

Digestibilidad in vitro de especies forrajeras tropicales. 1. Comparación de métodos de determinación*

Nelmy Narváez V. y C. Lascano**

Introducción

La Red Internacional de Evaluación de Pastos Tropicales (RIEPT) tiene interés en medir en sus ensayos de pastoreo la digestibilidad de las especies en evaluación. Para ello, existen varios métodos tanto para estimar la digestibilidad in vitro de la materia seca (DIVMS) como la fibra neutra indigerible (FNI). Esta última es un marcador interno utilizado en la determinación de la digestibilidad in vivo en estudios de pastoreo con gramíneas y leguminosas forrajeras.

Sin embargo, para lograr resultados comparables entre laboratorios es necesario el empleo de una metodología similar, o en su defecto la estimación de factores de corrección (FC). Por esta razón, en el presente trabajo se compararon varios métodos para la estimación de la DIVMS y la FNI de especies forrajeras tropicales. Específicamente, se determinó la necesidad o no de aplicar factores de corrección en los resultados de DIVMS y FNI de forrajes dentro de la RIEPT.

Materiales y métodos

Origen de las especies. En el ensayo se emplearon 9 gramíneas y 11 leguminosas (Cuadro 1) recolectadas en el Centro Nacional de Investigaciones (CNI) ICA-CIAT Carimagua, localizado en los Llanos Orientales de Colombia a 175 m.s.n.m., con una temperatura media de 27 °C y una precipitación promedio de 1800 mm, y en la estación CIAT Quilichao, localizada a 990 m.s.n.m., con 23 °C de temperatura media y 1772 mm de precipitación anual en promedio. Los análisis químicos y de digestibilidad in vitro de la materia seca e indigestibilidad de la fibra neutra se realizaron en el Laboratorio de Calidad y Nutrición del CIAT.

Animales donantes del inóculo. Para los ensayos de digestibilidad in vitro se utilizaron como fuente de inóculo ruminal dos animales Cebú fistulados en el rumen. Estos permanecieron en una pastura de estrella (*Cynodon plectostachyus*), con libre acceso a sal mineralizada y a un suplemento diario de 500 g de torta de soya/animal.

Preparación del material para análisis. En el campo se recolectaron 500 g de forraje verde. Este material se secó en estufa a 60 °C y se pasó por un molino de martillo con criba de 1 mm. Estas muestras se almacenaron en recipientes plásticos a temperatura ambiente y se resecaron en estufa a 100 °C durante 12 horas antes del análisis in vitro.

* Resumen de parte del trabajo de grado del autor principal presentado para obtener el título de Zootecnista. Universidad Nacional, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Palmira, Colombia.

** Respectivamente: zootecnista y jefe de la sección de Productividad y Calidad de Pasturas del Programa de Pastos Tropicales del CIAT, Apartado aéreo 6713, Cali, Colombia.

Cuadro 1. Caracterización química (%) de las especies utilizadas en los ensayos de DIVMS.

