

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
Facultad de Ciencias Agropecuarias.
Especialización en Alimentación de Bovinos

Comparación de inóculos microbianos en la determinación de la digestibilidad *in vitro*

Alumno: María Laura Guzmán

Tutor: Ing. Agr. Alejandra Cabanillas

2011

COMPARACIÓN DE INÓCULOS MICROBIANOS EN LA DETERMINACIÓN DE LA DIGESTIBILIDAD *in vitro*

María Laura Guzmán

Tutor de Trabajo Final: **Ing. Agr. Alejandra Cabanillas**

Tribunal Examinador de Tesis:

Ing. Agr. (Mg.) Catalina Boetto.....

Ing. Agr. (Mg. Sc.) Marcelo De León

Ing. Agr. Alejandra Cabanillas... ..

Presentación Formal Académica
Córdoba, 19 de Junio de 2012
Secretaría de Posgrado
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Universidad Nacional de Córdoba

INTRODUCCIÓN

El potencial productivo del animal sólo puede expresarse en la medida que se cubran sus necesidades de mantenimiento, quedando un excedente disponible para ser transformado en producto, esto es la clave para el éxito de los sistemas de producción bovina. El conocimiento de la digestibilidad de los alimentos es básico para establecer su valor nutritivo, y ello, para la formulación de raciones de animales rumiantes; sin embargo, la determinación *in vivo* de la digestibilidad es un proceso laborioso, costoso y requiere el empleo de grandes cantidades de alimento, adicionándole numerosos factores, entre los que se destacan el tipo de ración, el nivel y pauta de ingestión de los alimentos, la especie animal y el estado fisiológico de los animales (Schneider and Flatt, 1975). Varios experimentos se han realizados para estudiar el efecto de la ración del animal donante de inóculos con ganado ovino (Ramanzin *et al.*, 1997), vacuno (Jaakola and Huhtanen, 1993) y caprino (Kawas *et al.*, 1991; Ramanzin *et al.*, 1997), concluyendo que a medida que aumenta la proporción de concentrado en la ración se produce un aumento paralelo de la digestibilidad *in vivo* de la materia seca (MS) y de la materia orgánica (MO), así como una disminución de la digestibilidad de los componentes de la pared celular. Huhtanen y Jaakola (1993) observaron que estos efectos eran producidos fundamentalmente por cambios en la digestión en el rumen, mientras que el efecto observado en los tramos posteriores del tracto digestivo era muy pequeño. Lo arriba explicado, fue la causa que desencadenó la búsqueda de técnicas alternativas en laboratorio, con el objetivo de simplificar los procedimientos, reducir la labor y los costos de las determinaciones (Adesogan, 2005). En la evaluación de alimentos se cuantifican entidades químicas. Hoy en día, además se ha puesto interés en desarrollar métodos “biológicos”, a los cuales se les establece sus asociaciones con la respuesta animal (France *et al.*, 2000). El procedimiento desarrollado por Tilley y Terry (1963), es con ligeras modificaciones, el más ampliamente utilizado en la mayoría de los laboratorios. Sin embargo, este método sigue siendo un procedimiento que consume mucho tiempo y trabajo, debido a que cada alimento debe incubarse por separado, limitando el número de muestras a ser analizadas por corrida o tanda. Entre las modificaciones importantes, están las propuestas por Goering y Van Soest (1979), que permitieron una valoración rápida de los alimentos sin afectar negativamente a la precisión del valor obtenido (Van Soest, 1994). Este procedimiento consiste en una incubación de los alimentos con líquido ruminal durante 48 h a 39°C, seguida del tratamiento del residuo obtenido con una solución neutro-detergente durante 1h a 100°C, considerando los resultados una estimación de la digestibilidad real de los alimentos. El reciente equipo DaisyII®-Ankom Technology, permite la incubación simultánea de

