



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

*FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA*

“COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS *IN VITRO* PARA ESTIMAR LA  
DIGESTIBILIDAD DE ENSILADOS DE MAÍZ (*Zea mays*) DE SISTEMAS DE  
PRODUCCIÓN DE LECHE EN PEQUEÑA ESCALA”

# TESIS

Que para obtener el título de  
**Médico Veterinario Zootecnista**

Presenta:

**AURORA SAINZ RAMÍREZ**

## ASESORES:

DR. CARLOS MANUEL ARRIAGA JORDÁN

DR. FELIPE LÓPEZ GONZÁLEZ

DR. IGNACIO ARTURO DOMÍNGUEZ VARA

## REVISORES:

DRA. ALEJANDRA DONAJÍ SOLÍS MÉNDEZ

DR. MANUEL GONZÁLEZ RONQUILLO



Toluca, México, Enero de 2016

## RESUMEN

### **Comparación de dos métodos *in vitro* para estimar la digestibilidad de ensilados de maíz (*Zea mays*) de sistemas de producción de leche en pequeña escala**

En el presente trabajo, se estimó y comparó la digestibilidad de ensilados de maíz en sistemas de producción de leche en pequeña escala, a través de la comparación de dos métodos *in vitro*: a) digestibilidad Daisy II - Incubator Ankom Technology con líquido ruminal y b) digestibilidad enzimática.

Se evaluaron los resultados de ambos métodos mediante la comparación de medias apareadas con T-Student.

El trabajo de laboratorio fue realizado en las instalaciones del Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales (ICAR) de la Universidad Autónoma del Estado de México, con muestras de ensilados de maíz recolectadas de 2011 a 2014 de unidades de producción de bovinos productores de leche en sistemas de pequeña escala localizadas en el municipio de Aculco, Estado de México.

Los resultados indican que existen diferencias estadísticas significativas ( $P < 0.05$ ) entre el método de incubación de digestibilidad Daisy II - Incubator Ankom Technology con líquido ruminal y el método de digestibilidad enzimática. La digestibilidad promedio de la materia seca (MS) del ensilado de maíz (*Zea mays*) fue de 717 y 706 g/kg MS para el método de incubación con Daisy II - Incubator Ankom Technology con líquido ruminal y el método de digestibilidad enzimática, y para materia orgánica (MO) la digestibilidad promedio fue de 819 y 811 g/kg MO, respectivamente.

Se concluye que la técnica para la determinación *in vitro* de la digestibilidad de ensilados de maíz por el método de digestibilidad enzimática, no es una opción de elección al presentar diferencias significativas en comparación con el método digestibilidad Daisy II - Incubator Ankom Technology con líquido ruminal.

## Índice

Índice de cuadros .....	vi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA .....	3
2.1. Sistemas de producción de leche .....	3
2.2. Sistemas de producción de leche a pequeña escala en México .....	4
2.3. Alimentación del ganado en sistemas de producción de leche a pequeña escala	4
2.3.1. Ensilaje.....	5
2.4. Características del aparato digestivo de los rumiantes.....	8
2.5. Digestibilidad .....	10
2.5.1. Método de digestibilidad Daisy II - Incubator Ankom Techonology con líquido ruminal	11
2.5.2. Método de digestibilidad enzimática.....	12
III. JUSTIFICACIÓN.....	13
IV. HIPÓTESIS .....	14
V. OBJETIVOS .....	15
VI. MATERIAL.....	16
6.1. Material biológico.....	16
6.1.1. Animal.....	16
6.1.2. Forrajes .....	16
6.2. Material de laboratorio.....	16
VII. MÉTODO .....	16
7.1. Composición química de las muestras .....	17
7.2. Estimación de la digestibilidad .....	17
7.2.1. Digestibilidad con líquido ruminal método Daisy II - Incubator Ankom Techonology .....	17
7.2.2. Método de determinación enzimática.....	21
7.3. Análisis estadístico.....	23
VIII. LÍMITE DE ESPACIO .....	24

IX. LÍMITE DE TIEMPO.....	25
X. RESULTADOS.....	26
10.1. Composición bromatológica de los ensilados de maíz .....	26
10.2. Digestibilidad de la materia seca y de la materia orgánica de los ensilados de maíz .....	26
XI. DISCUSIÓN.....	28
XII. CONCLUSIONES.....	30
XIII. SUGERENCIAS.....	31
XIV. LITERATURA CITADA .....	32

## Índice de cuadros

	Página
Cuadro 1. Soluciones empleadas para el método de digestibilidad Daisy II - Incubator Ankom Techonology con líquido ruminal.....	18
Cuadro 2. Reactivos empleados para el método de digestibilidad enzimática por jarra de digestión.....	21
Cuadro 3. Composición química (g/kg MS) de ensilados de maíz.....	26
Cuadro 4. Digestibilidad de la materia seca y de la materia orgánica de los ensilados de maíz estimada con el método de Digestibilidad Daisy II - Incubator Ankom Techonology con líquido ruminal y con el método de Digestibilidad enzimática. ....	27

## I. INTRODUCCIÓN

La composición química de los alimentos permite estimar el contenido de los nutrientes; sin embargo, esto no determina la disponibilidad que tienen para los animales (Shimada, 2003). Se entiende por digestibilidad la porción de alimento ingerido que una vez digerido no es excretado, indicador a partir del cual es posible estimar la calidad nutricional de los alimentos (Tilley y Terry, 1963; Minson, 1990).

A lo largo de la historia se ha buscado desarrollar técnicas que permitan hacer una estimación de la digestibilidad de los alimentos. Si bien, se han logrado desarrollar métodos *in vivo* e *in vitro* exitosos, han sido estos últimos los que más difusión han tenido.

Determinar la digestibilidad por métodos *in vivo* involucra mayores costos por conceptos de manutención de los animales y alimentación; mientras que la determinación de la digestibilidad por métodos *in vitro* disminuye los costos acarreados por los conceptos antes mencionados, minimiza el uso de animales con fines de investigación y permite el análisis de un mayor número de muestras simultáneamente, dentro de las diferencias existentes entre la evaluación de la digestibilidad empleando líquido ruminal contra el uso de enzimas, estas últimas no tienen variaciones en los resultados como consecuencia del uso de animales (Brum *et al.*, 1999; Ruiz, 2011).

Tilley y Terry (1963) desarrollaron el método de digestibilidad usando líquido ruminal, técnica que hasta hoy en día sigue vigente, pero que por cuestiones relacionadas con el bienestar animal está siendo reconsiderada como técnica para estimar la digestibilidad.

El desarrollo de métodos de evaluación de la digestibilidad a través de compuestos sintéticos (enzimas) está obteniendo mayor difusión, estas técnicas buscan simular las condiciones y procesos que ocurren de forma natural en el interior del aparato digestivo.

Dentro del grupo de alimentos empleados en la producción de leche, los forrajes tienen un papel fundamental, tanto por su aporte nutricional, como por los menores costos requeridos para su producción.

Los costos de alimentación en las unidades de producción de leche, representan el 70% de los costos de producción (Espinoza-Ortega *et al.*, 2007), una alternativa para disminuir los costos de alimentación, es el uso de forrajes de calidad; la calidad de un forraje está determinada por la relación cantidad-nivel de consumo, la digestibilidad, los nutrientes contenidos y la capacidad en que estos son metabolizados (Giraldo *et al.*, 2007).

La fuente de alimentación de la lechería en sistemas de producción de leche en pequeña escala (SPLPE) principalmente es a base de forrajes, destacando los rastrojos, arvenses, praderas nativas y cultivadas, ensilados y henos (Castelán-Ortega *et al.*, 2008).

El maíz al ser un alimento con alto contenido de carbohidratos solubles y capacidad para disminuir el pH resulta ser una opción viable para ser ensilado y ser suministrado a los animales como fuente de energía (Khan *et al.*, 2012; Martínez-Fernández *et al.*, 2015); es importante conocer la digestibilidad de los ensilados de maíz producidos en los SPLPE, porque esta información nos permite estimar la proporción de nutrientes presentes que tienen potencial para ser absorbidos (Giraldo *et al.*, 2007).