Especie	Ecotipo CIAT No.	N	Ca	P	FND	FAD	N-FAD	Taninos
Gramíneas								
Sabana quemada	—	0.78	0.11	0.07	81.8	56.8	0.50	—
Sabana sin quemar	—	0.50	0.10	0.04	81.3	58.7	0.45	—
<i>Brachiaria humidicola*</i>	679	0.45	0.16	0.07	82.1	59.7	0.31	—
<i>Brachiaria humidicola**</i>	679	0.64	0.22	0.06	71.8	39.6	0.11	—
<i>Brachiaria decumbens</i>	606	1.60	0.40	0.10	69.6	40.0	0.42	—
<i>Brachiaria brizantha</i>	6294	0.81	0.25	0.10	71.5	41.8	0.20	—
<i>Brachiaria dictyoneura</i>	6133	0.67	0.27	0.07	73.2	39.5	0.08	—
<i>Andropogon gayanus</i>	621	0.84	0.24	0.07	79.6	51.7	0.25	—
<i>Paspalum notatum</i>	—	1.62	0.29	0.16	71.8	44.7	1.20	—
Leguminosas								
<i>Stylosanthes capitata</i>	10280	1.60	0.85	0.09	70.0	57.7	0.50	0.19
<i>Arachis pintoi</i>	17434	2.18	1.47	0.15	52.4	41.1	0.95	2.31
<i>Desmodium ovalifolium*</i>	350	1.60	0.85	0.14	66.4	52.1	0.81	9.76
<i>Desmodium ovalifolium**</i>	350	1.82	0.49	0.15	60.2	44.3	0.76	14.16
<i>Desmodium velutinum</i>	13218	1.62	0.26	0.11	73.4	51.7	0.45	0.09
<i>Desmodium strigillosum</i>	13155	1.65	0.56	0.12	57.7	44.4	0.62	7.95
<i>Dendrolobium</i> sp.	13262	1.95	0.64	0.13	71.6	45.6	1.32	1.69
<i>Centrosema acutifolium</i>	5277	3.00	0.63	0.18	60.7	44.6	1.06	0.09
<i>Tadehagi</i> sp.	13274	2.16	0.61	0.20	63.8	58.9	1.23	12.07
<i>Zornia glabra</i>	8307	2.18	0.32	0.18	54.1	40.9	0.05	0.32
<i>Phyllodium</i> sp.	13248	1.48	0.18	0.09	73.8	57.9	0.76	4.85

N = Micro-Kjedahl;
FND, FAD, N-FAD = Van Soest;
Ca y P = Salinas y García (1985).

* = Originaria del CNI Carimagua;
** = Originaria de la estación CIAT-Quilichao;

Comparación de métodos para determinar la DIVMS. Con el objeto de establecer factores de corrección útiles para aproximar resultados de DIVMS, obtenidos en diferentes laboratorios y estaciones experimentales, se compararon los métodos siguientes: 1) Alexander y McGowan (1961); 2) Tilley y Terry (1963), modificado por Moore (1970); 3) Van Soest et al. (1966); 4) Texas A & M (Ellis, 1970); 5) Pepsina-celulasa (Jones y Hayward, 1975), modificado por Goto y Minson (1977). Con excepción del método pepsina-celulasa que no utiliza licor ruminal sino celulasa, los demás métodos se corrieron en forma simultánea para evitar alteraciones en la digestibilidad por efecto del cambio de la fuente de inóculo.

Los métodos utilizados para determinar digestibilidad in vitro comprenden dos fases de 48 horas cada una: la fase bacteriana o celulolítica y la fase enzimática (proteolítica) o extracción con solución neutra detergente. Los métodos Tilley y Terry modificados por Moore y

Alexander y McGowan estiman la digestibilidad aparente de los forrajes utilizando las fases bacteriana y enzimática y difieren en la cantidad de reactivos empleados. Por otra parte, los métodos de Van Soest y Texas A & M estiman la digestibilidad verdadera de los forrajes, utilizando la fase bacteriana seguida por una extracción con solución neutra detergente y difieren en el medio utilizado en la fase de fermentación con bacterias. En el método Texas A & M se utiliza un medio enriquecido con caseína y microminerales y con alta capacidad reductora en comparación con el método Van Soest.

Comparación de métodos in vitro para determinar la fibra neutra indigerible (FNI).

Para la determinación de la fibra neutra indigerible (FNI) se compararon los métodos Texas A & M (Ellis, 1970) y modificado Moore (1970), con y sin recambio bacteriano a las 72 horas (fase bacteriana), durante un período total de fermentación de 144 horas. Después de este

tiempo el material en los tubos de ensayo se refrigeró durante 30 minutos para el análisis posterior de fibra neutra detergente (FND) (Goering y Van Soest, 1970).