100 muestras diferentes, en recipientes de vidrio, manteniendo calor uniforme y agitación constante durante el procedimiento de incubación. Es un método rápido, seguro, eficiente y económico (De Figueiredo, 2000) y los datos obtenidos de digestibilidad para distintos alimentos tienen una alta correlación con los obtenidos por el método convencional de Tilley y Terry (Vogel et al., 1999), con la técnica *in situ* o de la bolsa de nylon (Robinson et al., 1999, Wilman et al 2000) y con valores *in vivo* (Bochi-Brum et al., 1999). Un reciente estudio de Brunetti (2010), demostró que las mejores respuestas de predicción del valor nutritivo en silajes de sorgo de argentina, se encontraron cuando en los modelos se utilizaron las variables biológicas, digestibilidad *in situ* usando materiales frescos para su análisis y digestibilidad *in vitro* mediante el método Tilley y Terry en el incubador DaisyII®-Ankom Technology. Para llevar a cabo los métodos biológicos es necesario el uso de animales donantes de licor ruminal, los cuales están crónicamente fistulados en rumen, siendo numerosos los problemas que surgen de su mantenimiento (Mauricio 2001), como por ejemplo, intervenciones quirúrgicas costosas, infecciones en especial en las zonas tropicales, adicionando el problema de que el inóculo ruminal no es un fiel representante de ese ambiente en lo que se refiere a cantidad y calidad de microorganismos. Omed (2000) encontró que las heces presentan un alto potencial como alternativa de inóculo en las técnicas de digestibilidad *in vitro*; como así también para la técnicas de gases (Aiple et al.; 1992), considerando una ventaja de este inóculo la inespecificidad de los microorganismos por el sustrato (Ørskov et al., 1970,1972). Varios son los autores que coinciden con lo antes dicho; utilizando heces de distintos rumiantes, como en el caso de ovejas (Mann y Orskov, 1973; Lewis y Dehority, 1985; Vãradyová et al., 2005), heces de ganado bovino (Jones and Barnes, 1996; Holden, 1999; Mabjeesh et al., 2000) y los más recientes estudios, de caballos (Lattimer et al., 2007; Murray et al., 2008).

La necesidad de cuidar el bienestar de los animales usados para experimentación, que significa entre otras cosas, exponerlos al menor estrés posible durante la preparación, evaluación y recuperación de los procedimientos experimentales, exige que se reduzcan al mínimo posible procedimientos, que aunque muy cuidados y que no ponen en riesgo la vida de los animales, pueden generar alguna incomodidad. Por lo expuesto, sumado a la carencia de un método rápido y confiable que permita determinar el valor nutritivo de los alimentos de manera masiva en el laboratorio, se justifica el objetivo del trabajo que consistió en comparar la efectividad de recursos microbiales, fecales y ruminales, en la determinación de la digestibilidad verdadera *in vitro*, utilizando una misma muestra.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se realizaron en el INTA, Estación Experimental San Luis (Latitud 33°39'50" S, Longitud 65°24'37" W), durante el periodo de enero a marzo del 2011. La muestra evaluada fue heno de alfalfa, *Medicago sativa L*, con 35 días de rebrote. La misma se secó a 65°C por 48 h, continuando con un molido y tamizado (2mm), para posterior determinación analíticas de materia seca (AOAC, 1990), proteína bruta por Kjeldahl (Bremmer y Breitenke, 1983), en forma secuencial, fibra detergente neutra (FDN), fibra detergente ácida (FDA) y lignina detergente ácida (LDA) (Goering y Van Soest, 1970), cuyos resultados se muestran en la Tabla I. Para el análisis de digestibilidad verdadera *in vitro*, se utilizó la técnica descrita por Goering y Van Soest (1979), adaptando la modificación metodológica propuesta por Ankom Technology Corporation, para el equipo DaisyII®. Para ello se depositaron 250 mg de muestra en bolsas de poliéster/polietileno (FN° 57), con dimensiones de 5 x 4 cm y porosidad de 25 µm, las mismas se sellaron con calor, colocándolas en recipientes de vidrio (jarras) de 4 litros de capacidad, que giran dentro de una cámara a temperatura controlada. En cada una de las cuatro jarras de digestión se incubaron al azar 10 bolsas (repeticiones), incluyendo dos blanco (bolsa vacía y sellada sin muestra), con el fin de generar el factor de corrección por el posible ingreso de partículas ó pérdida de peso de las bolsas. La solución buffer que se añadió en cada recipiente fue la propuesta por Kansas State (Marten et al., 1980) compuestas por minerales, fuentes de nitrógeno y agentes reductores que ayudan a la anaerobiosis necesaria en el proceso (Anexo I). El inóculo microbial necesario para el procedimiento se recolectó de un bovino macho de raza Aberdeen Angus con fístula en rumen, de peso vivo 350 kg, alimentado en el primer periodo del ensayo con heno de alfalfa, y en una segunda etapa con rollo de digitaria, de baja calidad con a finalidad de evaluar la interacción entre el sustrato, el inóculo y la digestibilidad. El material ruminal se extrajo directamente a través de la fístula ruminal, se tomó un puñado de mezcla del rumen, se exprimió el contenido para extraer el líquido y éste se almacenó en los termos previamente calentados con agua a 40°C para su transporte. En el laboratorio el material ruminal se licuó por 30 segundos, se filtró y transfirió a un erlenmeyer mantenido en baño maría a 39°C, continuamente saturado con CO₂. La materia fecal se obtuvo del mismo animal, simultáneamente a través de palpación rectal, manteniendo el material en bolsas de polietileno herméticamente cerradas y en conservadora a 40°C hasta su procesamiento. Para la homogenización del inóculo fecal, se mezcló 40 gr. de heces con 360 ml de agua destilada con gaseado constante con CO₂, luego se filtró la solución obtenida a través de una doble capa de gasas y se agregó a dos de las jarra de incubación. En laboratorio, a la preparación de la solución tampón (1600 ml/jarra) se

