 µBar y -47 °C. De esta manera se obtuvo un inóculo ruminal liofilizado con glicerol y otro sin glicerol.

Para la cuantificación bacteriana de los inóculos liofilizados primero se reconstituyeron adicionando 6 mL de una solución reductora compuesta de 2.5 g de L-cisteína, 2.5 g de Na₂S y 0.1 mL de resarzurina (1%) disueltos en 15 mL de NaOH (2N) y aforado a 100 mL con agua destilada. Los inóculos se mantuvieron así por 5 min para su hidratación y luego se les determinó la población viable de bacterias totales y celulolíticas.

Para la cuantificación de la población viable de bacterias 1 mL de inóculo reconstituido se diluyó en 9 mL de solución mineral reducida, se mezcló perfectamente y se transfirió 1 mL a otro tubo con 9 mL de SMR, este procedimiento se continuó hasta alcanzar una dilución 1×10^{-10} . Después, 1 mL de cada dilución se sembró en el medio de cultivo para bacterias ruminales

(Cobos y Yokoyama, 1995). Los tubos se rodaron sobre agua fría para su solidificación y fueron incubados a 39 °C por 96 h (Hungate, 1969). A partir de estos tubos se realizó la cuenta de unidades formadoras de colonias (UFC).

La cuantificación de bacterias celulolíticas se realizó mediante la técnica del número más probable (NMP), a partir de las diluciones realizadas a los inóculos, se sembró 1 mL de cada dilución en una serie de tres tubos conteniendo 9 mL de medio líquido para bacterias celulolíticas (Cobos y Yokoyama, 1995) y un fragmento de papel filtro (1.5 × 3 cm). Los medios inoculados se mantuvieron en baño maría a 39 °C durante 96 h y se determinó como positivo aquellos tubos donde se manifestó degradación del papel.

3.4.3 Cinética de fermentación y digestibilidad *in vitro* de forrajes por inóculos liofilizado y fresco

La comparación de la CF y DIV causada por los inóculos liofilizado y fresco se realizó por tres ensayos independientes: en el primero se usó un medio de cultivo y 12 h de incubación para la activación del inóculo previamente reconstituido, en el segundo se usaron tres medios de cultivo y 24 h para la activación y en el tercero se usó un medio y 24 h de activación.

El inóculo con glicerol (5%) liofilizado se activó sembrando 3 mL del inóculo reconstituido en 100 mL de medio de activación MCC (Cuadro 2; Cobos y Yokoyama, 1995) e incubado a 39 °C por 12 h. A la par se obtuvo un inóculo ruminal fresco y ambos inóculos se diluyeron 1: 10 con SMR para usarlos en la determinación de los parámetros de CF y DIV siguiendo el procedimiento ya descrito, con la diferencia de que en esta prueba se incluyeron frascos para detener la fermentación a 24 h de incubación y medir la DIV a 24 h (DIV₂₄). También se usaron los registros de producción de gas acumulado a 24 h de incubación para estimar energía metabolizable (EM) y digestibilidad de la materia orgánica (DMO) mediante las siguientes ecuaciones:

$EM (MJ\ kg^{-1}) = 2.2 + 0.136\ PG + 0.057\ PC + 0.0029\ EE^2$ (Menke y Steingass, 1998) y

$DMO (\%) = 14.88 + 0.889\ PG + 0.45\ PC + 0.0651\ C$ (Blümmel *et al.*, 2005)

donde PG es el volumen de gas a las 24 h de incubación, PC, EE y C son proteína cruda, extracto etéreo y cenizas, respectivamente.

En el segundo ensayo el procedimiento de activación consistió en el uso de tres medios de cultivo MCC, MCS y MCSA (Cuadro 2) y 24 h de incubación. El inóculo fresco siempre se conformó por líquido ruminal compuesto a iguales volúmenes de lo extraído de cada ovino donador, previo a su alimentación matutina.

El tercer ensayo consistió en determinar los parámetros V_m , DIV_{24} y DIV_{72} con inóculo liofilizado y activado con el medio MCC y compararlos con los obtenidos con un inóculo fresco.

Cuadro 2. Medios utilizados para la activación de microorganismos liofilizados.

Componentes	Contenido por 100 mL de medio		
	MCC	MCS	MCSA
Agua destilada, mL	50	50	50
Fluido ruminal clarificado ^z , mL	29	29	29
Solución carbonato de sodio 8%, mL	5	5	5
Solución mineral I ^y , mL	7	7	7
Solución mineral II ^x , mL	7	7	7
Solución sulfuro-cisteína ^w , mL	2	2	2
Solución de rezarsurina 1%, mL	0.10	0.10	0.10
Extracto de levadura, g	0.50	0.50	-
Peptona de caseína, g	0.50	0.50	-
Sustrato ^v , g	-	0.25	0.25
Sustrato ^u , g	0.25	-	-
Glucosa, g	0.30	-	-
Celobiosa, g	0.30	-	-
Almidón, g	0.25	-	-

^zFluido ruminal previamente filtrado a través de gasa, centrifugado 11, 000 rpm y esterilizado a 15 psi por 15 minutos (se repitió dos veces).^yContienen 6.0 g de K₂HPO₄ por litro de agua destilada.^xContiene 6.0 g de K₂HPO₄; 6.0 g (NH₄)₂SO₄; 12 g NaCl; 2.45 g MgSO₄; y 1.6 g CaCl₂H₂O por litro de agua destilada.^wSe disuelve 2.5 g de L-cisteína en 15 ml de NaOH (2N); 2.5 g de Na₂S y 0.1 ml de resazurina (1%) y se afora a 100 ml, se calienta hasta decoloración de la resazurina y se esteriliza en autoclave.