Análisis de los resultados. Para la comparación de métodos los resultados se analizaron por regresión lineal, utilizando la ecuación: $Y = a + bX$. Para determinar si el intercepto (a) era diferente de cero y la pendiente (b) diferente de uno se utilizó la prueba de 't'.

En la interpretación de los resultados del análisis de regresión se tuvieron en cuenta los siguientes conceptos.

- Cuando el intercepto es igual a cero y la pendiente igual a uno, los métodos se consideran idénticos.
- Cuando el intercepto es igual a cero y la pendiente es diferente de uno, la relación entre los métodos se considera multiplicativa.
- Cuando el intercepto es diferente de cero y la pendiente igual a uno, los métodos son proporcionales y debe aplicarse un factor de corrección.
- Cuando el intercepto y la pendiente son diferentes de cero, la relación entre los métodos es multiplicativa y debe aplicarse un factor de corrección.

Resultados y discusión

Caracterización química de los ecotipos

Las gramíneas presentaron porcentajes más bajos de nitrógeno (N), fósforo (P), calcio (Ca) y componentes de fibra (FAD y N-FAD) y mayor contenido de fibra total (FND) que las leguminosas (Cuadro 1). Se observa que las especies presentaron un amplio rango de calidad. En las gramíneas el N varió entre 0.45% y 1.62%, la FND varió entre 69.6% y 82.1%, y la FAD entre 39.5% y 59.7%. En las leguminosas la variación en el contenido de N fue entre 1.6% y 3.0%, mientras que la FND y la FAD variaron entre 52.4% y 73.8% y entre 40.9% y 58.9%, respectivamente; además, presentaron contenidos variables de taninos, los cuales afectan su digestibilidad.

Comparación de métodos para la determinación de la DIVMS

Comparación del método Alexander y McGowan con el método modificado Moore.

Los resultados de la DIVMS en gramíneas y leguminosas con el método de Alexander y McGowan fueron similares a los obtenidos con el método modificado Moore, utilizado en el CIAT. Según el análisis de regresión (Cuadro 2) el intercepto no fue diferente de cero y la

Cuadro 2. Relación entre métodos utilizados para la determinación de la DIVMS de especies forrajeras tropicales.

Método	a	b	R ²	S _{yx}	a ≠ 0	b ≠ 1	
Gramíneas	- Alexander y McGowan vs. Moore	-0.76	1.04	0.97	2.63	ns	ns
	- Van Soest vs. Moore	12.12	0.91	0.95	2.84	**	ns
	- Texas A & M vs. Moore	8.98	1.02	0.98	2.08	**	ns
	- Pepsina-celulasa vs. Moore	1.86	0.83	0.94	3.00	ns	ns
Leguminosas	- Alexander y McGowan vs. Moore	1.25	0.97	0.98	1.52	ns	ns
	- Van Soest vs. Moore	14.40	0.85	0.89	3.90	**	ns
	- Texas A & M vs. Moore	14.12	0.85	0.87	4.25	**	ns
	- Pepsina-celulasa vs. Moore	4.66	0.95	0.97	2.25	ns	ns
Gramíneas + leguminosas	- Alexander y McGowan vs. Moore	0.07	1.01	0.98	2.09	ns	ns
	- Van Soest vs. Moore	13.42	0.88	0.92	3.30	**	ns
	- Texas A & M vs. Moore	11.28	0.94	0.92	3.60	**	ns
	- Pepsina-celulasa vs. Moore	5.62	0.84	0.84	4.84	ns	ns

** P < 0.01; ns = no significativo.

pendiente no fue diferente de uno, lo cual indica que los estimados de DIVMS con estos métodos se pueden considerar idénticos. Sin embargo, el método Moore requiere menos reactivos; por lo tanto, es más práctico y económico.