El presente trabajo se enfocó en la comparación de la digestibilidad del ensilado de maíz por medio de dos técnicas *in vitro*, la de incubación con líquido ruminal, y mediante incubación con enzimas.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Sistemas de producción de leche

Odermatt *et al.* (1997) clasificaron los sistemas de producción en tres grupos: lechería intensiva del norte del país, lechería tropical y lechería en sistemas de producción de leche en pequeña escala.

La lechería intensiva del norte del país se caracteriza por tener unidades de producción grandes y altamente especializadas. La utilización de concentrados es muy alta en la alimentación del ganado, ocasionando altos costos de producción y una elevada producción láctea (Odermatt *et al.*, 1997).

La lechería tropical suele llamarse ganadería de doble propósito, se ubica en las costas del país y es un sistema semi especializado; presenta bajos índices de producción de leche (Odermatt *et al.*, 1997).

Lechería en SPLPE: se caracteriza por involucrar a distintos miembros de la familia durante todo el proceso de producción; los hatos van de 3 a 35 animales por unidad de producción; la fuente de alimentación del ganado es principalmente a base de forrajes, destacando los rastrojos, arvenses, praderas nativas y cultivadas, ensilados, henos y concentrados (Castelán-Ortega *et al.*, 2008), con producciones medias de 15 a 19 kg de leche/vaca/día (Hemme *et al.*, 2007). La producción ganadera a pequeña escala es una importante fuente de empleo y alimentos en muchas áreas rurales (CEPAL, FAO, IICA, 2009); por lo que los SPLPE son considerados como una opción para el desarrollo rural sostenible por las características y capacidad de adaptación a condiciones adversas (Arriaga-Jordán *et al.*, 1997).



## **2.2. Sistemas de producción de leche a pequeña escala en México**

A nivel mundial, México ocupa el lugar número 16, en producción de leche, con una producción de cerca de 11 millones 209 mil toneladas, contribuyendo con el 1.7% a la producción mundial de leche (SIAP, 2015).

Los SPLPE representan a nivel nacional el 37% de la producción nacional (FAO, 2010).

Dentro del país, los principales estados productores de leche son Jalisco (18%), Coahuila (12%), Durango (9%), Chihuahua (9%), Guanajuato (7%), Veracruz (7%), México (5%) e Hidalgo (4%) (SE, 2012).

El estado de México, se posiciona en el séptimo lugar a nivel nacional en la producción de leche, en comparación con el año pasado, el estado de México presentó una merma en su producción del 1.7%, con lo que actualmente se encuentra aportando el 4.1% a la producción anual (SIAP, 2014; SIAP, 2015).

## **2.3. Alimentación del ganado en sistemas de producción de leche a pequeña escala**

La disponibilidad de insumos para la alimentación del ganado, influye de manera directa en la rentabilidad de una unidad de producción de leche. Los costos de alimentación en las unidades de producción de leche, representan el 70% de los costos de producción (Espinoza-Ortega *et al.*, 2007).

De manera ideal, los alimentos proporcionados al ganado deben ser suficientes, y tener la calidad necesaria para satisfacer sus requerimientos nutricionales, además de que se produzcan a bajo costo (Rinne *et al.*, 2006; Espinoza-Ortega *et al.*, 2007).

Una alternativa para disminuir los costos de alimentación, es el uso de forrajes de alta calidad, dentro de los que se encuentra el ensilado de maíz (*Zea mays*), por lo

que es importante conocer las características particulares de este forraje (Arriaga-Jordán *et al.*, 2001; Martínez-Fernández *et al.*, 2015).

La alimentación de los SPLPE, se basa en forrajes, entre los que destacan las praderas nativas o cultivadas, forrajes conservados y esquilmos de los cultivos (Arriaga-Jordán *et al.*, 2002; Heredia-Nava *et al.*, 2007), adicional a estos, se suele suplementar la alimentación del ganado con alimento comercial; es importante resaltar, que la alimentación varía según la época del año y los recursos con que se cuenta.

Entre los forrajes cultivados que destacan en los SPLEP, se encuentra el maíz (*Zea mays*), que es empleado en diferentes presentaciones físicas: en forma de forraje fresco, ensilado, heno y rastrojo (Alfonso-Ávila *et al.*, 2012; Espinoza-Ortega *et al.* 2007).

### **2.3.1. Ensilaje**

Se define como ensilaje al proceso que tiene por objetivo la conservación de forrajes verdes, a través de un proceso de fermentación anaeróbica, con el cual se reduce la pérdida de materia seca y nutrientes (Dunière *et al.*, 2013; Weinberg *et al.*, 2013).

La ensilabilidad es la capacidad que tiene un forraje de tener una fermentación de calidad, depende de factores como el contenido de materia seca, los carbohidratos solubles y la capacidad tampón (Dunière *et al.*, 2013; Weinberg *et al.*, 2013; Martínez-Fernández *et al.*, 2015).

Olmos (2014) menciona que existen diez aspectos que determinan la calidad del ensilado de maíz (*Zea mays*): la variedad de maíz, el manejo agronómico que se haga al cultivo, el estimado de consumo diario para conocer el tamaño de la cara del silo, el porcentaje de materia seca, el tamaño de partícula y el proceso para obtenerla, el llenado del silo, la aplicación de inoculantes, el proceso de

compactación, el sellado del silo y el manejo de la cara del ensilado una vez abierto.

Las plantas contienen dos tipos de carbohidratos, los carbohidratos estructurales, que forman la pared celular y los carbohidratos no estructurales o de reserva, que contienen los nutrientes necesarios para el crecimiento de la planta. Dentro de los carbohidratos de reserva se encuentran el almidón y los carbohidratos solubles, los cuales son una importante fuente de energía tanto para la planta como para los microorganismos encargados de la fermentación en el proceso de ensilaje. La cantidad y calidad de carbohidratos solubles de una planta, varían entre especies vegetales, siendo más abundantes en las gramíneas que en leguminosas y la madurez de la planta, disminuyendo con el paso del tiempo (Khan *et al.*, 2012; Dunière *et al.*, 2013; Martínez-Fernández *et al.*, 2015).

La capacidad tampón se define como la resistencia que tienen las plantas para modificar su pH, capacidad que se ve influenciada por los carbohidratos solubles (Martínez-Fernández *et al.*, 2015).

El objetivo que tiene el uso de aditivos durante el proceso de ensilaje es mejorar las características del producto final. Existen dos grupos en los que se clasifican los aditivos, los reductores y los estimuladores de la fermentación. El primer grupo se caracteriza por inhibir el desarrollo de fermentaciones indeseadas, en este grupo entran los ácidos minerales y ácidos orgánicos; en el segundo grupo entran los inóculos bacterianos, enzimas, nutrientes y absorbentes que como su nombre lo indica favorecen la fermentación (Contreras-Govea *et al.*, 2011; Dunière *et al.*, 2013; Martínez-Fernández *et al.*, 2015).

Una vez que las plantas se encuentran con el contenido necesario de materia seca para tener un ensilado de calidad, y que estas son cortadas, comienzan a ocurrir cambios. Si bien la actividad celular continúa por determinado tiempo, estas comienzan a hacer uso de las fuentes de energía disponibles, hasta que el oxígeno es completamente consumido, las células dependientes de oxígeno se desactivan. Sin embargo, los microorganismo facultativos del CO<sub>2</sub> son capaces de

mantenerse activos y generar una fermentación láctica y con ello la disminución del pH (Khan *et al.*, 2012; Dunière *et al.*, 2013; Weinberg *et al.*, 2013).

La desactivación de las células vegetales favorece la proliferación de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, el desarrollo de estas bacterias se incrementa en temperaturas que van de los 18 a los 25°C y cesa al llegar a un pH de 4.2, este proceso es conocido como fase acética (Khan *et al.*, 2012; Dunière *et al.*, 2013; Martínez-Fernández *et al.*, 2015).