^vforraje que se va a evaluar; ^uSustrato con alto contenido de FDN

3.4.4 Análisis estadístico

El diseño experimental en todos los ensayos fue completamente al azar. Para la determinación de la fermentación y digestibilidad *in vitro* de cuatro forrajes, usando inóculo fresco de tres donadores, el modelo estadístico incorporó arreglo factorial 3 × 4: tres donantes de inóculo ruminal y cuatro sustratos (alfalfa, ovinillo, cocuite y tanzania), con tres repeticiones de laboratorio.

Para la determinación del efecto del proceso de liofilizado y la adición de glicerol en la población bacteriana de un inóculo ruminal, el modelo incluyó como fuente de variación la adición o no de glicerol con tres repeticiones.

En la evaluación de los parámetros de la cinética de fermentación y digestibilidad *in vitro* de los inóculos liofilizado y fresco, en el primer ensayo el análisis estadístico fue con un modelo en arreglo factorial 2×4 : inóculo fresco o liofilizado y cuatro sustratos (alfalfa, ovinillo, cocuite y tanzania), con tres repeticiones de laboratorio. En el segundo ensayo, el modelo aplicado fue en arreglo factorial 4×4 : cuatro medios y cuatro sustratos (alfalfa, ovinillo, cocuite y tanzania) con tres repeticiones de laboratorio. Las medias de las variables en que la interacción de primer orden fue significativa ($p < 0.01$) se compararon por la prueba de “t” de *student* y las medias de los efectos principales por Tukey (Steel y Torrie, 1980; SAS, 2004).

Para el ensayo de cuantificación de la población bacteriana viable se consideró que había efecto cuando la p fuera menor a 0.05 y para el resto de los ensayos de 0.01.

Se realizó un análisis de regresión lineal de los parámetros V_m DIV_{24} y DIV_{72} obtenidos con el inóculo fresco sobre las mismas variables obtenidas con el inóculo liofilizado y activado por 24 h en el medio MCC.

3.5 Resultados y discusión

3.5.1 Fermentación y digestibilidad *in vitro* de forrajes por inóculo ruminal fresco de tres donantes

La caracterización de alfalfa, ovinillo, cocuite y tanzania se muestra en el Cuadro 3. El contenido de PC y FC determinados en esta investigación son superiores en los sustratos templados que en los tropicales. El contenido de cenizas, FDA y FDN son mayores en gramíneas y de manera inversa, las leguminosas contienen mayor proporción de ELN y azúcares solubles.

El contenido de PC de las leguminosas se encuentra dentro de los rangos reportados en literatura: alfalfa de 16 a 24% (Urbano y Dávila, 2003) y cocuite de 18 a 30% (Vásquez y Quintero, 1995); sin embargo, para las gramíneas los datos obtenidos en este estudio se encuentran fuera de los rangos encontrados en literatura: ovillo de 14 a 18% (Canale *et al.*, 1990; NRC, 2007) y tanzania de 76% (Juárez *et al.*, 2009).

Para el contenido de FDN sólo la alfalfa se encuentra dentro del rango reportado en literatura (de 47 a 56%; Urbano y Dávila, 2003) y el resto de los sustratos tienen contenidos diferentes a los estimados por otros autores: ovillo de 63 a 78% (Robles *et al.*, 1980), cocuite 59% (Jiménez-Ferrer *et al.*, 2008) y tanzania 74% (Juárez *et al.*, 2009).

Cuadro 3. Caracterización (%)² de la calidad de los sustratos usados para los ensayos de cinética de fermentación y digestibilidad *in vitro*.

Sustrato	PC	Cen	EE	FC	ELN	FDA	FDN	Azúcares
Alfalfa	20.6	11.9	1.1	29.8	36.5	35.0	44.2	4.1
Ovillo	19.7	16.3	2.6	29.6	31.7	40.0	54.0	3.5
Cocuite	18.3	8.5	2.4	29.6	41.2	36.7	46.5	4.7
Tanzania	6.5	12.3	0.5	53.4	27.4	56.4	77.9	2.9

²PC = proteína cruda; Cen = contenido de cenizas; EE = extracto etéreo; FC = fibra cruda; ELN = extracto libre de nitrógeno; FDA = fibra detergente ácido y FDN = fibra detergente neutro.

Los parámetros de la cinética de fermentación y la digestibilidad *in vitro* de los sustratos por efecto de tres fuentes de inóculo se muestran en el Cuadro 4. El donador de inóculo ruminal afectó ($p<0.01$) la fase *lag* y tasa de producción de gas; sin embargo, este efecto siempre se dio con presencia de efecto ($p<0.01$) de la interacción donador de inóculo $\times$ sustrato. El Vm y DIV sólo mostraron efecto ($p<0.01$) del sustrato.

