



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

---

---

**Uso de heces de bovino como inóculo en la  
prueba de digestibilidad *in vitro***

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**PRESENTA:**

FRANCISCO VICTORIA LIRA

**ASESORA:**

DRA. DENEZ CAMACHO MORFIN

**CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO**

**2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN  
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales



Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Uso de heces de bovino como inóculo en la prueba de digestibilidad in vitro

Que presenta el pasante: FRANCISCO VICTORIA LIRA  
Con número de cuenta: 30629693-8 para obtener el Título de la carrera: Medicina Veterinaria y Zootecnia

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 08 de septiembre de 2017.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Q.B. Lilian Morfin Loyden	
<b>VOCAL</b>	Dra. Deneb Camacho Morfin	
<b>SECRETARIO</b>	Dr. Jesús Alberto Guevara González	
<b>1er. SUPLENTE</b>	Dra. Ma de los Ángeles Ortiz Rubio	
<b>2do. SUPLENTE</b>	M.V.Z. Marcos Pérez Alvarado	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

## Agradecimientos:

A José por apoyarme y motivarme a no rendirme y culminar mi formación profesional, así como servir de ejemplo de dedicación, responsabilidad y fortaleza. Por esto y más, muchas gracias.

A mi madre porque con amor, sacrificios y esfuerzo hiciste esto posible, por apoyarme en los momentos difíciles y hacer de mi un profesionalista, gracias.

A mi padre por el esfuerzo hecho para que yo estudiara y por darme la fortaleza de salir adelante, gracias.

A la Doctora Deneb por creer en mí y ayudarme a construir este proyecto, por sus consejos y amistad, gracias.

A Julián y Chel por ser una parte importante en mi crecimiento, por apoyarme y aconsejarme, gracias.

A Ivonne, Fer, Meli, For y Josué por su amistad y apoyo muchas gracias.

<b>Resumen</b>	1
<b>1. Marco de referencia</b>	2
<b>2. Marco Teórico</b>	3
2.1 Digestión	3
2.1.1 Fermentación	3
2.1.2 Digestibilidad	3
2.2 Determinación de la digestibilidad	3
2.3 Determinación de la DIV con el uso de heces como inóculo.	6
<b>3. Justificación</b>	8
<b>4. Objetivos</b>	9
4.1 Objetivo general	9
4.2 Objetivos particulares	9
<b>5. Materiales y Métodos</b>	10
5.1 Área de estudio	10
5.2 Alimento	10
5.3 Animales donadores	11
5.4 Obtención de inóculos	11
5.4.1 Líquido ruminal	12
5.4.2 Heces	12
5.5 Etapa uno: Uso del inóculo de heces	13
5.5.1 Uso del inóculo	13
5.5.2 Tratamientos	14
5.6 Etapa dos: Aumento de la cantidad de heces en el inóculo	15
5.6.1 Relación heces-saliva	15
5.7 Etapa tres: Incubación del inóculo de heces-saliva	16
5.7.1 Incubación previa de las soluciones de heces	16
5.8 Etapa cuatro: Aumento de la cantidad de inóculo.	16
5.8.1 Tratamientos	17
5.8.2 Alícuotas de heces	17

5.9	Análisis estadístico	18
<b>6.</b>	<b>Resultados</b>	19
6.1	Forma de uso del inóculo y relación heces-saliva	19
6.2	Aumento de la concentración de heces en saliva	20
6.3	Incubación del inóculo de heces	21
6.4	Relaciones inóculo de heces-saliva	23
<b>7.</b>	<b>Discusión</b>	24
<b>8.</b>	<b>Conclusiones</b>	26
<b>9.</b>	<b>Bibliografía</b>	27

## Resumen

La técnica de digestibilidad *in vitro* requiere líquido ruminal como inóculo, esto plantea problemas prácticos, económicos y éticos debido a que los animales al ser canulados pueden presentar sufrimiento innecesario, por lo cual el uso de las heces como fuente de inóculo microbiano eliminaría la necesidad de utilizar animales sometidos a estos procedimientos. El objetivo del presente estudio fue determinar condiciones de manejo de heces bovinas con el fin de sustituir el líquido ruminal como inóculo en la técnica de determinación de la digestibilidad *in vitro* por el método de Tilley y Terry.