adicionó 400 ml de líquido ruminal o fecal, en condiciones anaerobias permanentes. Las muestras se incubaron por 48 h en el DaisyII® a una temperatura de $39.2 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, con agitación circular constante que posee el equipo. Luego de la incubación, las bolsas se lavaron con agua fría, con el fin de detener la fermentación y se procesaron en el analizador de fibra Ankom 220, sometiendo los residuos de la incubación a una solución detergente neutra por una hora a 100°C , permitiendo remover restos microbianos y algunos remanentes de fracciones solubles para obtener resultados en términos de digestibilidad verdadera *in vitro* de la materia seca (DVIVMS). En cada periodo experimental se realizaron dos series de incubaciones separadas por un intervalo de dos días.

Tabla I: Composición química de Heno de Alfalfa (muestra) en base a MS

MS %	FDN %	FDA %	PB %	DVIVMS %	DIVMS %	EM1 Mcal/kgMS	EM 2 Mcal/kgMS	EM 3 Mcal/kgMS
94,98	49,72	30,10	14,71	76,80	64,90	2,35	2,77	2,34

MS: Materia Seca. PB: Proteína Bruta. FDN: Fibra Detergente Neutro.FDA: Fibra Detergente Ácida. LDA: Lignina detergente Acido. DVIVMS: Digestibilidad Verdadera *in vitro* de la materia Seca DIVMS: Digestibilidad *in vitro* de la materia Seca. EM: Energia Metabólica estimada a partir de: 1- FDA, 2- DVIVMS, 3- DIVMS.

Análisis estadístico: El experimento se realizó en dos periodos de 20 días de duración cada uno determinados por la ración del animal donante. El diseño experimental fue en bloques (jarras) con 10 repeticiones en cada bloque. Por tanda se corren cuatro jarras, dos con fluido ruminal y las otras dos con fluido fecal. Los resultados fueron analizados mediante estadísticas descriptivas, las relaciones entre la DVIVMS usando inóculos ruminales y fecales se estudiaron mediante análisis de correlación del paquete estadístico de IBM SPSS (2010).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La DVIVMS con ambos inóculos se ve afectada por dieta del animal donante, manteniéndose en las corridas el ranking de los valores de superioridad del inóculo ruminal (Tabla II).

Tabla II: Estadística descriptiva de la DVIVMS de alfalfa

Inoculo	Dieta	Media	DE	EE	Var.	CV	Intervalo de confianza 95%	
LR	alfalfa	76,79	1,41	0,22	1,93	1,83	76,93	77,22
LF	alfalfa	73,83	1,21	0,19	1,43	1,64	73,45	74,24
LR	digitaria	74,73	0,94	0,15	0,88	1,25	74,45	75,03
LF	digitaria	70,43	1,64	0,26	2,70	2,33	69,97	70,95

DE: desvío estándar. EE: error estándar. Var: varianza. CV: coeficiente de variación. LR: licor Ruminal. LF: licor Fecal

Para corroborar si había diferencia significativa, se analizan los datos estadísticamente; encontrando que los valores no se distribuyen normalmente como indica la Tabla III.