La interacción en las variables L, S y DIV₇₂ prácticamente es causada por el inóculo proveniente de la fuente 3 en dos de los sustratos (ovillo y cocuite), con

dicho inóculo la fase *lag* (L) y la tasa de producción de gas (S) fueron mayores en comparación a las producidas con los inóculos de los ovinos 1 y 2.

Los forrajes templados produjeron mayor Vm que los tropicales y las leguminosas que las gramíneas, la degradabilidad fermentativa de los forrajes a nivel del rumen, se encuentra estrechamente influenciada por las características estructurales de la planta, y entre éstas, con la proporción y tipos de componentes que conforman la pared celular, existiendo diferencias muy contrastantes entre las gramíneas de clima templado y las de clima tropical, resultado de sus distintos tipos de metabolismo fotosintético (Marichal *et al.*, 2007).

La interacción entre los factores para DIV_{72} y el hecho de que no haya interacción para Vm, se atribuyó al método, ya que la producción de gas es un procedimiento más sensible y menos afectado por la manipulación de la muestra (Theodorou *et al.*, 1994) contrario a la prueba de DIV (Posada y Noguera, 2005), en este sentido se debe considerar que en cuanto a extensión de la fermentación, los tres donantes de inóculo mostraron la misma actividad.

La causa de la diferencia en la duración de la fase *lag* y tasa de producción de gas pueden ser por el comportamiento etológico de los ovinos utilizados, ya que dos de ellos eran dominantes sobre el otro y comían inmediatamente después de que se les servía el alimento. La colección del líquido se realizaba dos horas después de ofrecer el alimento debido a que el fluido colectado antes de dos horas post-alimentación causa mayor variación en las pruebas de fermentación y digestibilidad *in vitro*; sin embargo, es recomendado colectar el líquido ruminal previo a la alimentación (Williams, 2000).

El contenido de azúcares está asociado con el volumen máximo y tasa de producción de gas, observándose que los sustratos con mayor contenido de esta fracción producen mayor cantidad de gas y presentan una menor duración

de la fase *lag*, dicha fase es mayor en las gramíneas comparado con las leguminosas

Cuadro 4. Componentes de la cinética de fermentación^z (Vm, L y S) y digestibilidad *in vitro*^y (DIV) a 72 h de incubación en inóculos ruminales de diferentes donadores en cuatro sustratos.

Donador de inóculo	Sustrato	Vm, mLg ⁻¹	L, h	S, h ⁻¹	DIV ₇₂ , %
1	Alfalfa	438.52	3.76 ^a	0.042 ^d	65.16 ^c
	Ovillo	420.86	5.38 ^b	0.032 ^b	64.80 ^c
	Cocuited	404.84	3.51 ^a	0.044 ^d	57.86 ^b
	Tanzania	372.16	6.54 ^c	0.026 ^a	55.46 ^a
	Promedio	409.10 ^a			
2	Alfalfa	423.52	3.43 ^a	0.041 ^c	62.90 ^c
	Ovillo	402.82	5.25 ^b	0.032 ^b	65.00 ^c
	Cocuited	380.23	3.55 ^a	0.045 ^e	53.50 ^a
	Tanzania	374.43	6.34 ^c	0.028 ^a	56.70 ^{ab}
	Promedio	395.15 ^a			
3	Alfalfa	428.94	3.48 ^a	0.049 ^f	66.06 ^c
	Ovillo	400.03	5.43 ^b	0.036 ^c	65.23 ^c
	Cocuited	395.15	5.28 ^b	0.053 ^g	54.36 ^a
	Tanzania	378.52	6.41 ^c	0.031 ^b	53.03 ^a
	Promedio	400.91 ^a			
Efecto del factor		----- p -----			
Donador de inóculo		0.0963	0.0001	0.0001	0.0126
Sustrato		0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Donador de inóculo × Sustrato		0.6633	0.0001	0.0001	0.0001

^z Vm = volumen máximo de gas; L = fase *lag*; S = tasa de producción de gas.

^y Digestibilidad *in vitro*

3.5.2 Liofilización del inóculo ruminal y cuantificación de la población bacteriana

La adición de glicerol permitió la sobrevivencia de una población bacteriana hasta 6.5 veces mayor ($p < 0.05$) con relación al inóculo sin glicerol; sin embargo, este impacto en el total de bacterias no pudo evidenciarse en la población de

bacterias celulolíticas en donde la adición de glicerol mostró una tendencia ($p=0.1023$) a mejorar en tres veces dicha población (Cuadro 5).

La mayor población bacteriana con la adición de glicerol podría explicarse por la vitrificación periférica que evita el daño a membranas citoplasmáticas por cristales de hielo (Sánchez y Corrales, 2005); sin embargo, no se encontró alguna explicación del por qué este efecto positivo no se detectó en la población de bacterias celulolíticas.

Aunque la adición de glicerol tendió a favorecer una mayor población bacteriana, los valores registrados en este estudio están muy por debajo de la población bacteriana en el líquido ruminal fresco. Obrador *et al.* (2007) y Galindo *et al.* (2008) encontraron que las poblaciones de bacterias totales y celulolíticas en líquido ruminal fresco de animales alimentados con forraje superan por más de dos mil veces las registradas en el presente estudio. Estas grandes diferencias señalan la necesidad de mejorar los procedimientos de conservación o compensar la caída de la población al momento de la activación.