El trabajo se realizó en cuatro etapas secuenciales. En la primera etapa se evaluó la forma de uso del inóculo de heces comparando su uso directo e indirecto así como se determinó la relación heces–saliva, la cual tuviera el potencial de equivalencia con el líquido ruminal como inóculo, así mismo en la segunda etapa se aumentó la cantidad de heces en las soluciones utilizadas como inóculo. En la tercera etapa se evaluó la incubación previa del inóculo de heces y por último; en la cuarta etapa se aumentó la cantidad de inóculo de heces en relación a la saliva agregada al sustrato. En la etapa uno se encontró que el uso indirecto de heces es el más adecuado ya que el uso directo no permite la filtración así como se encontró que la solución de heces en una proporción de 0.45:1 y 0.50:1 tienen los mayores valores de fermentación pero sin embargo no equiparan al obtenido por el líquido ruminal. En la prueba dos se encontró que existe una mayor fermentación en la proporción 1:1 sin embargo conforme se aumentó la proporción de heces la fermentación disminuyó. En la prueba tres se encontró que la incubación previa del inóculo de heces, si tiene un efecto en la fermentación final, encontrando que en la fermentación con tiempo de 25 minutos, la fermentación final se vio aumentada. En la cuarta etapa el aumento de la proporción de inóculo de heces en relación a la saliva en el tubo se determinó que no es adecuado ya que no filtra. El uso de heces bovinas como inóculo tiene un potencial para reemplazar al líquido ruminal sin embargo es necesario estudiar las condiciones en las cuales debe ser manejado.

## 1 Marco de referencia

Los alimentos consumidos por los rumiantes están formados principalmente por polisacáridos con enlaces  $\beta$ -glucosídicos, como la celulosa, que no pueden ser escindidos por las enzimas digestivas de los mamíferos. Por consiguiente, los rumiantes han desarrollado un sistema digestivo especial que supone la fermentación microbiana de los alimentos, antes de quedar expuestos a sus propias enzimas digestivas (McDonald *et al.*, 2013).

El retículo-rumen (RR) proporciona un sistema de cultivo continuo para bacterias anaerobias, protozoos y hongos. Los alimentos llegan al RR donde son parcialmente fermentados, dando lugar principalmente a ácidos volátiles, células microbianas, gases metano y dióxido de carbono. Una parte de las células microbianas pasan al abomaso e intestino delgado, acompañando a los componentes de los alimentos no degradados; allí, son digeridos por las enzimas segregadas por el animal hospedador, absorbiéndose los productos de la digestión. En el intestino grueso existe una segunda fase de digestión microbiana; las paredes del intestino grueso son capaces de sostener una significativa población microbiana en colon y ciego, y así la digestión microbiana en el intestino grueso es similar a la que ocurre en el RR (Ramírez, 2009; McDonald *et al.*, 2013). Los ácidos grasos volátiles producidos en el intestino grueso también se absorben, pero las células microbianas se excretan en las heces (McDonald *et al.*, 2013).

## **2 Marco Teórico**

### **2.1 Digestión**

La mayoría de los componentes orgánicos de los alimentos se encuentran en forma de grandes moléculas insolubles, que han de degradarse hasta compuestos más sencillos, para poder atravesar la membrana mucosa del tracto digestivo y llegar a la sangre y la linfa. El proceso de degradación, recibe el nombre de “digestión” (McDonald *et al.*, 2013).

Los procesos esenciales de la digestión pueden agruparse en mecánicos, químicos y microbianos. La actividad mecánica corresponde a la masticación y las contracciones musculares del tracto digestivo. Las principales acciones químicas se realizan mediante las enzimas segregadas por los diferentes jugos digestivos, si bien, las enzimas vegetales existen en los alimentos naturales, tienen escasa trascendencia en la digestión de los mismos. La digestión microbiana de los alimentos, también enzimática, se lleva a cabo por bacterias y protozoos, microorganismos de especial importancia en la degradación ruminal (McDonald *et al.*, 2013).

#### **2.1.1 Fermentación**

La fermentación es el proceso de descomposición y utilización de alimentos en el tracto gastrointestinal, catalizado por enzimas producidas por microorganismos (López *et al.*, 2004).

#### **2.1.2 Digestibilidad**

La digestibilidad de los alimentos puede definirse, con cierto grado de exactitud, como la cantidad que no se excreta en las heces y que, por tanto, se considera absorbida por el animal (McDonald *et al.*, 2013).