Comparación del método Van Soest con el método modificado Moore. Al comparar por regresión lineal los resultados de la DIVMS, utilizando en la segunda etapa del método Moore una solución neutra detergente en remplazo de la pepsina (método Van Soest), se observó un excelente ajuste del modelo lineal (Cuadro 2). Sin embargo, tanto en las gramíneas como en las leguminosas, el intercepto de la regresión fue diferente de cero, pero la pendiente no fue diferente de uno. Lo anterior indica que los métodos son proporcionales y requieren un factor constante de corrección para poder comparar los resultados.

En este caso los factores de corrección fueron 12.1, 14.4 y 13.4 para gramíneas, leguminosas y para el conjunto de ambas, respectivamente. Un factor de corrección similar encontraron Van Soest et al. (1966) para gramíneas y leguminosas de zonas templadas y subtropicales.

Comparación del método Texas A & M con el método modificado Moore. Al comparar los resultados obtenidos con estos métodos, se encontró una relación similar a la obtenida con los métodos Van Soest y modificado Moore. Nuevamente, la pendiente (b) de la regresión no fue diferente de uno, tanto en gramíneas como leguminosas, pero el intercepto (a) fue diferente de cero (Cuadro 2). Para comparar los resultados obtenidos con estos métodos, el factor de corrección fue mayor con leguminosas (14.1) que con gramíneas (9.0); para la combinación de gramíneas y leguminosas, este factor fue de 11.3, el cual es menor que el anteriormente encontrado en la comparación de los métodos Van Soest y modificado Moore.

En general, estos resultados indican que en especies tropicales es necesario establecer factores de corrección para comparar estimados de digestibilidad obtenidos con el método modificado Moore, con estimados de digestibilidad obtenidos usando en la segunda fase del in vitro la solución neutra detergente en lugar de pepsina (métodos Van Soest y Texas A & M). En este estudio el FC encontrado para el conjunto de gramíneas y leguminosas varió entre

11.2 y 13.4, los cuales se aplican así: $Y = X - FC$; en donde $Y = \text{DIVMS aparente (método modificado Moore)}$ y $X = \text{DIVMS verdadera (método Van Soest o Texas A \& M)}$.

Comparación del método pepsina-celulasa con el método modificado Moore. Al relacionar ambos métodos en gramíneas y leguminosas se encontró que el intercepto no fue diferente de cero y la pendiente no fue diferente de uno (Cuadro 2). Resultados similares encontraron Jones y Hayward (1975) al correlacionar el método pepsina-celulasa con el método Tilley y Terry en 44 especies forrajeras. Igualmente Adegbola y Paladines (1977) encontraron alta correlación entre la DIVMS de 24 especies forrajeras tropicales, utilizando los métodos pepsina-celulasa y modificado Moore.

Los resultados de este estudio confirman que es posible utilizar el método pepsina-celulasa para estimar la DIVMS de forrajes tropicales, ya que los resultados son comparables con métodos in vitro como el método Moore, que incluyen fases de fermentación y enzimática. La decisión sobre la escogencia del método dependerá, en gran parte, de la disponibilidad de animales fistulados y del costo o disponibilidad de celulasa. Es importante tener en cuenta que el método pepsina-celulasa representa ventajas como la eliminación de las variaciones debidas al inóculo que se utiliza en la fase de fermentación.

Comparación de métodos para determinar fibra neutral indigerible

Comparación del método modificado Moore con el método Texas A & M, sin recambio bacteriano. En el Cuadro 3 se observa que los resultados de la FNI de gramíneas y leguminosas, obtenida por el método modificado Moore sin la fase de pepsina ni recambio bacteriano, resultaron altamente correlacionados ($P < 0.01$) con los valores correspondientes obtenidos con el método Texas A & M sin recambio bacteriano. Sin embargo, en una comparación más detallada de estos métodos se observó que en gramíneas el intercepto (a) de la regresión no fue diferente de cero pero la pendiente (b) fue menor de uno. Sin embargo, en las leguminosas el intercepto no fue diferente de cero, ni la pendiente fue diferente de uno.