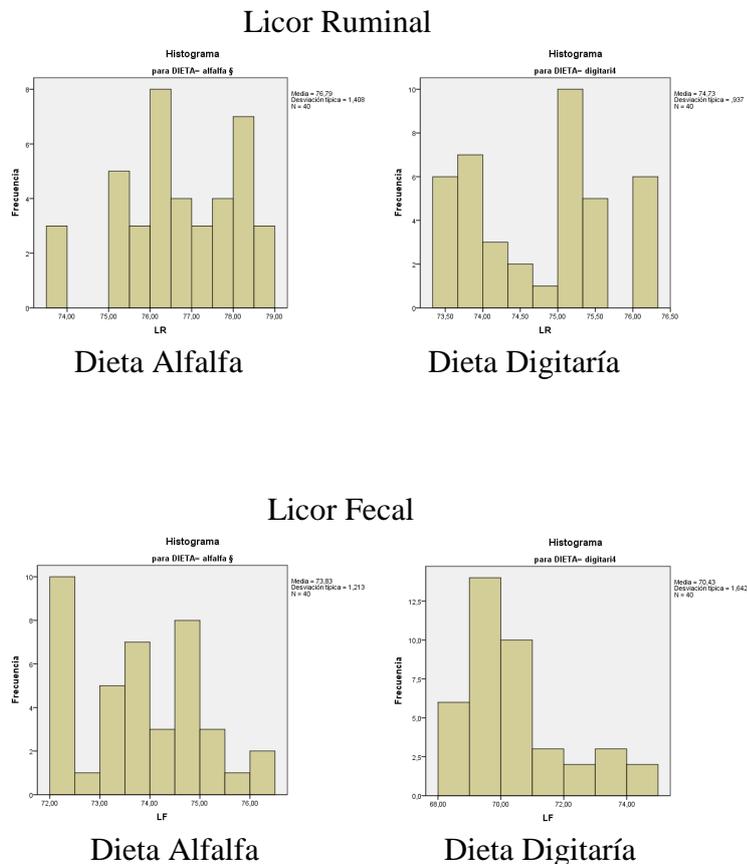
Tabla III: Prueba de la normalidad

Inóculo	Dieta	Shapiro-Wilk Sig.	Homog.Vza E. Levene
Licor Ruminal	Alfalfa	0.047	7.37
	Digitaria	0.003	
Licor Fecal	Alfalfa	0.017	1.58
	Digitaria	0.003	

$p > 0.05$, acepto la H_0 = distribución normal

La Prueba de Shapiro-Wilk muestra claramente que los datos no son normales, además la prueba de homogeneidad de la varianza con el estadístico de Levene, nos indica que las varianzas no son iguales u homogéneas; corroborando lo dicho anteriormente los siguientes gráficos de distribución (Fig. 1)

Figura 1: Frecuencias de digestibilidades con distintos inóculos y dietas



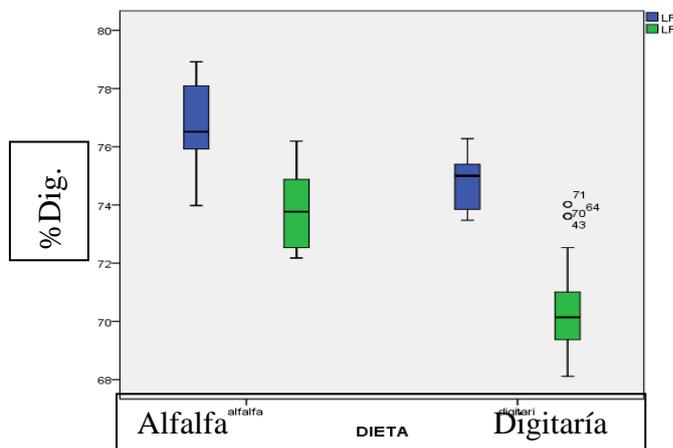
Como los datos no son normales, se aplicó el Tets de Mann Whitney (Tabla IV), existiendo diferencias altamente significativa entre las dietas para licor ruminal y para licor fecal dando un p-valor=0, lo que se confirma en el gráfico de Box plots (Fig. 2), dando los mayores resultados de digestibilidad con licor ruminal a partir del animal alimentado con alfalfa.