### **2.2 Determinación de la digestibilidad**

El desempeño productivo de los rumiantes está en función del valor nutricional de la dieta que consumen. Las características de fermentación de los alimentos en el rumen pueden ser estudiadas por métodos *in vivo* (a), *in situ* (b) e *in vitro* (c). Debido a que en los estudios *in*

*vivo* los alimentos sólo pueden ser evaluados en raciones totales y al hecho de que tales estudios requieren considerables recursos y son difíciles de estandarizar, en los últimos años varias técnicas *in situ* e *in vitro* han sido desarrolladas. Dentro de las técnicas *in vitro*, la de uso más frecuente es la descrita por Tilley y Terry (1963), para estimar la digestibilidad verdadera de la materia seca (MS). Otra técnica *in vitro* consiste en la utilización de enzimas en lugar de microorganismos, cuya principal ventaja es que no requiere animales como donadores de inóculo. Las dos técnicas anteriores son usadas como procedimientos para estimar la digestibilidad final del sustrato y no proveen información sobre la cinética de digestión. La técnica de la bolsa de nylon (*in situ*) supera esta limitante al proporcionar estimativas de la tasa y la dinámica de la degradación de los constituyentes del alimento; sin embargo es una aproximación laboriosa, costosa e invasiva, en la que solamente un pequeño número de muestras pueden ser evaluadas al tiempo. La técnica de producción de gases es otro método *in vitro* que permite determinar la extensión y la cinética de degradación del alimento a través del volumen de gas producido durante el proceso fermentativo. Una de las ventajas de este procedimiento es que el curso de la fermentación y el papel de los componentes solubles del sustrato puede ser cuantificado (Posada y Noguera, 2005).

#### **a) *In vivo***

Esta técnica usualmente es estándar para comparar a otras técnicas. Debido al tiempo y a la laboriosidad que se requiere para obtener resultados precisos, así como las grandes cantidades de alimento, animales y mano de obra que se requiere lo hace costosa, por lo cual se han desarrollado pruebas alternativas de digestibilidad (Omed *et al.*, 1989; Ramírez, 2009; Ruiz, 2011).

#### **b) *In situ***

Esta técnica se basa en la interpretación de la desaparición de material colocado en una bolsa de nylon que es introducida en el rumen de animales fistulados y canulados. La desaparición se mide en intervalos periódicos, hasta un tiempo aproximado de 96 horas dependiendo del nutriente a evaluar (Barradas *et al.*, 1990).

### **c) *In vitro***

Otro enfoque es reproducir en el laboratorio las reacciones que tienen lugar en el tracto digestivo del animal, registrando mediciones que pueden ser utilizadas como indicadores de digestibilidad *in vivo*. Estos son llamados *in vitro* y la predicción de la digestibilidad ha sido principalmente a partir de métodos finales de medición de desaparición del sustrato, se le conoce como procedimiento gravimétrico o de producción final de la fermentación (gases, formación de ácidos grasos volátiles) (France y Kebreab, 2008).

Los sistemas de digestibilidad *in vitro* se basan en su primera etapa en una digestión anaeróbica con microorganismos ruminales obtenidos del líquido ruminal, produciendo una fermentación en un sistema cerrado, es decir los productos de la fermentación no son removidos (El-Share *et al.*, 1987; Barradas *et al.*, 1990; France y Kebreab, 2008; Ruiz, 2011). En esta primera etapa se adiciona una solución amortiguadora con el fin de mantener el pH en alrededor de 6.9, siendo estas las condiciones óptimas (rango 6.7 a 7.0) para que actúen las bacterias ruminales (Barradas *et al.*, 1990).

En la segunda etapa de la técnica se lleva a cabo una digestión con pepsina en medio ácido, añadiendo HCl. El principal objetivo de esta etapa es eliminar la proteína microbiana existente dejando únicamente la materia seca no digerida. Esta etapa es comparativa con lo que sucede en el abomaso (Barradas *et al.*, 1990).

El empleo de las técnicas *in vitro* permite, en un tiempo relativamente corto, obtener un alto número de repeticiones o de muestras según el interés. Así mismo, en vista del mayor control de las condiciones, se espera que estas técnicas tengan una menor variabilidad (Ruiz, 2011).

Este método es fiable y preciso para la predicción de la digestibilidad *in vivo* de una amplia gama de forrajes. Sin embargo, su aplicación tiene la desventaja de que los animales tienen que ser modificados quirúrgicamente o manipulados de manera extrema para obtener líquido ruminal (Omed *et al.*, 1989).

Existen actualmente restricciones que manejan las comisiones de ética de los organismos internacionales y nacionales de investigación para el uso de animales canulados y este es otro punto a tener en cuenta (Ruiz, 2011).

### **2.3 Determinación de la digestibilidad *in vitro* (DIV) con el uso de heces como inóculo.**

En las últimas décadas se ha propuesto el uso de heces para determinar la digestibilidad *in vitro*, la cual se basa en el uso de los microorganismos contenidos en las heces. Esta técnica es simple, barata y no necesita animales modificados quirúrgicamente (Omed *et al.*, 1989; Akhter y Hossain 1998; Hughes *et al.*, 2012).