Estos resultados sugieren que el empleo del método modificado Moore sin recambio de

Cuadro 3. Relación entre métodos utilizados para la determinación de la FNI de especies forrajeras tropicales.

Método	a	b	R ²	S _{yx}	a ≠ 0	b ≠ 1	
Gramíneas	- Moore sin recambio bacteriano vs. Texas A & M sin recambio	0.51	0.92	0.99	1.01	ns	**
	- Moore con recambio bacteriano vs. Texas A & M sin recambio	1.25	1.03	0.98	1.58	ns	ns
	- Texas A & M con y sin recambio bacteriano	0.81	1.03	0.97	2.22	ns	ns
Leguminosas	- Moore sin recambio bacteriano vs. Texas A & M sin recambio	-2.79	1.00	0.99	1.49	ns	ns
	- Moore con recambio bacteriano vs. Texas A & M sin recambio	2.44	1.01	0.98	1.44	ns	ns
	- Texas A & M con y sin recambio bacteriano	1.35	0.97	0.99	1.09	ns	ns

** P<0.01; ns = no significativo.

bacterias a las 72 horas subestima la FNI, por lo menos en el caso de las gramíneas tropicales, debido posiblemente a que el medio no proporciona suficientes factores nutricionales. Estos son, por ejemplo, nitrógeno, capacidad reductora y microminerales necesarios para mantener constantes la actividad y la población bacteriana durante el tiempo de incubación (144 horas), lo cual sí se logra con el método Texas A & M.

Comparación del método modificado Moore con recambio bacteriano y el método Texas A & M sin recambio bacteriano. Al comparar los valores de la FNI de los forrajes, utilizando el método in vitro modificado Moore sin la fase de pepsina, pero con recambio del inóculo a las 72 horas de iniciada la digestión, con los resultados obtenidos con el método Texas A & M sin recambio de inóculo, se encontró una alta correlación ($P < 0.01$). En el Cuadro 3 se observa que en gramíneas y leguminosas el intercepto (a) de la regresión no fue diferente de cero y la pendiente (b) no fue diferente de uno, lo cual indica que ambos métodos dan resultados prácticamente iguales.

En general, estos resultados sugieren que cuando se utiliza el método modificado Moore para la determinación de la FNI en especies forrajeras tropicales es conveniente realizar un recambio de inóculo a las 72 horas.

Comparación de los métodos Texas A & M con y sin recambio bacteriano. En forma similar a lo encontrado en las relaciones anteriores, existió una alta correlación en los resultados de la FNI determinada por ambos métodos. El intercepto (a) y la pendiente (b) no fueron diferentes de cero y de uno, respectivamente (Cuadro 3).

De lo anterior se deduce que cuando se utiliza el método in vitro Texas A & M para la determinación de la FNI en gramíneas y leguminosas forrajeras tropicales no es necesario efectuar recambio del inóculo a las 72 horas, lo cual tiene grandes ventajas.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en estos ensayos permiten concluir: 1) en la comparación de métodos no se encontraron diferencias en DIVMS de gramíneas y leguminosas forrajeras utilizando dos fases: bacteriana o celulolítica y enzimática o proteolítica. El uso de detergente neutro en reemplazo de pepsina en la segunda fase resultó en mayores valores de DIVMS, siendo el factor de corrección una constante. 2) Para determinar FNI en gramíneas es necesario utilizar recambio de bacterias cuando se utiliza un medio de fermentación in vitro no enriquecido, o en caso contrario, se debe usar un factor de corrección apropiado. En las leguminosas no es necesario el recambio bacteriano ni el uso de un factor de corrección.