Cuadro 5. Población de bacterias totales y celulolíticas en muestras ruminales liofilizados con y sin glicerol.

Tratamiento	Bacterias totales UFC ^z mL ⁻¹	Bacterias celulolíticas bacterias mL ⁻¹
Con glicerol	12.70 x 10 ⁶	4.38 x 10 ²
Sin glicerol	1.93 x 10 ⁶	1.20 x 10 ²
<i>p</i>	0.0397	0.1023

^zUnidades formadoras de colonias.

3.5.3 Cinética de fermentación y digestibilidad *in vitro* de forrajes por inóculos liofilizado y fresco

La cinética de fermentación (V_m , L y S), la DIV_{24} y DIV_{72} de los sustratos con el inóculo liofilizado y activado a 12 h de incubación se presentan en el Cuadro 6. El volumen máximo de gas, tasa de producción de gas, digestibilidad *in vitro* a 24 y 72 h de incubación, energía metabolizable y digestibilidad de la materia orgánica fueron influidos ($p < 0.01$) por el tipo de inóculo (fresco o liofilizado) y con excepción de V_m y DIV_{24} , el efecto de tipo de inóculo se dio a la par con el efecto ($p < 0.01$) de la interacción con sustrato. El inóculo fresco mostró 1.5 y 1.4 veces mayor V_m y DIV_{24} que el inóculo liofilizado, respectivamente.

La interacción con sustrato se puede explicar con base en que L y DIV_{72} tendieron a ser menores con inóculo liofilizado excepto con ovillo en donde el inóculo liofilizado presentó el máximo valor de L con 12.24 h, aproximadamente 2.2 veces mayor al promedio de los valores de L de los cuatro sustratos con inóculo fresco que no mostraron diferencia ($p < 0.01$) entre ellos; también esta interacción es indicativa de que al usar el inóculo fresco el valor de L fue similar para todos los sustratos pero no con el liofilizado en donde sí se registró diferencia en este parámetro entre los sustratos. La DIV_{72} en ovillo fue similar entre el inóculo fresco y liofilizado, mientras que los sustratos mostraron diferente DIV_{72} según el tipo de inóculo.

La interacción mostrada para S , EM y DMO significa que el uso de inóculo liofilizado no permitió detectar diferencias entre los sustratos, pero sí con el fresco. Esto implica que el inóculo fresco fue útil para jerarquizar la calidad de los sustratos pero no el liofilizado.

Cuadro 6. Cinética de fermentación^z y digestibilidad *in vitro*^y de cuatro sustratos con inóculo fresco o liofilizado y activado por 12 h.

Inóculo ruminal	Sustrato	Vm, mLg ⁻¹	L, h	S, h ⁻¹	DIV ₂₄ , %	DIV ₇₂ , %	EM ^w , Mcalkg ⁻¹	DMO ^v , %
Fresco	Alfalfa	457.33	4.19 ^b	0.047 ^f	62.53	67.33 ^d	3.23 ^f	91.17 ^e
	Ovillo	409.96	6.14 ^b	0.042 ^e	59.46	67.86 ^d	2.59 ^d	73.92 ^c
	Cocuited	400.80	4.36 ^b	0.041 ^e	46.39	57.33 ^b	2.90 ^e	81.74 ^d
	Tanzania	375.10	7.00 ^b	0.034 ^d	39.86	55.19 ^b	2.11 ^c	59.57 ^b
	Promedio	410.80 ^b			52.06 ^b			
Liofilizado ^u	Alfalfa	279.26	0.07 ^a	0.017 ^b	46.13	61.99 ^c	1.63 ^b	43.35 ^a
	Ovillo	295.06	12.24 ^c	0.024 ^c	40.79	65.73 ^d	1.30 ^a	38.75 ^a
	Cocuited	267.53	3.23 ^{ab}	0.013 ^a	35.06	47.86 ^a	1.31 ^a	38.24 ^a
	Tanzania	218.03	1.63 ^{ab}	0.015 ^{ab}	27.86	45.99 ^a	1.07 ^a	31.13 ^a
	Promedio	264.97 ^a			37.43 ^a			
Efecto del factor		----- p -----						
Inóculo ruminal		0.0001	0.0359	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Sustrato		0.0003	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Inóculo ruminal × Sustrato		0.1234	0.0001	0.0001	0.0295	0.0006	0.0045	0.0016

^zVm = volumen máximo de gas; L = fase *lag*; S = tasa de producción de gas.

^yDIV₂₄ = digestibilidad *in vitro* de la materia seca en 24 h; DIV₇₂ = digestibilidad *in vitro* de la materia seca en 72 h.

^xEl inóculo liofilizado fue activado por 12 h de incubación previo a su utilización.

^wEM = energía metabolizable calculada mediante la siguiente fórmula: EM (MJ kg⁻¹ MS) = 2.20 + 0.136PG + 0.057PC + 0.0029CF².

^yDMO = digestibilidad de la materia orgánica estimada mediante la siguiente fórmula: DMO (%) = 14.88 + 0.889PG + 0.45PC + 0.0651CA.