Una vez concluida la fase acética, comienza la fase láctica, este proceso está a cargo de bacterias lácticas con la capacidad de transformar los carbohidratos solubles en ácido láctico. Es necesario que exista un pH de 3 a 4 y anaerobiosis para que este proceso sea llevado a cabo de forma exitosa. Concluido este proceso el forraje puede llamarse ensilado (Khan *et al.*, 2012; Dunière *et al.*, 2013; Weinberg *et al.*, 2013; Martínez-Fernández *et al.*, 2015.).

Existen algunas alteraciones durante el proceso de ensilaje que deterioran la calidad de un ensilado; la aparición de bacterias del género *Clostridium* es una de las más importantes ya que favorece una fermentación butírica, en condiciones de pH mayores a 4, con lo que se favorece la putrefacción del forraje y el desarrollo de toxinas dañinas para el ganado. Una de las causas de este problema es la deficiente compactación del forraje (Cheli *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013).

Otro factor que determina el crecimiento del género *Clostridium*, es el contenido de materia seca en el ensilado. Debido a que en condiciones de baja humedad tienen un mayor crecimiento. Cuando el porcentaje de materia seca es de 20% o menos, los clostridios incrementan su actividad, mientras que con un 30% de materia seca su crecimiento se ve limitado (Martínez-Fernández *et al.*, 2015). Por su parte Olmos (2014) sugiere que cuando se tiene de un 30 a 38% de materia seca la calidad del ensilado es mayor.

El maíz (*Zea mays*) es considerado el forraje óptimo para ensilar, debido principalmente a su alto contenido de carbohidratos y su capacidad para disminuir

el pH (14.8-35.1 meq NaOH/100 g MS) (Nkosi *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2012; Martínez-Fernández *et al.*, 2015).

## **2.4. Características del aparato digestivo de los rumiantes**

La rumia es una de las características que junto con la conformación del estómago, distingue a un animal rumiante de un no rumiante. El rumen, a diferencia del estómago de otros animales, se encuentra integrado por cuatro compartimentos: rumen, retículo, omaso y abomaso; funcionalmente se considera al rumen y al retículo como una sola unidad: Complejo Retículo-Rumen, sitio donde ocurre la fermentación y asimilación de nutrientes (Sisson y Grossman, 1982; Relling y Mattioli, 2003).

La fermentación ruminal es resultado de la acción metabólica de los microorganismos que viven en simbiosis en el rumen. Los microorganismos del rumen son esencialmente bacterias y protozoarios, estas poblaciones entran al organismo del recién nacido por el contacto con animales adultos, la ingesta de alimentos sólidos y el consumo de agua. En los rumiantes, la degradación de los sustratos moleculares por acción de los microorganismos se realiza por hidrólisis enzimática (Relling y Mattioli, 2003; Contreras y Noro, 2010).

El rumen ocupa cerca del 75% de la cavidad abdominal. La capacidad ruminal varía de acuerdo a la raza; sin embargo de forma general se habla de una capacidad de 100 a 150 litros en adultos, la capacidad del complejo retículo-rumen va de 110 a 235 litros y la del abomaso es de 10 a 20 litros (Contreras y Noro, 2010).

De acuerdo a Relling y Mattioli (2003) para que se realice el proceso de fermentación por acción de los microorganismos ruminales, es necesario que en el complejo retículo-rumen se mantengan en condiciones específicas de:

- a. Anaerobiosis. La ausencia de oxígeno es necesaria para que los microorganismos, que viven en simbiosis en el rumen, obtengan energía a través de la vía glucolítica.
- b. Aportes de nutrientes. La nutrición de los rumiantes es dependiente de la nutrición de la población de microorganismos ruminales, se debe alimentar a los microorganismos para que estos alimenten al rumiante.
- c. Eliminación de los productos de desecho del metabolismo ruminal que son los ácidos grasos volátiles (AGV), gases y alimento no digerido. Si se acumula de forma excesiva los AGV e  $H^+$ , se produce un incremento en la presión osmótica del rumen, ocasionando la disminución del pH. Los AGV son sustraídos a través de la absorción de las paredes del rumen, mientras que el  $H^+$  se elimina en forma de metano. Los gases producto de la fermentación ruminal, especialmente  $CO_2$  y  $CH_4$ , se eliminan a través del eructo. El alimento no digerido continúa el tránsito por el resto del aparato digestivo, hasta eliminarse vía fecal.
- d. pH. El rango de pH que necesitan los microorganismos ruminales para un desarrollo normal va de 5.5 a 6.9, los cambios extremos en el pH favorecen el desarrollo de microorganismos que alteran el funcionamiento del rumen.
- e. Presión osmótica. La presión osmótica del contenido ruminal es de 300 mOsm/l, con lo que se evita la pérdida descontrolada desde el líquido intersticial hacia el rumen o de forma inversa.
- f. Temperatura. A fin de favorecer el crecimiento bacteriano, la temperatura ruminal se mantiene entre 38 y 42°C.

Los rumiantes han desarrollado un aparato digestivo que les permite aprovechar forrajes ricos en celulosa, hemicelulosa y lignina, gracias a la presencia de microorganismos. La población microbiana del rumen está integrada por bacterias, protozoarios, hongos, bacteriófagos y ocasionalmente levaduras; manteniendo una relación de sinergismo con los rumiantes (Carrillo, 2003; Yang *et al.*, 2004; Carmona *et al.*, 2005).

Sin embargo, los rumiantes carecen de enzimas celulolíticas propias, que les permitan obtener glucosa para la síntesis de piruvato y la formación de AGV; para lograr esto es necesario el crecimiento y multiplicación de los microorganismos ruminales (Carrillo, 2003; Contreras y Noro, 2010).

El número de bacterias varía entre  $10^{10}$  a  $10^{11}$  por mililitro de líquido ruminal. Esta concentración se ve afectada por el pH ruminal y la dieta. La flora celulolítica se desarrolla mejor en pH de 6.0 a 6.9 y la amilolítica a pH de 5.5 a 6.0 (Relling y Mattioli, 2003; Wright y Klieve, 2011). Dentro del grupo de los anaerobios estrictos destacan las bacterias celulolíticas y hemicelulolíticas (encargadas de degradar y fermentar los hidratos de carbono estructurales de la pared celular), bacterias aminolíticas (fermentan los hidratos de carbono de reserva de granos, almidón), bacterias sacarolíticas (fermentan carohidratos simples, azúcares vegetales), bacterias lactolíticas (degradan el lactato), bacterias lipolíticas (degradan las grasas), bacterias proteolíticas (degradan las proteínas), bacterias ureolíticas (hidrolizan la urea) y bacterias metanogénicas (producen metano) (Carrillo, 2003; Relling y Mattioli, 2003; Wright y Klieve, 2011).

Los protozoarios se desarrollan a pH superior a 6, se encuentran en menor número en comparación con las bacterias, se habla de  $10^4$  a  $10^6$  por mililitro de líquido ruminal. A diferencia de las bacterias, los protozoarios son capaces de sintetizar proteína a partir de nitrógeno no proteico (NNP) (Wright, 2011).

Los hongos representan cerca del 8% de la biomasa ruminal. Son de gran importancia para la actividad celulolítica, se habla de  $10^3$  a  $10^6$  por mililitro de líquido ruminal (Relling y Mattioli, 2003; Wright y Klieve, 2011).

## **2.5. Digestibilidad**

La composición química de los alimentos permite estimar el contenido de los nutrientes, sin embargo, esto no determina la disponibilidad que tienen para los animales (Shimada, 2003).

La estimación de la degradabilidad y la digestibilidad de los alimentos permiten establecer el valor nutritivo que tienen, y ayudar a formular dietas balanceadas para los animales (Bochi-Brum *et al.*, 1999).

Se entiende por digestibilidad la porción de alimento ingerido que desaparece en el tracto digestivo o en un proceso de laboratorio, como consecuencia de la solubilización y ataque de los microorganismos ruminales (Tilley y Terry, 1963; Minson, 1990); la degradabilidad se refiere a cantidad de alimento que se descompone en sus elementos, como consecuencia de procesos biológicos o químicos (Giraldo *et al.*, 2006).