En el intestino grueso se fermentan cantidades sustanciales de celulosa y hemicelulosa, en donde muchas de las especies bacterianas del rumen están representadas en el intestino grueso, que los residuos bacterianos pasan posteriormente a las heces y que los organismos celulolíticos se encuentran firmemente asociados con los desechos vegetales. Por lo tanto, se considera que una suspensión de heces sería capaz de actuar como un inóculo para la fermentación de forrajes, en lugar del líquido ruminal (El-Share *et al.*, 1987).

El uso de heces como inóculo para la determinación de la digestibilidad *in vitro* se basa en que la microbiota ruminal consiste en su mayoría en bacterias y protozoarios, los cuales son exclusivos del tubo digestivo, principalmente del RR y ya que las mismas especies están presentes en el intestino grueso, aunque en proporciones diferentes (Shimada, 2009) y debido a que la digestión microbiana de los alimentos, se lleva a cabo por bacterias y protozoos (McDonald, 2013) es por ello que se ha mostrado una correlación positiva entre los valores de la digestibilidad *in vitro* e *in vivo* determinada, utilizando líquido ruminal y disoluciones de heces frescas (El-Meadaway *et al.*, 1998) lo anterior explica por qué puede ser posible sustituir el líquido ruminal por excretas de bovino.

La microbiota ruminal consiste en su mayoría en bacterias y protozoarios que tienen muchas características funcionales comunes, así como algunas diferencias notables (Shimada, 2009).

En el caso de las bacterias, su población es variable, se sabe que es de 5,000 a 20,000 millones por gramo de contenido ruminal. Su tamaño es de cuatro micras en promedio. Son exclusivas del tubo digestivo, principalmente del RR (las mismas especies están presentes en el intestino grueso, aunque en concentraciones de sólo 10 a 1,000 millones por gramo de digesta, y en proporciones diferentes), tienen especificidad según el huésped (Shimada, 2009).

Varios estudios han demostrado que las heces tienen un alto potencial de equivalencia con el líquido ruminal para la técnica de digestibilidad *in vitro* por el método de Tilley y Terry (Váradyová *et al.*, 2005; Laudadio *et al.*, 2009). El-Meadaway *et al.*, (1998) encontró que existe correlación positiva entre los valores de la digestibilidad *in vitro* e *in vivo* determinada, cuando se utiliza líquido ruminal y disoluciones de heces frescas.

Pese a que en diferentes trabajos se describen relaciones heces-saliva y su forma de preparación, no se describe si la forma de uso del inóculo, es directamente de la solución que se preparó o bien, si a partir de esta solución se debe tomar una alícuota (10 ml.) y mezclarla con saliva de McDougall (40 ml.) a semejanza de cómo se utiliza el líquido ruminal establecido por la técnica de Tilley y Terry (1963).

### 3 Justificación

La técnica de digestibilidad *in vitro* requiere líquido ruminal como inóculo (Cuttrignelli *et al.*, 2005), aunque el líquido ruminal se puede recoger, ya sea de animales con cánula ruminal o en sacrificio, esto plantea una serie de problemas prácticos, económicos y éticos debido a que se dice que los animales al ser canulados pueden presentar sufrimiento innecesario, o bien, los lugares en donde se sacrifican los animales están lejanos de donde se va a utilizar el líquido ruminal (Mauricio *et al.*, 1998; Cuttrignelli *et al.*, 2005; Bovera *et al.*, 2006), por lo que se han buscado diferentes fuentes de inóculos, entre los que se encuentran las heces de rumiantes (Cuttrignelli *et al.*, 2005; Bovera *et al.*, 2006).

Una propuesta es el uso de las heces como fuente de inóculo microbiano este eliminaría la necesidad de utilizar animales sometidos a procedimientos quirúrgicos (Hughes *et al.*, 2012).

La ventaja que presenta el uso de las heces como inóculo es que no se afecta el bienestar animal, además éstas contienen los microorganismos presentes en el rumen y se considera económico (Dehority, 2003; Bovera *et al.*, 2006; Hobson y Stewart, 2012; Hughes *et al.*, 2012).

Pese a que en diferentes trabajos se describen relaciones heces-saliva y su forma de preparación, (El-Share *et al.*, 1987; Omed *et al.*, 1989; Akhter y Hossain, 1998; El-Meadaway *et al.*, 1998; Akhter *et al.*, 1999; Kalan, *et al.*, 2006; Guzmán, 2011; Utomo, *et al.*, 2011; Hughes *et al.*, 2012) pero no se describe la forma de uso del inóculo y no hay acuerdo en cuanto la proporción heces-saliva que se debe utilizar.