^uEl medio de activación consistió en azúcares (glucosa, celobiosa y almidón), promotores de crecimiento (extracto de levadura y peptona de caseína), solución mineral (agua, solución mineral I y II, solución de carbonato de sodio al 8%, solución sulfuro-cisteína y líquido Ruminal clarificado) y forraje con alto contenido de fibra (forraje hervido durante 1 hora).

La DIV_{72} de alfalfa obtenida con inóculo fresco es similar a la reportada por Arce *et al.* (2003) (68.84%), pero superior a la de tanzania (49.16%). La digestibilidad de cocuite a 24 h es similar a la obtenida por Suárez *et al.* (2008) a 48 h (46.92%) de incubación.

La EM y DMO calculados en la presente investigación están sobrestimados con el inóculo fresco y subestimados con el inóculo liofilizado con respecto a lo reportado en literatura por Avendaño *et al.* (2004) en alfalfa (EM = 2.28 Mcal kg^{-1} MS y DMO = 61.9%), Verdecia *et al.* (2008) en tanzania (DMO = 58.5%) y Tesorero y Combellas (2003) en cocuite (EM = 2.2 Mcal kg^{-1} MS); esto indica que los modelos de Menke y Steingass (1998) y Blümmel *et al.* (2005), para estimar EM y DMO no siempre se ajustan adecuadamente. Datos obtenidos por Getachew *et al.* (2002) indican que la predicción de los valores de EM a partir de la producción de gas a 24 h con el método de Menke y Steingass (1988) no debe ser considerado absoluto, debido a que sólo tres de siete valores de EM obtenidos con el modelo mencionado, son similares a los obtenidos en laboratorios.

En ciertos parámetros de la CF y DIV el inóculo liofilizado subestima los valores en comparación al fresco, y en otras el liofilizado no es capaz de diferenciar la calidad del forraje. La subestimación, como el pobre desempeño para diferenciar entre sustratos de calidad distinta es indicativo de que el diseño del procedimiento de activación del inóculo liofilizado no fue el adecuado para compensar la pobreza en la población bacteriana detectada en el ensayo anterior y hacerlo funcionalmente equivalente al inóculo fresco.

La cinética de fermentación (V_m , L y S), la DIV_{24} y DIV_{72} de los sustratos con el inóculo liofilizado y activado en tres medios de cultivo y 24 h de incubación se presentan en el Cuadro 7. Con la incubación de 24 h como procedimiento de activación, el medio y sustrato influyeron ($p < 0.01$) en todos los parámetros de la

Cuadro 7. Parámetros de fermentación^z y digestibilidad (24 y 72 h) *in vitro*^y de cuatro sustratos utilizando un inóculo ruminal fresco o liofilizado y activado en diferentes medios por 24 h de incubación.

Inóculo ruminal	Sustrato	Vm, mLg ⁻¹	L, h	S, h ⁻¹	DIV ₂₄ , %	DIV ₇₂ , %	EM ^x , Mcalkg ⁻¹	DMO ^w , %
Fresco								
LR ^v	Alfalfa	435.75	2.80 ^a	0.043 ^e	55.80 ^f	62.20 ^e	2.98	84.44
	Ovillo	390.25	4.89 ^a	0.041 ^{de}	53.80 ^f	61.80 ^e	2.45	69.99
	Cocuile	346.25	2.46 ^a	0.044 ^e	46.60 ^{ef}	50.80 ^{bc}	2.82	79.64
	Tanzania	376.35	6.09 ^{ab}	0.036 ^{cd}	39.80 ^d	55.00 ^{cd}	2.09	59.01
	Promedio	387.15 ^c					2.59 ^d	73.27 ^d
Liofilizado								
MCC ^u	Alfalfa	367.15	5.64 ^{ab}	0.033 ^{cd}	52.40 ^f	63.00 ^e	2.08	59.74
	Ovillo	333.00	11.68 ^{bc}	0.039 ^{de}	50.20 ^{ef}	65.60 ^e	1.79	52.02
	Cocuile	323.25	5.04 ^{ab}	0.030 ^{bc}	40.40 ^d	51.20 ^c	1.93	55.22
	Tanzania	307.75	9.85 ^{bc}	0.025 ^b	32.40 ^c	55.40 ^d	1.36	39.22
	Promedio	332.83 ^b					1.79 ^c	51.55 ^c
MCS ^t	Alfalfa	319.45	5.14 ^{ab}	0.025 ^b	48.20 ^{ef}	67.40 ^e	1.78	51.60
	Ovillo	307.75	10.32 ^{bc}	0.018 ^a	40.20 ^d	63.60 ^e	1.40	41.51
	Cocuile	288.80	4.91 ^a	0.025 ^b	38.20 ^d	51.60 ^c	1.66	47.79
	Tanzania	236.90	10.12 ^{bc}	0.021 ^{ab}	25.20 ^b	48.40 ^b	1.11	32.35
	Promedio	263.23 ^a					1.49 ^b	43.31 ^b
MCSA ^s	Alfalfa	309.30	7.31 ^{bc}	0.019 ^a	43.20 ^{de}	59.00 ^d	1.45	42.62
	Ovillo	303.20	20.21 ^d	0.017 ^a	31.40 ^c	62.40 ^e	1.01	30.85
	Cocuile	207.85	2.89 ^a	0.020 ^a	32.40 ^c	45.40 ^a	1.43	41.61
	Tanzania	244.10	24.38 ^d	0.016 ^a	18.00 ^a	42.40 ^a	0.84	24.77
	Promedio	266.11 ^a					1.18 ^a	33.79 ^a
Efecto								
		p						
Medio de activación		0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Sustrato		0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Medio de activación × Sustrato		0.0766	0.001	0.0002	0.0012	0.0001	0.6581	0.6581

^zVm = volumen máximo de gas; L = fase lag; S = tasa de producción de gas.