La digestibilidad de un alimento puede ser estimada por técnicas *in vivo* como *in vitro*. Las pruebas *in vivo* se caracterizan por ser métodos invasivos para los animales, ser costosas como consecuencia de la manutención de los animales y tardadas por el tiempo y número de muestras que se pueden incubar a la vez. Las pruebas *in vitro* pueden emplear inóculos microbiológicos y enzimas, por lo que resultan menos laboriosas, costosas y rápidas, comparadas con las pruebas *in vivo* (Church y Pond, 2003).

El presente trabajo se enfocó en la comparación de dos técnicas *in vitro*, digestibilidad mediante incubación con líquido ruminal y digestibilidad mediante incubación con enzimas.

### **2.5.1. Método de digestibilidad Daisy II - Incubator Ankom Technology con líquido ruminal**

El principio de este método es simular la fermentación del rumen en condiciones *in vitro*, lo que se logra a través de la mezcla de soluciones compuestas por minerales, fuentes de nitrógeno y agentes reductores que ayudan a mantener la anaerobiosis característica de este proceso, más la adición de líquido ruminal. Esta mezcla se incuba por 48 horas a temperatura constante de  $39.2 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ , con agitación circular constante (Daisy II - Incubator Ankom Technology)



### 2.5.2. Método de digestibilidad enzimática

Los métodos de digestibilidad con uso de enzimas, han incrementado su aceptación en el campo de la nutrición porque han demostrado tener resultados confiables para estimar el valor nutritivo de alimentos, principalmente de forrajes (Riveros y Argamentarúa, 1987).

Jones y Hayward en 1973 desarrollaron el método de digestión mediante pepsina-celulasa, empleando una mezcla comercial de celulasa, posteriormente en 1975, incluyeron un pretratamiento con pepsina mejorando la semejanza de estos valores con los obtenidos en pruebas *in vivo*.

El uso de enzimas potencializa la estimación de la digestión ruminal; sin embargo, el resultado se ve afectado por variaciones en el pH, tiempo de incubación, condición de saturación de las enzimas y la temperatura (Villalobos *et al.*, 2000).

La técnica propuesta por Riveros y Argamentarúa (1987), al igual que en la propuesta por Tilley y Terry (1963) busca simular condiciones de incubación semejantes a las condiciones *in vivo*, sin embargo tiene como particularidad un pre-tratamiento de las muestras con solución Fibra Detergente Neutro (FDN) para romper las paredes celulares, a continuación son incubadas con una mezcla comercial de enzimas (Cellulase Onozuka R-10 extraída de cepas de "*Trichoderma viridae*") que contiene celulasa 1.0U/mg, pectinasa, 0.4U/mg,  $\alpha$ -amilasa 0.6U/mg y proteasas 0.01U/mg.

### III. JUSTIFICACIÓN

La evaluación de la calidad de los alimentos permite balancear dietas que satisfagan las necesidades nutrimentales de los animales y que tengan una producción satisfactoria, aspectos que son fundamentales para que una producción de cualquier tipo sea rentable; con base en la necesidad de conocer esta información se desarrollaron distintos métodos para determinar la digestibilidad de los alimentos.

Si bien por más de cuatro décadas el uso de animales fistulados para la extracción de líquido ruminal ha sido una práctica común que ha contribuido a la evaluación de la digestibilidad de los alimentos, hoy en día y como resultado de la restricción del uso de animales con fines de experimentación, es necesario perfeccionar métodos que permitan conocer la digestibilidad de los alimentos sin que sea necesario el uso de animales; la determinación de la digestibilidad con enzimas es una opción viable que elimina el uso de animales, disminuye el tiempo requerido para este procedimiento y elimina costos por conceptos de alimentación y manejo de animales donadores.

#### IV. HIPÓTESIS

Existen diferencias en los valores de la digestibilidad de la materia seca (MS) y la materia orgánica (MO) de ensilados de maíz (*Zea mays*) producidos en la zona lechera del municipio de Aculco, Estado de México, entre el método Daisy II - Incubator Ankom Technology de fermentación *in vitro* con uso de líquido ruminal y el método de digestibilidad enzimática (con Onozuka R-10).

## V. OBJETIVOS

- a). Estimar la digestibilidad en muestras de ensilados de maíz (*Zea mays*) con dos métodos *in vitro*: Daisy II - Incubator Ankom Technology de fermentación con uso de líquido ruminal y el método de digestibilidad enzimática.
- b). Evaluar si existen diferencias estadísticas entre el método Daisy II - Incubator Ankom Technology de fermentación con uso de líquido ruminal y el método de digestibilidad enzimática en ensilados de maíz (*Zea mays*).
- c). Determinar la composición química de ensilados de maíz (*Zea mays*) empleados en la alimentación de sistemas de producción de leche a pequeña escala.

## **VI. MATERIAL**

### **6.1. Material biológico**

#### **6.1.1. Animal**

Se utilizó un bovino, hembra de 500 kg fistulada en rumen, de la posta zootécnica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México.

#### **6.1.2. Forrajes**

Se analizaron 40 muestras de ensilado de maíz, recolectadas de 2011 a 2014 en el municipio de Aculco, Estado de México; empleados para la alimentación de vacas lecheras en sistemas de producción de leche en pequeña escala.

### **6.2. Material de laboratorio**

Las muestras recolectadas fueron procesadas en el laboratorio de análisis de alimentos y forrajes del Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales (ICAR) de la Universidad Autónoma del Estado de México, utilizando el material y reactivos necesarios para realizar el análisis químico de acuerdo a los procedimientos establecidos con uso de los equipos del laboratorio.

## **VII. MÉTODO**

Las muestras de ensilado de maíz (*Zea mays*) fueron secadas en estufa de aire forzado para su desecación de 60°C por 48 horas, aunque la destilación con

tolueno y el secado al vacío (AOAC, 1960) son las técnicas de desecación recomendadas para este tipo de muestras para evitar una subestimación de la materia seca por la pérdida de ácidos grasos volátiles y alcoholes, sin embargo, diversos autores (De Boever *et al.*, 1997; Heredia-Nava *et al.*, 2007; Weinberg y Chen *et al.*, 2013) han realizado la desecación de muestras de ensilado a esta temperatura.

Posteriormente las muestras de ensilado de maíz (*Zea mays*) fueron molidas en un molino Pulvex y tamizadas en una malla de 2 mm.

De acuerdo a lo descrito en el Manual operador del Daisy II - Incubator Ankom Technology, se utilizaron bolsas filtro (F57) con un tamaño de poro de 5 µm, se agregó 0.5g de muestra a cada bolsa para la digestibilidad con líquido ruminal y 1.0g para la digestibilidad enzimática de acuerdo a lo descrito en la técnica propuesta por Riveros y Argamentarí (1987).

## **7.1. Composición química de las muestras**

Las determinaciones que se realizaron a cada una de las muestras fueron: cenizas (CN) mediante los protocolos de la AOAC (1990), proteica cruda (PC) por el método Kjeldahl ( $N \times 6.25$ ), fibra neutro detergente (FND), fibra ácido detergente (FAD) mediante Ankom Technology (2005). Se determinó la energía metabolizable (EM)  $((0.156) (\text{digestibilidad } in vitro) - 0.535)$  de acuerdo a Macle *et al.* (1999).