## **4 Objetivos**

### **4.1 Objetivo general**

Determinar condiciones de manejo de las heces bovinas, con el fin de sustituir el líquido ruminal como inóculo en la técnica de determinación de la digestibilidad *in vitro* de la materia seca (MS) por el método de Tilley y Terry.

### **4.2 Objetivos particulares**

- Establecer la forma de uso de la solución de heces como inóculo, directo o indirecto.
- Determinar la concentración de heces-saliva que tenga el potencial de equivalencia al líquido ruminal como inóculo para fermentar un alimento en la técnica de determinación de la digestibilidad *in vitro* de la MS por el método de Tilley y Terry.
- Determinar si la incubación previa de la disolución de heces afecta su potencial de fermentación equivalente al líquido ruminal.
- Estudiar las relaciones inóculo-saliva en cuanto a su potencial para reemplazar el líquido ruminal.

## **5. Materiales y Métodos**

El trabajo se realizó en 4 etapas secuenciales:

En la primera etapa se determinó si la solución de heces como inóculo debería ser utilizada en forma directa o indirecta, independientemente de la concentración de heces ocupada para hacer la disolución. La segunda etapa se aumentó la cantidad de heces en las soluciones utilizadas como inóculo. Para la tercera etapa, las soluciones de heces fueron incubadas a diferentes tiempos antes de ser agregadas al sustrato. En la cuarta etapa, se aumentó la cantidad de inóculo de heces en relación a la saliva agregada al sustrato. Todas las etapas se evaluaron con la cuantificación del residuo resultante de la incubación anaerobia del heno de avena por 48 horas, lo cual corresponde con la primera fase de la digestibilidad *in vitro* por el método de Tilley y Terry (Morfin, 2016).

### **5.1 Área de estudio**

El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Bromatología, de la Licenciatura de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC), de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM); la cual está localizada a 19° 41' de latitud norte, 99° 11' de longitud oeste y 2450 m.s.n.m. El tipo de clima predominante es clima templado subhúmedo con lluvias en verano, precipitación promedio anual de 1141.7 mm y una temperatura media de 15.5°C (CONAGUA, 2015).

### **5.2 Alimento**

Se trabajó con heno de avena cortada en octubre de 2016 procedente de Santo Tomás Ajusco. Ciudad de México, con las características químicas que se muestran en el cuadro 5.1. El heno de avena fue secado a 60°C, durante 24 horas y posteriormente molido en un molino de Wiley a un tamaño de partícula de 1 mm. Esta muestra se utilizó para las pruebas químicas y como sustrato para la determinación de la digestibilidad *in vitro*.

Cuadro 5.1 Características químicas del heno de avena cortado y secado en octubre de 2016.

Fracción	Tal como recolectado	Base seca
Materia seca	88,89	100
Humedad total	11,11	0
Extracto etéreo	9,31	10,47
Cenizas	5,53	6,22
Proteína cruda	6,85	7,71
Fibra cruda	33,07	37,20
Extracto libre de nitrógeno	34,14	38,40
FDN	67,10	75,48
FDA	36,24	40,76
Hemicelulosa	30,86	34,72

FDN: fibra detergente neutro, FDA: fibra detergente ácido.

### 5.3 Animales donadores

Se utilizaron como donadores, tanto de líquido ruminal como de heces, dos bovinos machos de raza Holstein entre los 12 y 15 meses de edad, procedentes del Centro de Enseñanza Agropecuaria (CEA) Facultad de Estudios Superiores (FES) Cuautitlán, los cuales estaban en ayuno de 12 horas. La dieta base de los animales fue heno de avena (60%), forraje verde (20%) y ensilado de maíz (20%).

### 5.4 Obtención de inóculos

Los inóculos utilizados fueron líquido ruminal y heces de bovinos de los cuales se describen los procesos de obtención en los apartados siguientes.

### 5.4.1 Líquido ruminal

Para cada uno de los experimentos se obtuvo el líquido ruminal mediante el siguiente proceso:

Se extrajo aproximadamente 500 ml. de líquido ruminal de los bovinos, mediante el uso de sonda oro-ruminal. El líquido se recolectó en una botella ámbar la cual se colocó en agua caliente a 39°C e inmediatamente se transportó al Laboratorio de Bromatología, de la FESC.

Una vez en el laboratorio, el líquido ruminal se filtró en cuatro capas de manta de cielo bajo un flujo constante de CO<sub>2</sub> (Morfin, 2016).