^yDIV₂₄ = digestibilidad *in vitro* de la materia seca en 24 h; DIV₇₂ = digestibilidad *in vitro* de la materia seca en 72 h.

^wEM = energía metabolizable calculada mediante la siguiente fórmula: EM (MJ kg⁻¹ MS) = 2.20 + 0.136PG + 0.057PC + 0.0029CF².

^wDMO = digestibilidad de la materia orgánica estimada mediante la siguiente fórmula: DMO (%) = 14.88 + 0.889PG + 0.45PC + 0.0651CA.

^vLR = líquido ruminal fresco y completo.

^uMCC = medio de activación con azúcares (glucosa, celobiosa y almidón), promotores de crecimiento (extracto de levadura y peptona de caseína), solución mineral (agua, solución mineral I y II, solución de carbonato de sodio al 8%, solución sulfuro-cisteína y líquido ruminal clarificado) y forraje con alto contenido de fibra (forraje hervido durante 1 hora).

^tMCS = medio de activación con solución mineral (agua, solución mineral I y II, solución de carbonato de sodio al 8%, solución sulfuro-cisteína y líquido Ruminal clarificado) y forraje.

^sMCSA; me dio de activación con solución mineral (agua, solución mineral I y II, solución de carbonato de sodio al 8%, solución sulfuro-cisteína y líquido Ruminal clarificado), promotores de crecimiento (extracto de levadura y peptona de caseína) y forraje.

cinética de fermentación (V_m , L y S), DIV_{24} , DIV_{72} , EM y DMO pero sólo en V_m , EM y DMO no existió efecto ($p>0.01$) de la interacción de estos dos factores.

El inóculo ruminal fresco mostró 1.16, 1.45 y 1.42 veces mayor V_m , EM y DMO, que el inóculo liofilizado y activado en el medio MCC, que a su vez mostró los mayores valores en estos parámetros entre los inóculos liofilizados y activados. El medio MCSA fue el que proveyó los mínimos valores en estos parámetros.

La interacción (medio de activación $\times$ sustrato) indica que L tendió a mostrar los valores menores en el inóculo ruminal fresco pero fue igual ($p>0.01$) con el inóculo activado en los medios MCC y MCS si el sustrato era leguminosa, y con el inóculo activado en el medio MCSA si el sustrato era cocuite. En S esta interacción se asocia con la situación de que el inóculo ruminal fresco tendió a mostrar los valores máximos en los cuatro sustratos, pero el inóculo activado en medio MCC llegó a igualar los valores del inóculo ruminal fresco si los sustratos eran alfalfa u ovillo.

En DIV_{24} y DIV_{72} la interacción (medio de activación $\times$ sustrato) se explica por el patrón de respuesta del inóculo ruminal fresco que tendió a mostrar los valores máximos en todos los sustratos, pero fue igualado principalmente por el inóculo liofilizado y activado en el medio MCC especialmente en DIV_{24} ya que en DIV_{72} el inóculo fresco llegó a ser igualado también por el inóculo activado en MCS.

La actividad del inóculo conservado está influida por la calidad del sustrato, a mayor calidad (leguminosas) mayor posibilidad de que los inóculos liofilizado o fresco sean iguales.

La estimación de la EM y DMO en la presente investigación sobrestima los datos con el inóculo ruminal fresco y subestima los obtenidos con los inóculos ruminales liofilizados y activados en diferentes medios con respecto a los estimados por Tesorero y Combellas, 2003; Avendaño *et al.*, 2004; Verdecia *et al.*, 2008.

Meneses *et al.* (2000), con inóculos liofilizados o congelados, activados por 24 h en una solución de McDougall, encontraron digestibilidades menores en 17.63% para alfalfa en comparación al inóculo fresco. En la presente investigación la DIV_{24} fue similar al inóculo fresco con el inóculo liofilizado y activado en el medio MCC; las diferencias en la presente investigación comparada con la de Meneses *et al.* (2000), se atribuyó al medio usado, ya que se utilizó un medio de mayor potencial redox para esta investigación.

Los valores de DIV_{24} y DIV_{72} determinados con inóculo liofilizado y activado en medio MCC mostraron una relación lineal ($p < 0.01$) con los valores registrados con el uso de inóculo fresco; sin embargo; el grado de asociación fue relativamente bajo, especialmente en DIV_{24} donde R^2 fue de 0.717. Para Vm también se encontró una relación lineal ($p < 0.01$) pero un grado de asociación más bajo con R^2 de 0.517 (Cuadro 8).

Este patrón de respuesta indica que el inóculo liofilizado con activación en el medio MCC puede ofrecer un patrón de respuesta en DIV_{24} y DIV_{72} similar al del inóculo fresco, pero con diferencias en los valores específicos obtenidos y de ahí el relativo pobre grado de asociación. Para el caso de Vm la diferencia entre los valores específicos puede ser aún mayor.