Tabla IV: Análisis No Paramétrico: Prueba de Mann-Whitney

Estadísticos de contraste ^a		
	LR	LF
U de Mann-Whitney	176,000	110,000
W de Wilcoxon	996,000	930,000
Z	-6,006	-6,640
Sig. asintót. (bilateral)	,000	,000

a. Variable de agrupación: DIETA

Figura 2: Porcentaje de dig., las cajas azules representan el licor ruminal y las verdes licor fecal.



Estas diferencias entre las dietas del animal donante puede deberse al efecto que ésta tiene sobre algún tipo de bacterias, como sucede en el primer periodo del ensayo donde el alimento del animal donante fue alfalfa, lo que favorecería el desarrollo de la flora proteolítica, aumentando la digestibilidad de la alfalfa-muestra por su alto contenido de proteína bruta. Ørskov, en varios de sus trabajos (1970, 1972 y Mann y Ørskov 1973), demostró que realizando infusiones al abomaso con distintos tipos de carbohidratos, no varía la microflora cecal en lo que se refiere a las especies, pero sí en concentración. Estas diferentes tendencias se muestran en la Figura 3.

En general la DVIVMS usando fluido ruminal resultó ser, en promedio, 4 puntos mayor que en el caso del fluido fecal, lo cual puede deberse a una menor concentración microbiana, y además, a la pobre población desarrollada en heces, en comparación al ambiente ruminal, por la variada oferta de nutrientes que éste recibe. Esta menor digestibilidad del fluido fecal coincide con lo señalado por El

Shaer y colaboradores en 1987 al evaluar varios sustratos, donde obtuvieron un menor valor con fluido fecal de ovejas comparando digestibilidad *in vivo*, atribuyendo ésto a factores propios de la técnica, como son humedad de las heces y tiempo de incubación; razón por la cual para disminuir estos errores, se realizaron las determinaciones en simultaneo, y en función de la humedad de las heces se estimó la proporción para la preparación de los licores microbiales. Omed en 2000 reportó que la relación entre la DIVMS y la concentración de heces en el inóculo no es lineal, y que concentraciones muy altas resultan en valores bajos de DIVMS, encontrando la mayor actividad de las heces cuando se utilizan entre 6-10 gr de heces/100 ml de solución de saliva artificial. La similar y en algunos casos menor desviación estándar asociadas con fluido fecal, indicarían que la modificación del inóculo en el método tradicional tendría menor precisión, sugiriendo ésto que podría ser usado para predecir la digestibilidad verdadera con una variación relativamente baja.

Coincidiendo con varios autores (Jaakola y Huhtanen, 1993; Ramanzin *et al.*, 1997; Kawas *et al.*, 1991) quienes evaluaron el efecto de la dieta del animal donante sobre el licor ruminal, se concluye que la dieta es el factor principal de variación de la técnica *in vitro*, por la modificación cuantitativa y cualitativa de la microflora ruminal. Aiple (1992), afirma que la actividad del inóculo fecal depende de la población microbiana del intestino posterior y éste a su vez de la dieta. Esto se evidencia con el bajo factor de relación del 45,6% obtenido en el análisis estadístico (Anexo B), al tratar de relacionar los valores de digestibilidad sin estratificar por dieta e inóculo (Ecuación 1, Anexo C), sin embargo, al comparar la digestibilidad con los distintos inóculos manteniendo la misma dieta, este factor aumenta considerablemente (Ecuación 2 y Ecuación 3, Anexo C), obteniendo el mayor valor R² para el animal alimentado con alfalfa, confirmando el efecto de la dieta sobre los inóculos. No obstante, dado el limitado número de repeticiones, y al tratarse de una misma muestra no se puede establecer alguna ecuación de predicción.