## **7.2. Estimación de la digestibilidad**

### **7.2.1. Digestibilidad con líquido ruminal método Daisy II - Incubator Ankom Technology**

El principio de este método es establecer condiciones de incubación semejantes a las condiciones *in vivo*. Se lleva a cabo en 4 jarras de digestión con capacidad de

2 litros, a las cuales se le adiciona dos soluciones (A y B), compuestas por minerales, fuentes de nitrógeno y agentes reductores, en cada jarra de digestión fueron colocados dos litros de soluciones con las siguientes proporciones: 1.330 L de solución A y 266 ml de solución B, esto para ajustar un pH de 6.8 y 400 mL de líquido ruminal; al concluir la incubación de 48 horas se añade una tercera solución (C); la composición de las soluciones es la siguiente (Daisy II - Incubator Ankom Technology):

**Cuadro 1. Soluciones empleadas para el método de digestibilidad Daisy II - Incubator Ankom Technology con líquido ruminal.**

<b>Solución</b>	<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad g/L</b>
<b>Solución A</b>	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ Fosfato de potasio monobásico	10.0
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ Sulfato de magnesio	0.5
	$\text{NaCl}$ Cloruro de sodio	0.5
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ Cloruro de calcio	0.1
	$\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ Urea	0.5
<b>Solución B</b>	$\text{Na}_2\text{CO}_3$ Carbonato de sodio	15.0
	$\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ Sulfuro de sodio	1.0
	$\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$ Lauril Sulfato de Sodio	30.0

<b>Solución C (Fibra Neutro Detergente)</b>	$C_{10}H_{14}N_2Na_2$ Sal disódica etileno diamino tetra acetato dihidrogenado	18.61
	$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ Tetraborato de Sodio decahidratado	6.81
	$Na_2HPO_4$ Fosfato de sodio dibásico anhidro	4.56
	$C_6H_{14}O_4$ Trietilenglicol	10.0

1. Previa utilización de las bolsas de incubación, estas se colocaron en acetona por 3 a 5 minutos, y se dejaron secar a temperatura ambiente.
2. Se pesó cada bolsa de filtro F57 y se registró el peso (W1).
3. Se puso a cero la balanza y se pesó 0.5 g de muestra (W2) directamente en la bolsa de filtro.
4. La bolsa fue sellada térmicamente.
5. Una vez realizadas las soluciones, se colocaron en baño de agua hasta que alcanzaron una temperatura de  $39.2 \pm 0.5^\circ C$ .
6. Previa extracción del líquido ruminal, se precalentaron dos termos con capacidad de 1L con agua a  $39^\circ C$ , el líquido ruminal se colectó de una vaca adulta fistulada, de raza Holstein con un peso promedio de 500 kg. La recolección del líquido ruminal se realizó en las primeras horas de la mañana y se filtró a través de tela manta de cielo, y se llevó al laboratorio.
7. En el laboratorio, se mezcló en cada jarra de digestión la solución A, la B y el líquido ruminal en las proporciones antes mencionadas.
8. Se colocaron 20 muestras y un blanco (bolsa sin muestra sellada) en cada jarra de digestión.
9. Se saturó con  $CO_2$  por 5 minutos cada una de las jarras de digestión.



10. Se colocaron las jarras de digestión en el incubador Daisy previamente calentado a  $39.2 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  y se encendieron los interruptores de calor y agitación, se inició la incubación por 48 horas.
11. Transcurridas las 48 horas se desechó el líquido y las muestras se enjuagaron con agua fría.
12. Se secaron las muestras en una estufa de aire forzado a  $102 \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 4 horas y se pesaron las muestras.
13. Posteriormente se procesaron las muestras en el analizador de fibras (Ankom 200), usando la solución C (FND), siguiendo las indicaciones de Ankom Technology (2005).
14. Después de terminar el proceso en el equipo Ankom 200, las muestras fueron remojadas durante 5 minutos en acetona, transcurrido este tiempo se sacaron las muestras.
15. Una vez que se evaporó completamente la acetona de las muestras, se colocaron en la estufa de aire forzado a  $102 \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 4 horas.
16. A continuación las muestras fueron pesadas.

La fórmula empleada para estimar la digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS), y de la FND, se realiza de acuerdo a las especificaciones de Daisy II - Incubator Ankom Technology:

$$\text{DIVMS} = 100 - (W_3 - (W_1 \times C_1) / (W_2)) \times 100$$

Dónde:

$W_1$ =Peso de la bolsa

$W_2$ =peso de la muestra

$W_3$  (peso de la muestra seca)= incubación y FDN

$C_1$  = Peso de la bolsa corregida (peso del blanco final/peso del blanco inicial)

17. Finalmente las muestras fueron colocadas en una mufla a  $550^{\circ}\text{C}$  durante 3 horas, para determinar el contenido de cenizas y calcular la materia orgánica residual, la digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica (DIVMO)

se calculó por diferencia de peso entre la materia orgánica inicial menos la materia orgánica residual.

### 7.2.2. Método de determinación enzimática

La técnica propuesta por Riveros y Argamentarí (1987), al igual que en la propuesta por Tilley y Terry (1963) busca simular condiciones de incubación semejantes a las condiciones *in vivo*, sin embargo tiene como particularidad un pre-tratamiento de las muestras con solución Fibra Detergente Neutro (FDN) para romper las paredes celulares.

Se llevó a cabo en 4 jarras de digestión con capacidad de 2 litros, a las cuales se le adicionó dos soluciones (A y B), cloranfenicol y Cellulase Onozuka R-10.

Para realizar la primera solución (A) se hizo la disolución de acetato sódico trihidratado en 1L de agua destilada a 40°C, para la solución B se disolvieron 5.9 mL de ácido acético glacial en un litro de agua destilada a 40°C, esta mezcla se realizó para cada una de las jarras de digestión.

#### Cuadro 2. Reactivos empleados para el método de digestibilidad enzimática por jarra de digestión.

Reactivo	Cantidad g
Cloranfenicol	0.1
Cellulase Onozuka R-10	1.0
Acetato sódico trihidratado (Solución A)	13.6
Ácido acético glacial 100% pureza (Solución B)	5.9

1. Previa utilización de las bolsas de incubación, estas se colocaron en acetona por 3 a 5 minutos, y se dejaron secar a temperatura ambiente.
2. Se pesó cada bolsa de filtro F57 y se registró el peso.

3. Se taro la balanza y se pesó 1.0 g de muestra directamente en la bolsa de filtro.
4. La bolsa se selló térmicamente.
5. Las muestras se procesaron en el analizador de fibras (Ankom 200), usando la solución C (FND), siguiendo las indicaciones de Ankom Technology (2005).
6. Después de terminar el proceso en el equipo Ankom 200, las muestras se remojaron durante 5 minutos en acetona, transcurrido este tiempo se sacaron las muestras.
7. Una vez que se evaporo completamente la acetona de las muestras, se metieron a una estufa de aire forzado a  $102 \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 4 horas.
8. A continuación las muestras fueron pesadas.
9. Una vez realizadas las soluciones, se añadió paulatinamente la solución B a la solución A, hasta que se obtuvo un pH final entre 4.6 - 4.7.
10. A la mezcla de solución A y B, se añadió 1.0 gramo de Cellulase Onozuka R-10 y 0.1 gramos de cloranfenicol.
11. Se colocaron la mezcla de solución A y B, Cellulase Onozuka R-10 y cloranfenicol, junto con un máximo de 18 muestras y un blanco (bolsa sin muestra sellada) en cada jarra de digestión.
12. Se ubicaron las jarras de digestión en el incubador Daisy previamente calentado a  $40^{\circ}\text{C}$ , se encendieron los interruptores de calor y agitación, se inició la incubación por 24 horas.
13. Transcurridas las 24 horas se desechó el líquido y se realizaron 5 enjuagues con 2L agua destilada a una temperatura de  $60^{\circ}\text{C}$
14. Posteriormente se colocó cada muestra en charolas de aluminio en la estufa de aire forzado a  $102 \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 12 h.
15. Trascurridas las 12 horas se retiraron las charolas de la estufa de aire forzado, y se colocaron por 30 minutos en un desecador.
16. Después fueron pesadas, se anotó como: Tara + Residuo de la incubación.

17. Las charolas de aluminio fueron llevadas a la mufla a una temperatura de 550°C por 3 horas. Terminada la incineración las charolas de aluminio se colocaron en desecadores.
18. Una vez que las charolas de aluminio se enfriaron fueron pesadas, se anotó como: Tara + Cenizas de incubación.