Meneses *et al.* (2000) obtuvieron ecuaciones de predicción de la digestibilidad a 72 h con inóculo liofilizado con R^2 superiores ($R^2 = 0.9048$) a las encontradas en esta investigación.

Cuadro 8. Coeficientes de regresión de un inóculo fresco sobre un inóculo liofilizado y activado por 24 h para las variables Vm, DIV₂₄ y DIV₇₂ de cuatro forrajes.

Parámetro ^z estimado	β_0	β_1	p	R ²
Vm, mLg ⁻¹	118.63	1.03	0.0001	0.517
DIV ₂₄ , %	7.31	0.94	0.0001	0.717
DIV ₇₂ , %	7.67	0.92	0.0001	0.833

^zVm = volumen máximo de gas; DIV₇₂ = digestibilidad *in vitro* de la materia seca a 72 h; DIV₂₄ = digestibilidad *in vitro* de la materia seca a 24 h

3.6 Conclusiones

Los parámetros de la cinética de fermentación y la digestibilidad *in vitro* dependen del tipo de inóculo ruminal, con la tendencia del conservado por liofilización de subestimar valores con respecto al fresco. El tiempo y medio de activación del inóculo liofilizado son factores importantes en el comportamiento del inóculo, con la tendencia a mejorar este comportamiento con mayor tiempo de activación (24 h) y medio con mayor contenido de nutrientes (MCC). La diferencia entre inóculos conservado y fresco también depende de la calidad del sustrato.

3.7 Literatura citada

- AOAC. 2000. Official Methods of Analysis of the AOAC. 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA. 650 p.
- Arce P., C., T. Arbaiza F., F. Carcelén C., y O. Lucas A. 2003. Estudios comparativos de la digestibilidad mediante dos métodos de laboratorio. Revista de Investigación Veterinaria del Perú 14: 1609-9117.
- Avendaño R., J., F. Fernández F., C. Ovalle M., y F. Blu L. 2004. Ovinos alimentados con raciones que incluyen tagasaste (*Chamaecytisus proliferus* subsp. *Palmensis*) en reemplazo de heno de alfalfa. II. Digestibilidad y consumo de nutrientes. Agricultura Técnica 64: http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0365-28072004000300007&script=sci_arttext. Consultado el 26 de noviembre de 2009.
- Blümmel, M., J. W. Cone, A. H. Van Gelde, I. Nashalai, N. N. Umunnac, H. P. Makkara, and K. Becker. 2005. Prediction of forage intake using in vitro gas production methods: comparison of multiphase fermentation kinetics

- measured in an automated gas test, and combined gas volume and substrate degradability measurements in a manual syringe system. *Animal Feed Science and Technology* 123-124: 517-526.
- Bochi-Brum, O., M. D. Carro, C. Valdés, J. S. González, and S. López. 1999. *In vitro* digestibility of forages and concentrates: effect of diet on donor animals. *Archivos de Zootecnia* 48: 51-61.
- Canale, C. J., S. M. Abrams, G. A. Varga, and L. D. Muller. 1990. Alkali-treated orchard grass and alfalfa: composition and *in situ* digestion of dry matter and cell wall components. *Journal of Dairy science* 73: 2404-2412.
- Cobos, M. A., and M. T. Yokoyama. 1995. *Clostridium paraputrificum* var *ruminantium*: colonization and degradation of shrimp carapaces *in vitro* observed by scanning electron microscopy. *In: Rumen Ecology Research Planning, Proceedings of Workshop*. Wallace, R. J., and A. Lahlou-Kassi (eds.). Addis Abeba, Ethiopia. pp: 151-161.
- Galindo, J., N. González, D. Delgado, A. Sosa, Y. Marrero, R. González, A. I. Aldana, y O. Moreira. 2008. Efecto modulador de *Leucaena leucocephala* sobre la microbiota ruminal. *Zootecnia Tropical* 26: 249-252.
- Georing, H. K., and P. J. Van Soest. 1970. Forage Fiber Analysis (apparatus. Reagents, Procedures, and Some Applications). *Agricultural Handbook No 379*. ARS-USDA, Washington, DC. 90 p.
- Getachew, G., G. M. Crovetto, M. Fondevila, U. Krishnamoorthy, B. Singh, M. Spanghero, H. Steingass, P. H. Robinson, and M. M. Kailas. 2002. Laboratory variation of 24 h *in vitro* gas production and estimated metabolizable energy values of ruminant feed. *Animal Feed Science Technology* 102: 169-180.
- Hungate, R. E. 1969. A roll tube method cultivation of strict anaerobes. *In: Methods. in Microbiology*, Academic Press. pp: 117-137.
- Jiménez-Ferrer, G., M. López-Carmona, J. Nahed-Toral, S. Ochoa-Gaona, y Ben-de-Jong. 2008. Árboles y arbustos forrajeros de la región nortetotzil de Chiapas, México. *Veterinaria México* 39 http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-50922008000200009&lng=pt&nrm=iso&tlng=es. Consultada el 23 de diciembre de 2009.
- Juárez R., A. S., S. M. A. Cerrillo, O. E. Gutiérrez, T. E. M. Romero, N. J. Colín y B. H. Barragán. 2009. Estimación del valor nutricional de pastos tropicales a partir de análisis convencionales y de la producción de gas *in vitro*. *Técnica Pecuaria en México* 47: 55-67.