Summary

Several methods for estimating the in vitro dry matter digestibility (IVDMD) and the indigestible neutral detergent fiber (INDF) of nine grasses and eleven tropical forage legumes were compared in CIAT's Pasture Quality and Nutrition Laboratory. Specifically, the need to apply or not apply correction factors (CF) in the determination of these parameters to compare results within the RIEPT was determined.

The methods used to determine the IVDMD were: Alexander and McGowan; Tilley and Terry modified by Moore; Van Soest; Texas A & M; and Pepsin-cellulase. To determine the INDF, the Texas A & M and modified Moore methods were compared, with and without ruminal bacterial change at 72 hours of fermentation. The comparison between methods was made by linear regression analysis ($Y = a + bX$). A 't' test was used to determine if the intercept of the regression was different from 0 or if the slope of the regression was different from 1.

The results of the IVDMD in grasses and legumes with the Alexander and McGowan method were similar to those obtained with the modified Moore method ($a = 0$, $b = 1$; $P < 0.05$). The results in IVDMD using the Van Soest method and the modified Moore method were highly correlated ($R^2 = 0.95$) with estimates, being proportional but not identical ($a \neq 0$, $b \neq 1$; $P < 0.05$); therefore, a CF is required to compare estimates of IVDMD. Similar results were found when comparing results of IVDMD using the Texas A & M and modified Moore methods. In the comparison of estimates of IVDMD using the Pepsin-cellulase and modified Moore methods, it was found that with grasses and legumes the intercept was equal to 0 and the slope equal to 1 ($P < 0.05$). The methods are therefore considered to give identical estimates of IVDMD.

The modified Moore method without ruminal bacterial change underestimated the INDF in the grasses but not in legumes included in the test, which did not occur with the Texas A & M method using an enriched medium. This indicates that in order to determine the INDF of tropical grasses with the modified in vitro Moore method, it is necessary to change ruminal inoculum after 72 hours of fermentation.

Referencias

- Adegbola, A. y Paladines, O. 1977. Predicting of the digestibility of the dry matter of tropical forages from their solubility in fungal cellulasa solutions. *J. Sci. Food Agr.* 28:775-785.
- Alexander, R. A. y McGowan, M. 1961. A filtration procedure for the in vitro determination of digestibility of herbage. *J. Br. Grassl. Soc.* 16:275.
- Ellis, W. C. 1970. The in vitro determination of true and apparent digestibility of forages. Animal Science Department. Texas A & M University. Texas, E.U.
- Goering, H. K. y Van Soest, P. J. 1970. Forage fiber analysis. (Apparatus, reagents, procedures and some applications). Agriculture Research Service. United States Department of Agriculture. Washington, D.C. Agriculture Handbook No. 379.
- Goto, I. y Minson, D. J. 1977. Predicting of the dry matter digestibility of tropical grasses using a pepsin-cellulasa assay. *Anim. Feed Sci. Techn.* 2:247-253.
- Jones, D. I. y Hayward, M. V. 1975. The effect of pepsin pretreatment of herbage on the prediction of dry matter digestibility in fungal cellulose solution. *J. Sci. Food Agr.* 26:711-718.
- Moore, J. E. 1970. Procedure of the two-stage in vitro digestion of forages. University of Florida, Department of Animal Science. En: Center for Tropical Agriculture (eds.). Métodos para el análisis químico y la evaluación biológica de alimentos para animales. University of Florida. Gainesville, Florida, E.U.
- Salinas, J. G. y García, R. 1985. Métodos químicos para el análisis de suelos ácidos y plantas forrajeras. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Programa de Pastos Tropicales. Cali, Colombia. 83 p.
- Tilley, J. M. y Terry, R. A. 1963. A two-stage technique for in vitro digestion of forage crops. *J. Br. Grassl. Soc.* 18:104-111.
- Van Soest, P. J.; Wine, R. H. y Moore, L. A. 1966. Estimation of the true digestibility of forages by in vitro digestion of cell walls. *Int. Grassl. Congr.*, 10o, Helsinki. p. 438-441.