La fórmula empleada para la obtención de la digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica (DIVMO), fue:

$$\text{DIVMO} = \frac{\text{MO inicial} - ((\text{Tara} + \text{Residuos de incubación}) - (\text{tara} + \text{cenizas de incubación})) * 100}{\text{MO inicial}}$$

Dónde:

MO inicial = materia orgánica inicial

$$\text{MO inicial} = \frac{(\text{materia seca} - \text{cenizas})}{100} * \text{peso muestra (g)}$$

### 7.3. Análisis estadístico

Los resultados se analizaron de acuerdo a un diseño de muestras apareadas mediante una prueba “t” de Student (Scheffler, 1979), utilizando la media de las diferencias entre ambas muestras.

El método de muestras apareadas se recomienda cuando a una misma unidad experimental se le aplican dos tratamientos (Scheffler, 1979).

$$t = \frac{\text{Diferencia de las medias}}{\text{EEDM}}$$

Dónde:

EEDM = Error estándar de la diferencia de las medias.

## VIII. LÍMITE DE ESPACIO

Las muestras de ensilado de maíz (*Zea mays*) fueron recolectadas en unidades de producción de sistemas de producción de leche a pequeña escala (SPLPE) localizadas en el municipio de Aculco, en el noroeste del Estado de México, con la cabecera municipal ubicada en las coordenadas 20° 06' de latitud norte y 99° 50' de longitud oeste, la altitud de la cabecera del municipio alcanza 2,440 metros sobre el nivel del mar (INEGI, 2009).

El trabajo de laboratorio se realizó en los laboratorios del Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales (ICAR) de la Universidad Autónoma del Estado de México, ubicado en Campus El Cerrillo, km. 3 Carretera a Tlachaloya, Toluca, Estado de México.

## IX. LÍMITE DE TIEMPO

El experimento comenzó en julio de 2015, realizándose en el siguiente orden:

- Mayo a Junio: capacitación de trabajo y uso del material de laboratorio y realización de la revisión de literatura.
- Julio: colección, conservación y procesado de muestras.
- Agosto: Análisis de laboratorio. Determinación de la digestibilidad Daisy II - Incubator Ankom Techonology y método de digestibilidad enzimática.
- Septiembre: Análisis estadísticos, interpretación de los resultados y escritura de la tesis.

## X. RESULTADOS

### 10.1. Composición bromatológica de los ensilados de maíz

Los resultados de la composición química de los ensilados de maíz se presentan en el Cuadro 3.

**Cuadro 3. Composición química (g/kg MS) de ensilados de maíz.**

Ensilados de maíz	Proteína Cruda	Fibra Detergente Neutro	Fibra Detergente Acido	Materia Orgánica	Energía Metabolizable MJ kg MS
	78±5.75	496±55.28	222±14.98	919.3±26.69	10±.19

### 10.2. Digestibilidad de la materia seca y de la materia orgánica de los ensilados de maíz

Los resultados de digestibilidad de la materia seca (DMS) de los ensilados de maíz se presentan en el Cuadro 4; la información muestra que se encontraron diferencias ( $P<0.05$ ) en la DMS entre los dos métodos *in vitro* usados. Con el método Daisy II con liquido ruminal la DMS fue 11 g (1.53 %) mayor lo que implica sólo una pequeña diferencia a favor de este método *in vitro*.

Los resultados de digestibilidad de la materia orgánica (DMO) de los ensilados de maíz se presentan en el Cuadro 4; de forma similar se observa que hubo diferencias ( $P<0.05$ ) entre las técnicas *in vitro* usadas.

Con el método Daisy II con liquido ruminal la DMO fue 8.23 g (1.54 %) mayor lo que implica sólo una pequeña diferencia a favor de este método *in vitro*.

**Cuadro 4. Digestibilidad de la materia seca y de la materia orgánica de los ensilados de maíz estimada con el método de Digestibilidad Daisy II - Incubator Ankom Techonology con líquido ruminal y con el método de Digestibilidad enzimática.**

<b>Métodos para estimar la digestibilidad</b>	<b>Digestibilidad MS (g/kg MS)</b>	<b>Digestibilidad MO (g/kg MO)</b>
<b>Digestibilidad Daisy II - Incubator Ankom Techonology con líquido ruminal</b>	717	811
<b>Digestibilidad enzimática</b>	706	843
<b>EEDM<sup>1</sup></b>	0.198	0.119
<b>Probabilidad</b>	<i>P</i> <0.05	<i>P</i> <0.05

<sup>1</sup>EEDM: Error estándar de la diferencia de las medias.



## XI. DISCUSIÓN

La composición química en cuanto al contenido de proteína, fibras, cenizas y energía del ensilado son similares a los resultados obtenidos por otros autores (De Boever *et al.*, 1997; Heredia-Nava *et al.*, 2007; Weinberg y Chen *et al.*, 2013).

Diversos autores (Richards *et al.*, 1995; Rinne *et al.*, 2006; Ruiz *et al.*, 2011) coinciden en que el método de estimación de la digestibilidad basado en la técnica propuesta por Tilley y Terry (1963) con líquido ruminal aporta resultados confiables. Sin embargo, los resultados obtenidos con este método pueden verse afectados por diversos factores como son la especie animal, el consumo de materia seca y especialmente la dieta (Holden, 1999).

La dieta ideal de un animal donador de líquido ruminal, debe ser rica en forrajes, por lo menos dos terceras partes, y con una baja cantidad concentrado, a fin de que exista una mayor cantidad de bacterias y por lo tanto de enzimas celulolíticas que realizan una mejor fermentación de forraje (Tilley y Terry, 1963; Holden, 1999).

Tilley y Terry (1963) señalan que para que los resultados de digestibilidad con el uso de líquido ruminal sean confiables se debe tener un control estricto de la temperatura, pH y anaerobiosis del líquido ruminal durante el desarrollo de la técnica, además de evitar la fuga de gas durante la incubación.

Terry *et al.* (1978) y Jancík *et al.* (2011) mencionan que el uso de enzimas para estimar la digestibilidad resulta reproducible, exacto, rápido, cómodo y de fácil estandarización.

Flores *et al.* (2003) reportan que al realizar un pre tratamiento con pepsina o con solución fibra detergente neutro a las muestras que serán incubadas con celulosa para estimar la digestibilidad, se logra obtener mayor correlación con los resultados obtenidos con el método que emplea líquido ruminal.

Flores *et al.* (2003), Ruiz (2011) y Kowalski *et al.* (2014) coinciden en que el uso del método enzimático permite subsanar las restricciones de las comisiones de

ética de los organismos internacionales y nacionales de investigación con relación al uso de animales, eliminar el efecto de los animales y disminuir la mano de obra. La obtención de menores valores de digestibilidad con el método enzimático en comparación con el uso de líquido ruminal puede ser el resultado de factores de la concentración de las enzimas, la duración de la incubación, el pre tratamiento dado y el tipo de lavado post incubación que reciben las muestras (Ruiz, 2011; Barchiesi-Ferrari *et al.*, 2011).

Eun *et al.* (2007) mencionan que además del tiempo de incubación, el tipo de enzimas empleadas tiene efectos importantes sobre los resultados de digestibilidad.

Rinne *et al.* (2006) mencionan que la falta de uniformidad en los métodos de estimación de la digestibilidad con enzimas, complica la semejanza en los resultados obtenidos, dificultando la formulación de conclusiones generales.

De Boever *et al.* (1997) encontraron que la digestibilidad mediante el uso de enzimas en ensilados de maíz se ve afectada cuando el forraje es cortado en una etapa fenológica avanzada y contiene una mayor cantidad de materia seca.

Barchiesi-Ferrari *et al.* (2011) al usar la mezcla comercial de enzimas Cellulase Onozuka R-10, encontraron resultados similares a los del presente trabajo, cuando se usó una concentración de enzimas similar a la aquí empleada, una incubación de 24 horas y lavado post incubación. Sin embargo, los resultados fueron distintos al aumentar la incubación a 48 horas, añadir una mayor cantidad de enzimas y realizar lavados post incubación con acetona.