Ecuaciones:

- 1- **DIVMS (LR)** = 65,573 + 0,172 * DIVMS (LF) – 1,474 * Dieta R² 45,6%
- 2- **DIVMS (LR)** = 76,791 – 2,965 * DIVMS (LF) R² 56,6 con digitaria
- 3- **DIVMS (LR)** = 74,734 – 4,30 * DIVMS (LF) R² 72,6 con alfalfa

Donde: DIVMS (LR): Digestibilidad in vitro de la MS con inóculo Ruminal. DIVMS (LF): Digestibilidad in vitro de la MS con inóculo Fecal. DIETA: 1: alfalfa / 2: digitaria

BIBLIOGRAFÍA

- Aiple, K.P., Steingass, H., y Menke, K.H., 1992. Suitability of a buffered faecal suspension as the inoculum in the Hohenheim gas test. 1. Modification of the method and its ability in the prediction of organic matter digestibility and metabolizable energy content of ruminant feeds compared with rumen fluid as inoculum. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 67, 57–66.
- Andesogan, A.T., 2005. Improving forage quality and animal performance with fibrolytic enzymes. *Florida Ruminant Nutrition Symposium*.pp.91-109.
- Ankom Technology. Procedures for fiber and in vitro analysis URL: [hpt://www.ankom.com/homepage.html](http://www.ankom.com/homepage.html).
- Bernardis, A; González, R. H. y Martínez Muñoz, A. Suspensión de Excretas de Ganado Vacuno como Fuente de Inoculo para efectuar la Digestibilidad in vitro de Especies Forrajeras.
- Bochi-Brum, O., Carro D, Valdés C, González J y López S. 1999. Digestibilidad *in vitro* de forrajes y concentrados: efecto de la ración de los animales donantes de líquido ruminal. *Arch. Zootec.* 48: 51-61.
- Brunetti, M.A. 2010. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Córdoba Facultad de Ciencias Químicas. Departamento de Fisicoquímica.
- De Figueiredo, M., Mbhele, A y Zondi J. A. 2000. Modification of the DaisyII-200 technique for the determination of in vitro dry matter digestibility. *South Afri J Anim Sci*; 30 Suppl 1:49-50.
- El Shaer, H.M., Omed, H.M., Chamberlain, A.G., y Axford, R.F. 1987. Use of faecal organisms from sheep for he in vitro determination of digestibility. *J. Agric. Sci. Camb.* 109, 257–259.
- France, J., Theodorou, M.K., Lowman, R.S. y Beever, D.E. 2000. Feed evaluation for animal production. In: *Feeding systems and feed evaluation models*. Ed. by: Theodorou, M.K and France, J. Pag. 1.
- Goering, M. y Van Soest, P. J. 1979. Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). Washington. USA.. *Agricultural Handbook* N° 379.
- Holden L.A., 1999. Comparison of methods of in vitro dry matter digestibility for ten feeds. *J. Dairy Sci.*, 82, 1791-1794.
- Huhtanen, P. and S. Jaakola. 1993. The effects of forage preservation method and proportion of concentrate on digestion of cell wall carbohydrates and rumen digesta pool size in cattle. *Grass Forage. Sci.*, 48: 155-165.
- Jaakola, S. y Huhtanen, P. 1993. The effects of forage preservation method and proportion of concentrate on nitrogen digestion and rumen fermentation in cattle. *Grass Forage. Sci.*, 48: 146-154.