- Luchini, N. D., G. A. Broderick, and D. K. Combs. 1996. Preservation of ruminal microorganisms for *in vitro* determination of ruminal protein. *Journal of Animal Science* 74: 1134-1143.
- Marichal, M. de J., M. Carriquiry, y A. I. Trujillo. 2007. Estudio comparativo de la degradabilidad fermentativa del N y de la digestibilidad intestinal del N no degradable de gramíneas forrajeras templadas y tropicales. *In: Reunión APPA-ALPA*. Cusco, Perú. http://www.produccionbovina.com/informacion_tecnica/manejo_del_alimento/41.pdf. Consultada el 4 de enero de 2010.
- McDonald, P. R., J. F. D. Greenhalgh, R. A. Edwards, y C. A. Morgan. 2006. *Nutrición Animal*. 6a. ed. Acribia S. A. Zaragoza, España. 578 p.
- Meneses M., M., S. J. Madrid, R. F. Hernández, y M. D. Megias. 2000. Evaluación de diferentes métodos de conservación del líquido ruminal para pruebas *in vitro*. *Nutrición y Alimentación* 25: 315-317.
- Menke, K. H., and H. Steingass. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development* 28: 7-55.
- NRC. 2007. *Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids and New World Camelids*. The National Academy Press. Washington, D. C. USA. 345 p.
- Obrador O., P. V., D. Hernández S., E. M. Aranda L., A. Gómez V., W. Camacho C., y M. Cobos P. 2007. Evaluación de los forrajes de morera *morus alba* y tulipán *hibiscus rosa-síntesis* a diferentes edades de corte como suplemento para corderos en pastoreo. *Universidad y Ciencia* 23: 115-125.
- Posada O., S. L., y R. R. Noguera. 2005. Técnica *in vitro* de producción de gases: una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. *Livestock Research Rural Development* 17. <http://www.lrrd.org/lrrd17/4/posa17036.htm>. Consultada el 13 de agosto de 2009.
- Robles, A. Y., R. L. Belyea, F. A. Martz, and M. F. Weiss. 1980. Effect of particle size upon digestible cell wall and rate of *in vitro* digestion of alfalfa and orchard grass forages. *Journal of Animal Science* 51: 783-790.
- Sánchez L, L. C., y L. C. Corrales R. 2005. Evaluación de la congelación para conservación de especies autóctonas bacterianas. *Bulletin of the World Health Organization* 79: 43-47.
- SAS. 2004. *SAS/STAT User's guide (Release 9.1)*. Cary, NC, USA. SAS Inst. Inc.
- Schofield, P., R. E. Pitt, and A. N. Pell. 1994. Kinetics of fiber digestion from *in vitro* gas production. *Journal of Animal Science* 72: 2980-2991.

- Steel, R. G. D., and J. H. Torrie. 1980. Principles and Procedures of Statistic: A Biometrical Approach. 2nd ed., McGraw-Hill, New York. 481 p.
- Streeter, L. C. 1969. A review of techniques used to estimate the *in vivo* digestibility of grazed forage. Journal of Animal Science 29: 757-768.
- Suárez S., J. C., J. E. Carulla, y J. E. Velásquez. 2008. Composición química y digestibilidad *in vitro* de algunas especies arbóreas establecidas en el piedemonte Amazónico. Zootecnia Tropical 26: 231-234.
- Tesorero, M., y J. Combellas. 2003. Suplementación de becerros de destete temprano con *Gliricidia sepium* y concentrado. Zootecnia Tropical 21: 119-131.
- Theodorou, M. K., B. A. Williams, M. S. Dhanoa, A. B. McAlla, and J. France. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. Animal Feed Science and Technology 48: 185-197.
- Urbano, D., y C. Dávila. 2003. Evaluación del rendimiento y composición química de once variedades de alfalfa (*Medicago sativa*) bajo corte en la zona alta del estado Mérida, Venezuela. Revista de la Facultad de Agronomía LUZ 20: 97-107.
- Vásquez C., P., y F. Quintero. 1995. Efecto del diámetro de las estacas de mataraton (*gliricia sepium*) sobre el crecimiento de ramas laterales. Zootecnia Tropical 13: 113-123.
- Verdecia, D. M., J. L. Ramírez, I. Leonard, Y. Pascual, y Y. López. 2008. Rendimiento y componentes del valor nutritivo del *Panicum maximum* cv. *Tanzania*. Revista Electrónica de Veterinaria IX. <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n050508/050807.pdf>. Consultada el 26 de noviembre de 2009.
- Williams, B. A. 2000 Cumulative gas-production techniques for forage evaluation. *In*: Forage Evaluation in Ruminant Nutrition. Givens, D. I., E .Owen, H. M. Omed, and R. F. E. Axford (eds.). Wallingford. UK. CAB International. 475 p.
- Witham, F. H.; D. F. Blaydes, and R. M. Devlin, 1971. Experiments in Plant Physiology. Van Nostrand Reinhold Company, New York. 245 p.