## **XII. CONCLUSIONES**

Los resultados de la digestibilidad estimada a través del método de digestibilidad Daisy II - Incubator Ankom Technology con líquido ruminal y con el método enzimático de la MS y la MO, presentan consistencia y repetitividad entre muestras.

Con base en los resultados obtenidos, se acepta la hipótesis alternativa, que establece que existen diferencias entre los resultados obtenidos con el método de digestibilidad con líquido ruminal y con el método enzimático para estimar la digestibilidad de ensilados de maíz.

Entre las ventajas que presenta el método de digestibilidad Daisy II - Incubator Ankom Technology con líquido ruminal, destacan la confiabilidad, repetitividad y la posibilidad de analizar un gran número de muestras simultáneamente, por lo que el método de digestibilidad con líquido ruminal es una opción viable para estimar la digestibilidad de ensilados de maíz.

### **XIII. SUGERENCIAS**

Con base en los resultados obtenidos, se recomienda continuar usando el método de digestibilidad Daisy II - Incubator Ankom Technology con líquido ruminal para estimar la digestibilidad de ensilados de maíz en el Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales (ICAR).

En este trabajo, las diferencias entre los dos métodos son mínimas, de 1.5% menos para MS y 1% menos para MO; aunque las diferencias son estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ). Lo anterior habla de lo consistente de ambos métodos al presentar una variación aleatoria muy pequeña.

Ante las pequeñas diferencias encontradas, se sugiere continuar la evaluación del método de digestibilidad enzimática para la determinación de la digestibilidad *in vitro*, tanto con una base mayor de muestras de ensilado de maíz como con otras especies de forrajes y concentrados para poder tener la valoración completa de este método.

Se propone realizar un estudio similar con diferente tiempo de incubación, concentración y lavado post incubación, a fin de evaluar el efecto de esas variables en los resultados.

#### XIV. LITERATURA CITADA

- Alfonso-Ávila AR, Wattiaux MA, Espinoza-Ortega A, Sánchez-Vera E, Arriaga-Jordán CM. (2012): Local feeding strategies and milk composition in small-scale dairy production systems during the rainy season in the highlands of Mexico. *Tropical Animal Health and Production*, 44: 637-644.
- ANKOM Technology. (2005): Procedures (for NDF and ADF). <http://www.ankom.com/> (20 de agosto de 2015).
- ANKOM Technology. (2006). *In vitro True Digestibility using the Daisy II Incubator*. ANKOM TECHNOLOGY. <https://www.ankom.com/> (20 de agosto de 2015).
- AOAC. Official methods for analysis of the Association of Official Analytical Chemists. (1990): Association of Official Analytical Chemists. 15th ed, Washington DC.
- Araiza-Rosales E, Delgadool-Licon E, Carrete-Carreón FO, Medrano-Roldán H, Solís-Soto A, Murillo-Ortiz M, Haubi-Segura C. (2013): Avances en Investigación Agropecuaria, 17(2):79-96.
- Arriaga-Jordán CM, Albarran-Portillo B, García-Martínez A, Castelán-Ortega OA. (2002): On-farm comparison of feeding strategies based on forages for small-scale dairy production systems in the highlands of central Mexico. *Experimental Agriculture*, 38: 375-388.
- Arriaga-Jordán CM, Espinoza O. A., Castelán O. O., Rojo H., Guadarrama J. L., Valdez M., Albarrán P. B. (1997): Resultados en el mejoramiento participativo de sistemas de producción de leche en pequeña escala en el valle de Toluca, En: Rivera H. G., Arellano H. A., González D. L., y Arriaga

- J.C. (Coordinadores). Investigación Para el Desarrollo Rural: Diez años de Experiencia en el CICA. 319-351. Coordinación General de Investigación y Estudios de Posgrado, Universidad Autónoma del Estado de México.
- Arriaga-Jordán CM, Flores-Gallegos FJ, Peña-Carmona G, Albarran B, García-Martínez A, Espinoza-Ortega A, González-Esquivel CE, Castelán-Ortega OA. (2001): Participatory on farm evaluation of the response to concentrate supplementation by cows in early lactation in smallholder peasant (campesino) dairy production systems in the highlands of central Mexico. *Journal of Agricultural Science*, 137: 97-103.
- Association of Official Agricultural Chemical (AOAC), (1960): Official methods of analysis Association of Official Agricultural Chemist, Novena edition, 832 pp. Washington (USA). En De la Roza-Delgado B, Martínez-Fernández A, Argamentería Gutiérrez A. (2002): Determinación de material seca en pastos y forrajes a partir de la temperature de secado para análisis. *Pastos*, XXXII (1), 91-104.
- Barchiesi-Ferrari C, Alomar D, Miranda H. (2011): Pepsin-celullase digestibility of pasture silages: effects of pasture type, maturity stage, and variations in the enzymatic method. *Chilean Journal of Agricultural Reseach*, 71(2): 249-257.
- 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. *Archivos de Zootecnia*. 48(1):51-61.
- Brum O, Carro D, Valdés C, González S, López S. (1999): Digestibilidad *in vitro* de forrajes y concentrados: efecto de la ración de los animales donantes de líquido ruminal. *Revista Archivos de Zootecnia*. 48(181): 51-61.
- Carmona JC, Bolívar DM, Giraldo LA. (2005): El gas metano en la producción ganadera y alternativas para medir sus emisiones y aminorar su impacto a nivel ambiental y productivo. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 18:49-63.

- Carrillo L, (2003), Microbiología Agrícola. Universidad Nacional de Salta  
<http://www.unsa.edu.ar/matbib/micragri.htm> (05 de febrero del 2015).
- Castelán-Ortega O., Estrada-Flores J., Espinoza-Ortega A., Sánchez-Vera E., Ambriz-Vilchiz V. y Hernández-Ortega M. (2008): Strategies for the management of agroecosystem resources in Temperate Zones of Mexico: The case of campesino milk farmers in the central highlands. En: Castelán-Ortega O., Bernúes-Jal A., Ruiz-Santos R. y Mould F. L. in Opportunities and Challenges for Smallholder Ruminant systems in Latin America. 133-160. Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, México.
- Cheli F, Campagnoli A, Dell'Orto V (2013): Fungal populations and mycotoxins in silages: From occurrence to analysis. Animal Feed Science and Technology, 183: 1-16.
- Churn DC y Pond WG (2003): Fundamentos de nutrición y alimentación de animales. Limusa. México. 358pp.
- Comisión Económica para América Latina y el Caribe (CEPAL), Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la alimentación (FAO), Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA) (2009) Perspectivas de la Agricultura y del Desarrollo Rural en las Américas: una mirada hacia América Latina y el Caribe.
- Contreras A y Noro M. (2010): Rumen: morfología, trastornos y modulación de la actividad fermentativa. 3° ed., Valdivia: América, Chile.
- Contreras-Govea FE, Muck RE, Mertens DR, Weimer PJ. (2011): Microbial inoculant effect on silage and *in vitro* ruminal fermentation, and microbial biomass estimation for alfalfa, bmr corn, and corn silages. Animal Feed Science and Technology, 163: 2-10.
- De Boever JL, Cotteny BG, De Brabander DL, Vanacker JM, Boucqué ChV. (1997): Prediction of the feeding value maize silages by chemical parameters, *in vitro* digestibility and NIRS. Animal Feed Science and Technology, 66:211-222.