- Jones R.J. y Barnes P., 1996. In vitro digestibility assessment of tropical shrubs legumes using rumen fluid or faecal fluid as the inoculum source. *Trop. Grassl.*, 30, 374-377.
- Kawas, J.R., J. Lopes, D.L. Danelon and C.D. Lu 1991. Influence of forage to concentrate ratio on intake, digestibility, chewing and milk production in dairy cows. *Small Rum. Res.*, 4:11-18.
- Lattimer J.M., Cooper S.R., Freeman D.W., Lalman D.L., 2007. Effect of yeast culture on in vitro fermentation of a high-concentrate or high-fiber diet using equine fecal inoculum in a DaisyII incubator. *J. Anim. Sci.*, 85, 2484-2491.
- Lewis, S.M., Dehority, V.B.A., 1985. Microbiology and ration digestibility in the hindgut of the ovine. *Appl. Environ. Microbiol.* 50, 402-412.
- Mabjeesh S.J., Cohen M., Arieli A., 2000. In Vitro Methods for Measuring the Dry Matter Digestibility of Ruminant Feedstuffs: Comparison of Methods and Inoculum Source. *J. Dairy Sci.*, 83, 2289-2294.
- Mann, S.O., Ørskov, E.R., 1973. The effect of rumen and post-rumen feeding of carbohydrates on the caecal microflora of sheep. *J. Appl. Bact.* 36, 475-484.
- Mauricio R.M., Owen E., Mould F.L., Givens I., Theodorou M.K., France J., Davies D.R., Dhanoa M.S., 2001. Comparison of bovine rumen liquor and bovine faeces as inoculum for an *in vitro* gas production technique for evaluating forages. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 89, 33-48.
- Murray J.M.D., Longland A., Dunnett C., 2008. Effect of yeast supplementation on the in vitro fermentation of high-temperature dried lucerne incubated with an equine faecal inoculum. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 146, 149-159.
- Omed H.M., Lovett D.K., Axford R.F.E., 2000. Faeces as a source of microbial enzymes for estimating digestibility. In: Givens, D.I., Owen, E., Omed, H.M., Axford, R.F.E. (Eds.), *Forage Evaluation in Ruminant Nutrition*. CAB International, Wallingford, 135-154.
- Ørskov, E.R., Fraser, C., Mason, V.C., Mann, S.O., 1970. Influence of starch digestion in the large intestine of sheep on caecal fermentation, caecal microflora and faecal nitrogen excretion. *Br. J. Nutr.* 24, 671-682.
- Ørskov, E.R., Mayes, R.W., Mann, S.O., 1972. Post-ruminal digestion of sucrose in sheep. *Br. J. Nutr.* 28, 425-432.
- Ramanzin, M., Bailoni L y Schiavon S. 1997. Effect of forage to concentrate ratio on comparative digestion in sheep, goats and fallon deer. *Anim. Sci.*, 64: 163-170.
- Robinson P, Campbell M, Fadel J. 1999. Influence of storage time and temperature on in vitro digestion on neutral detergent fibre at 48h, and comparison to 48h in sacco neutral detergent fiber digestion. *Anim Feed Sci Technol*; 80:257-266.

- Schneider, B.H. and W.P. Flatt. 1975. The Evaluation of Feeds Through Digestibility Experiments. The University of Georgia Press, Athens.
- Tilley J, Terry R.. 1963. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crop. J. Br. Grassld. Soc. 18:104-111.
- Van Soest, P.J. 1994. Nutritional Ecology of the Ruminants. 2nd ed., Cornell University Press. New York.
- Váradyová Z., Baran M., Zeleňák I., 2005. Comparison of two in vitro fermentation gas production methods using both rumen fluid and faecal inoculum from sheep. Anim. Feed Sci. Technol., 123-124, 81–94.
- Varel V, Kreikermeier K. 1995. Technical note: comparison of in vitro and in situ digestibility methods. J Anim Sci; 73:578-582.
- Vogel K, Pedersen J, Materson S, Toy J. 1999. Evaluation of a filter bag system for NDF, ADF, and IVDMD forage analysis. Crop Sci; 39:276-279.
- Wilman D, Van Soest, P.J., R.H. Wine and L.A. Moore. 1966. Estimation of the true digestibility of forages by the in vitro digestion of cell walls. Proc. 10th Int. Grasslands Congr., Helsinki. pp. 438-441.
- Wilman D, Adesogan A. 2000. A comparison of filter bag methods with conventional tube methods of determining the in vitro digestibility of forages. Anim Feed Sci Techon; 84:33-47.

Anexo A: Preparación Buffer

Kansas State Buffer

Solución A

Droga	Gramos/litro
KH_2PO_4	10,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5
NaCl	0,5
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,1
Urea	0,5

Solución B

Droga	Gramos/litro
Na_2CO_3	15,0
$\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	1,0

Mezclar 270 ml de la solución B con 1330 ml de la solución A, ajustando pH a 6,8.