Cabe mencionar que el inóculo de líquido ruminal se utilizó como el grupo control para los experimentos del dos al cuatro.

### 5.4.2 Heces

Las heces para cada uno de los experimentos se recolectaron mediante el siguiente proceso:

Se extrajeron 1 Kg de heces bovinas directamente del recto del animal con el uso de guantes de palpación, los guantes con las heces se colocaron dentro de bolsas oscuras y se trasladaron en una hielera, en la que se introdujo botellas con agua caliente a una temperatura de 39°C.

Se cuidó que el tiempo transcurrido entre la recolección de heces, al proceso de la primera dilución no fuera más de 25 minutos.

Para cada uno de los experimentos se realizó el siguiente proceso de preparación del inóculo de heces:

- Se pesó las cantidades de heces requeridas para cada solución.
- Se mezclaron las heces pesadas en 400 ml. de saliva de McDougall preparada de acuerdo con lo consignado por Morfin (2016), enseguida se mezcló continuamente con una varilla de vidrio, en un vaso de precipitados de 1 l. de capacidad
- Finalmente se filtró en cuatro capas de manta de cielo.

Todo este proceso se realizó manteniendo un flujo constante de CO<sub>2</sub>.

## 5.5 Etapa uno: Uso del inóculo de heces

Los microorganismos son los que actúan en la degradación de los alimentos en el rumen, a mayor número de microorganismos la degradación de los alimentos sería mayor. Las heces tienen menor cantidad de microorganismos que el líquido ruminal (Shimada, 2009); por lo anterior, se esperaba que al aumentar la concentración de heces aumentaría el potencial de equivalencia de las heces con el líquido ruminal; entendiendo como potencial de equivalencia a la capacidad de los microorganismos contenidos en las heces para degradar los alimentos en forma similar a la lograda por los microorganismos del líquido ruminal.

Por lo anterior, se propusieron dos formas de emplear el inóculo de heces: directo, es decir de la solución formada de heces-saliva, se toma directamente y se adiciona a la muestra. Indirecto, el cual implica tomar una alícuota de 10 ml del inóculo de heces-saliva, a semejanza como se utiliza el líquido ruminal, conforme a lo consignado por Morfin (2016) y adicionarlo a la muestra.

### 5.5.1 Uso del inóculo

Se usó el inóculo de la siguiente forma:

- a) Directo. A la cantidad de heces planeada se le adicionó saliva de McDougall; las cantidades de heces se muestran en el cuadro 5.2. Debido a que las heces están mezcladas con la saliva, se consideró que esa solución se debería de utilizar para la incubación del sustrato tal cual. Por lo que, se tomaron 50 ml de la solución para cada tubo; lo anterior, conforme la técnica de Tilley y Terry consignado por Morfin (2016), en la cual se utilizan 10 ml. de inóculo y 40 ml. de saliva.
- b) Indirecto (Alícuota). En cada tratamiento se tomó una alícuota de 10 ml de heces preparadas conforme el cuadro 5.2, y se mezcló con 40 ml. de saliva de McDougall, para adicionarlas en cada tubo (Morfin, 2016).
- c) Líquido ruminal. Se tomó una alícuota de 10 ml del líquido ruminal filtrado y se mezcló con 40 ml. de saliva de McDougall, para adicionarla en cada tubo (Morfin, 2016).

Se pesó 0.5 g. de heno de avena en cada tubo, para cada tratamiento e inóculo, Independientemente del tipo de inóculo, cada tratamiento se realizó por triplicado, con su

correspondiente blanco, también por triplicado. Se entiende como blanco a los tubos que solo tienen las soluciones pero no muestra.

Para todos los tratamientos, del método de Tilley y Terry para determinar la digestibilidad *in vitro* (Morfin, 2016) solo se trabajó la primera fase: incubación anaerobia por 48 horas, omitiendo la segunda fase que trabaja un proceso químico de degradación, debido a que se buscó evaluar la acción de los microorganismos. El proceso se llevó a cabo siempre bajo una corriente de CO<sub>2</sub>.

Posterior a la incubación de 48 horas se procedió a filtrar cada tubo en papel filtro poro medio a peso constante.

### 5.5.2 Tratamientos

Los tratamientos consistieron en 6 relaciones de heces-saliva y el líquido ruminal como testigo (cuadro 5.2), con base en las relaciones utilizadas por Hughes *et al.* (2012) y Utomo *et al.* (2011).

Cuadro 5.2. Relaciones heces de bovino saliva empleadas.