- De la Roza-Delgado B, Martínez-Fernández A, Argamenteoría Gutiérrez A. (2002): Determinación de material seca en pastos y forrajes a partir de la temperature de secado para análisis. Pastos, XXXII (1), 91-104.
- Dunière L, Sindou J, Chaucheyras-Durand F, Chevallier I, Thevenot-Sergentet D. (2013): Silage processing and strategies to prevent persistence of undesirable microorganisms. Animal Feed Science and Technology, 182: 1-15.
- Espinoza-Ortega A, Espinosa-Ayala E, Bastida-López J, Castañeda-Martínez T, Arriaga-Jordán CM. (2007): Small-scale dairy farming in the highlands of central Mexico: technical, economic and social aspects and their impact on poverty. Experimental Agriculture 43, 241-256.
- Eun JS, Beachemin KA, Schulze. (2007): Use of an *in vitro* fermentation bioassay to evaluate improvement in degradation of alfalfa hay due to exogenous feed enzymes. Animal Feed Science and Technology 135, 315-328.
- FAO (2010): Status of and prospects for samallholder milk production- A global perspective, by T. Hemme and J. Otte. Rome, Italy. <http://www.fao.org/docrep /012/i1522e/i1522e00.pdf>. (12 de mayo del 2015).
- Flores G, González A, Castro J, Castro P, Cardelle M, Fernández B, Valladares J. (2003): Evaluación de métodos de laboratorio para la predicción de la digestibilidadin vivo de la materia orgánica de ensilajes de hierba y planta entera de maíz, Revista Pastos, 33(1):5-99.
- Giraldo LA, Gutiérrez LA, Rúa C. (2007): Comparación de dos técnicas *in vitro* e *in situ* para estimar la digestibilidad verdadera en forrajes tropicales. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, 20:269-279.
- Giraldo, C.; Valderrama, E.; Montoya, L. y Armbrecht, I. (2006), *Efecto de Tithonia diversifolia* (Asteraceae) sobre *herbivoría de Atta cephalotes* (Hymenoptera: Formicidae), En: Resúmenes IV Congreso Latinoamericano de Agroforestería para la producción animal sostenible y III Simposio sobre



sistemas silvopastoriles para la producción ganadera sostenible. EEPF “Indio Hatuey”. Matanzas, Cuba. Enero, 113 pp.

Hemme T, IFCN (Dairy Team and IFCN Researchers) (2007) IFCN Dairy Report 2007, International Farm Comparison Network, IFCN Dairy Research Center, Kiel, Germany.

Heredia-Nava D, Espinoza-Ortega A, González-Esquivel CE, Arriaga-Jordán CM. (2007): Feeding strategies for small-scale dairy systems based on perennial (*Lolium perenne*) or annual (*Lolium multiflorum*) ryegrass in the central highlands of Mexico. *Tropical Animal Health and Production*, 39: 179-188.

Holden LA. (1999); Comparison of Methods of In Vitro DryMatter Digestibility for Ten Feeds. *Journal of Dairy Science*, 82(8): 1791-1794.

INEGI, (2009), Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/datos-geograficos/15/15003.pdf>. (25 de junio de 2015)

Jancík F, Rinne M, Homolka P, Cermák B, Huhtanen P. (2011): Comparison of methods for forage digestibility determination. *Animal Feed Science and Technology*, 169: 11-23.

Jones DIH y Hayward MV. (1975): The effect of pepsin pre-treatment of herbage in the prediction of dry matter digestibility from solubility in fungal cellulose. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 26: 711-718.

Khan NA, Cone JK, Fievez V, Hendriks WH. (2012): Causes of variation in fatty acid content and composition in grass and maize silages. *Animal Feed Science and Technology*, 174: 36-45.

- Kowalski ZM, Ludwin J, Górka P, Rinne M, Weisbjerg MR, Jagusiak W. (2014): The use of cellulose and filter bag technique to predict digestibility of forages. *Animal Feed Science and Technology*, 198: 49-56.
- Liu QH, Shao T, Zhang JG. (2013): Determination of aerobic deterioration of corn stalk silage caused by aerobic bacteria. *Animal Feed Science and Technology*, 183: 124-131.
- Macle TE, Briant AM, Petch SF, Hill JP, and Auldist MJ. (1999): Nutritional Influences on the Composition of Milk from Cows of Different Protein Phenotypes in New Zealand. *Journal of Dairy Science*, 82: 172-180.
- Macle TE, Briant AM, Petch SF, Hill JP, and Auldist MJ. (1999): Nutritional Influences on the Composition of Milk from Cows of Different Protein Phenotypes in New Zealand. *Journal of Dairy Science*, 82: 172-180.
- Martínez-Fernández A. (2015): Manejo de forrajes para ensilar. Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA), España.
- Minson Dennis J. (1990): Forage in ruminant nutrition. Academic Press. United States of America.
- Nkosi BD, Meeske R, Palic D, Langa T, Leeuw KJ, Groenewald IB. (2009): Effects of ensiling whole crop maize with bacterial inoculants on the fermentation, aerobic stability, and growth performance of lambs. *Animal Feed Science and Technology*, 154: 193-203.
- Odermatt P. y Santiago CMJ. (1997): Ventajas Comparativas en la Producción de Leche en México. *Agroalimentaria*. N° 5. (Diciembre 1997): 35-44.

- Olmos J, (2014): Alimentación de vacas lecheras con ensilaje de maíz, 2º Curso taller internacional en alimentación de bovinos productores de leche basada en pastoreo y forrajes, Estado de México, México.
- Relling A y Mattioli G. (2003). Fisiología Digestiva y Metabólica de los Rumiantes. 2º ed., Universidad Nacional de la Plata y University of Ohio, EDULP, USA.
- Richards J, Pedersen F, Britton A, Stock A, Krehbiel R. (1995): In vitro starch disappearance procedure modifications, Animal Feed Science and Technology, 55:35-45.
- Rinne M, Olt A, Nousiainen J, Seppälä A, Tuori M, Paul C, Fraser MD, Huhtanen P. (2006): Prediction of legume silage digestibility from various laboratory methods. Grass and Forage Science, 61:354-362.
- Riveros E, Argamentarí A. (1987): Métodos Enzimáticos de Predicción de la digestibilidad In Vivo de la Materia Orgánica de Forrajes, En: Avances en Producción Animal, Vol. 12, Ed. Mario Silva G. 59-75, Chile.
- Ruiz R. (2011): Comparación de dos métodos in vitro para estimar la digestibilidad de pastos tropicales en rumiantes. Revista Ciencia, Tecnología, Sociedad y Ambiente 2(2):11-24.
- Secretaría de Economía (SE) (2012). Análisis del sector lácteo en México. Secretaría de Economía, México.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), con información de las Delegaciones de la SAGARPA (2015) Panorama de la Lechería en México.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), con información de las Delegaciones de la SAGARPA (2014). Reporte Nacional: Producción anual de leche.
- Scheffler WC. (1979). Statistics for the biological sciences. Second Edition. Addison-Weley Publishing Company, Reading, Massachusetts, EUA.
- Sisson S y Grossman J. (1982): Anatomía de los animales domésticos. 5º ed., Elsevier Masson, España.

- Shimada AS. (2003): Fundamentos de nutrición animal. Ed México, México. 383p.
- Terry RA, Mundell DC, Osbourn DF. (1978): Comparison of two *in vitro* procedures using rumen liquor-pepsin or pepsin-cellulase for prediction of forage digestibility. *Journal of the British Grassland Society*; 33: 13-18.
- Tilley JMA y Terry RA. (1963): A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *The Grassland Research Institute*, 104-111.
- Villalobos C, González E, Santos J. (2000): Técnicas para estimar la degradación de proteína y materia orgánica en el rumen y su importancia en rumiantes de pastoreo. *Técnica Pecuaria en México*; 38 (2) 119-134.
- Weinberg ZG, Chen Y. (2013): Effects of storage periodo on the composition of whole crop wheat and corn silages. *Animal Feed Science and Technology*, 185: 196-200.
- Weinberg ZG, Chen Y. (2013): Effects of storage periodo on the composition of whole crop wheat and corn silages. *Animal Feed Science and Technology*, 185: 196-200.
- Wright A, Klieve A. (2011): Does the complexity of the rumen microbial ecology preclude methane mitigation?. *Animal Feed Science and Technology*, 166-167:248-253.
- Yang WZ, Beauchemin KA, Vedres DD, Ghorbani GR, Colombatto D, Morgavi DP. (2004): Effects of direct-fed microbial supplementation on ruminal acidosis, digestibility, and bacterial protein synthesis in continuous culture. *Animal Feed Science and Technology*, 114:179-193.