Anexo B: Análisis Estadístico

Dieta de animal donante: Alfalfa (*Medicago sativa*)

Digitaria (*Digitaria Eriantha*)

Muestra: Alfalfa 10% floración

1-Modelo General: Resumen del modelo

Modelo	R	R cuadrado	R cuadrado corregida	Error típ. de la estimación	Durbin-Watson
1	0,675 ^a	0,456	0,452	1,16072	2,222

Variables predictoras: (Constante), Dieta, LF. Variable dependiente: LR

ANOVA

Modelo		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
1	Regresión	357,802	2	178,901	132,787	0,000 ^a
	Residual	427,087	317	1,347		
	Total	784,890	319			

Variables predictoras: (Constante), Dieta, LF. Variable dependiente: LR

Coefficientes

Modelo		Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados	t	Sig.
		B	Error típ.	Beta		
1	(Constante)	65,573	3,522		18,620	0,000
	LF	0,172	0,046	0,243	3,776	0,000
	Dieta	-1,474	0,202	-0,471	-7,307	0,000

2- Dieta de animal donante: **Digitaria** (*Digitaria Eriantha*)

Resumen del modelo

Mod	R	R qua	A R Squ	Std. E Es	Change Statistics					D-W
					R SqCh	F C	df1	df2	Sig. F C	
1	,752 ^a	,566	,561	1,31401	,566	101,80	1	78	,000	2,048

ANOVA

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	175,783	1	175,783	101,808	,000 ^a
	Residual	134,676	78	1,727		
	Total	310,459	79			

Coefficientes

Model		Unstandardized Coefficients		StCoefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	76,791	,208		369,611	,000
	Inoculo	-2,965	,294	-,752	-10,090	,000

3- Dieta de animal donante: **Alfalfa (*Medicago sativa*)****Resumen del modelo**

Mo	R	R Sq	Ad R S	Std. E Es	Change Statistics					D-W
					R Sq C	F C	df1	df2	Sig. F	
1	,852 ^a	,726	,723	1,33681	,726	206,918	1	78	,000	1,705

ANOVA

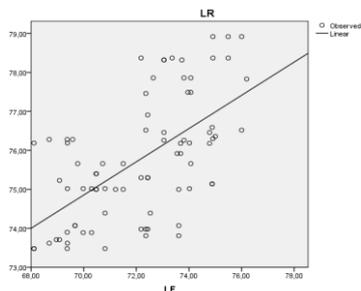
Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	369,774	1	369,774	206,918	,000 ^a
	Residual	139,391	78	1,787		
	Total	509,165	79			

Coefficientes

Model		UCoefficients		StaCoeff	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Cte)	74,734	,211		353,57	,000
	inoculo	-4,300	,299	-,852	-14,385	,000

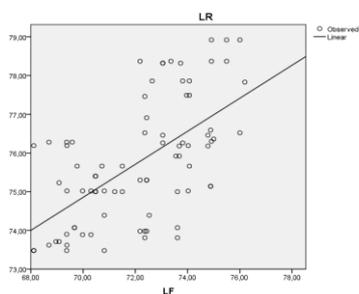
Anexo C: Gráficos de Regresión mostrando la relación de Digestibilidades con distintos inóculos

*Modelo Completo



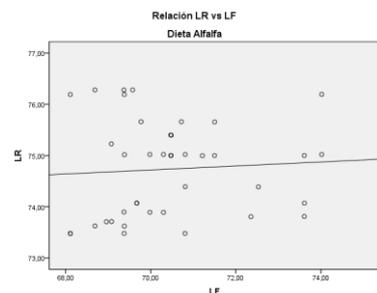
Ecuac 1: $DIVMS(LR) = 65,573 + 0,172 * DIVMS(LF) - 1,474 * Dieta$ $R^2 45,6\%$

*Alimentación del animal donante *Digitaria (Digitaria Eriantha)*



Ecuac. 2: $DIVMS(LR) = 76,791 - 2,965 * DIVMS(LF)$ $R^2 56,6$

*Alimentación Animal donante alfalfa (*Medicago sativa*)



Ecuac. 3: $DIVMS(LR) = 74,734 - 4,30 * DIVMS(LF)$ $R^2 72,6$