Tratamientos	Heces (g)	Solución de McDougall (ml)	Relación H:S (peso:volumen)
1	100	400	0.25:1
2	120	400	0.30:1
3	140	400	0.35:1
4	160	400	0.40:1
5	180	400	0.45:1
6	200	400	0.50:1
7	Líquido ruminal	-	-

H: heces                      S: saliva

## 5.6 Etapa dos: Aumento de la cantidad de heces en el inóculo.

A partir de los resultados de la primera etapa, se decidió utilizar el inóculo de manera indirecta (apartado 5.5.1 inciso b), así como aumentar la cantidad de heces en los tratamientos, con objeto de incrementar la degradación del sustrato producida por los microorganismos presentes en las heces. Los puntos de partida para las relaciones heces-saliva fueron la información que consignan El-Meadaway *et. al.* (1998) y Posada *et al.* (2006).

### 5.6.1 Relación heces-saliva

Las relaciones de heces-saliva de McDougall en los tratamientos se muestran en el cuadro 5.3.

Cuadro 5.3. Cantidad de heces y saliva McDougall utilizadas en los tratamientos.

Tratamientos	Heces (g)	Solución de McDougall (ml)	Relación H:S (peso:volumen)
1	50	50	1:1
2	100	50	2:1
3	150	50	3:1
4	150 <sup>¥</sup>	0	1:0
5	0 <sup>£</sup>	50	0:1
6	Liquido ruminal	-	-

H: heces                      S: saliva

¥: solo heces

£: solo saliva de McDougall

Los procedimientos, tanto de preparación de las soluciones como de incubación, se describen en el apartado 5.5.1.

## 5.7. Etapa tres: Incubación del inóculo de heces-saliva

Con objeto de aumentar el potencial de equivalencia de las heces con respecto al líquido ruminal y con base en los resultados obtenidos en la etapa uno y dos; se seleccionaron las relaciones heces-saliva más promisorias para aumentar el potencial de equivalencia. Además, de acuerdo con Kalan *et al.* (2007) una incubación previa del inóculo de heces-saliva incrementaría la cantidad de microorganismos, se procedió a incubar las soluciones de heces.

### 5.7.1 Incubación previa de las soluciones de heces.

La cantidad de heces, saliva McDougall y tiempos de incubación utilizados en esta etapa se muestran en el cuadro 5.4.

Cuadro 5.4. Cantidad de heces, saliva McDougall y tiempo de incubación de las soluciones.

Tratamientos	Heces (g)	Saliva de McDougall (ml)	Relación H:S (peso:volumen)	Tiempo de incubación (minutos)
1	Líquido ruminal	-	-	0
2	100	250	0.40:1	0, 25, 60, 480
3	112.5	250	0.45:1	0, 25, 60, 480
4	125	250	0.50:1	0, 25, 60, 480

H: heces                      S: saliva

Los procedimientos, tanto de preparación de las soluciones como de incubación, se describen en el apartado 5.5.1.

### 5.8 Etapa cuatro: Aumento de la cantidad de inóculo.

En esta etapa se modificó la alícuota como otra alternativa para aumentar la cantidad de microorganismos, y encontrar las condiciones en las cuales se pudiera alcanzar el potencial de equivalencia de las heces con el líquido ruminal, se procedió a disminuir proporcionalmente la cantidad de saliva de McDougall y sustituirla por inóculo de heces. Las condiciones con las que se llevó a cabo esta prueba fueron las encontradas en las etapas

previas, es decir uso del inóculo en forma indirecta, las concentraciones así como un tiempo de incubación de 25 minutos.

### 5.8.1 Tratamientos

Las relaciones heces-saliva que se trabajaron se muestran en el cuadro 5.5.

Cuadro 5.5. Relación heces-saliva y tiempo de incubación.

Heces (g)	Solución de McDougall (ml)	Relación H:S (peso:volumen)	Tiempo de incubación. (minutos)
112.5	250	0.45:1	25
125	250	0.50:1	25

H: heces                      S: saliva

### 5.8.2 Alícuotas de heces

El cuadro 5.6 muestra los tratamientos que se utilizaron en esta prueba: dos relaciones heces-saliva y tres proporciones alícuota saliva. El proceso de preparación del inóculo e incubación se presenta en el apartado 5.5.1.

Cuadro 5.6 Proporciones de inóculo de heces-saliva

Disolución	Concentración heces-saliva de McDougall (Kg/L)	Proporciones alícuota-saliva (ml:ml)		
1	0.45:1	20:30	30:20	40:10
2	0.50:1	20:30	30:20	40:10

## **5.9. Análisis estadístico**

Los datos obtenidos de cada etapa se analizaron mediante un diseño completamente aleatorizado y las medias se compararon utilizando la prueba de Tukey. El valor de significancia se declaró a  $p < 0,05$ . El paquete estadístico utilizado fue STATGRAPHICS® Centurion XVI v. 17.1.12

## 6. Resultados

### 6.1 Forma de uso del inóculo y relación heces-saliva

El cuadro 6.1 muestra la forma de uso del inóculo, destaca que la solución de heces usadas directamente como inóculo no filtró en papel filtro de poro medio, tanto en las disoluciones de heces y en sus respectivos blancos; pese a que se incrementó la temperatura con agua caliente. Asimismo, los blancos presentaron gran cantidad de partículas suspendidas en relación a los blancos del líquido ruminal.

En contraste, en los tratamientos de heces, cuando se usó el inóculo en forma indirecta si hubo filtración.

Cuadro 6.1. Tipos de forma de uso del inóculo y su capacidad de filtrado en los distintos tratamientos.

Tratamientos	Relación heces-saliva de McDougal (Kg/L)	Forma de uso	Filtración
1	0.25 : 1	Indirecto	Si
		Directo	No
2	0.30 : 1	Indirecto	Si
		Directo	No
3	0.35 : 1	Indirecto	Si
		Directo	No
4	0.40 : 1	Indirecto	Si
		Directo	No
5	0.45 : 1	Indirecto	Si
		Directo	No
6	0.50 : 1	Indirecto	Si
		Directo	No
7	Líquido ruminal	-	Si

En el cuadro 6.2 se observa que con el uso de inóculo de heces bovinas si digirió el heno de avena; sin embargo, no alcanzó el potencial equivalente para igualar el porcentaje de digestibilidad obtenido con el líquido ruminal.

Cuadro 6.2. Digestibilidad *in vitro* con el uso de diferentes concentraciones de heces como inóculo usado indirectamente.

Tratamientos	Relación heces-saliva H:S (peso:volumen)	Digestibilidad <i>in vitro</i> (%)
1	0,25 : 1	29,4 ±0,13e <sup>£</sup>
2	0,30 : 1	31,4 ±1,73d
3	0,35 : 1	31,6 ±0,51d
4	0,40 : 1	33,4 ±0,43c
5	0,45 : 1	34,5 ±0,88b
6	0,50 : 1	35,0 ±0,22b
7	Líquido ruminal	40,3 ±0,46a

H: heces                      S: saliva

<sup>£</sup> Letras distintas en la misma columna indican diferencias (p<0,05).

### 6.2Aumento de la concentración de heces en saliva.

En el cuadro 6.3 se presentan los resultados de los tratamientos, se observa que todos los tratamientos tuvieron menor potencial de equivalencia con respecto al líquido ruminal. Sin embargo en los tratamientos 1, 2 y 3 la degradación del sustrato fue mayor que en los tratamientos con solo heces o solo saliva.

Cuadro 6.3. Digestibilidad *in vitro* con el uso de diferentes concentraciones de heces como inóculo.

Tratamientos	Relación heces-saliva (peso:volumen)	% de DIV
1	1 : 1	31,04 ±0,94b <sup>£</sup>
2	2 : 1	31,93 ±0,32b
3	3 : 1	29,71 ±0,42b
4	1 : 0 (Solo heces)	20,55 ±1,83c
5	0 : 1 (Solo saliva)	19,57 ±1,11c
6	Líquido ruminal	40,38 ±0,46a

<sup>£</sup> Letras distintas en la misma columna indican diferencias (p<0,05).

### 6.3 Incubación del inóculo de heces.

En el cuadro 6.4 resalta que en promedio las mayores digestibilidades se observan en las incubaciones de 25 min y en caso de la solución de 500g de heces en 1 litro de saliva de McDougall con incubación de 1 hora, es la que se observa más cercana a la digestibilidad con líquido ruminal.

Con respecto al experimento anterior destaca un aumento en las digestibilidades con la incubación, siempre y cuando se lleve a cabo entre 25 min. y 60 min.

Cuadro 6.4. Digestibilidad a diferente concentración y tiempo de incubación

g /L saliva	Relación	Tiempos previos de incubación			
	H:S	(minutos)			
	(peso:volumen)	0	25	60	480
LR <sup>1</sup>		46,7 ±2,46a			
400	0,40:1	34,4 ±0,38b	33,1 ±1,47b	35,2 ±3,26b	34,4 ±0,38b
450	0,45:1	34,2 ±1,50cd	40,1 ±1,28b	36,9 ±4,62bc	31,1 ±4,33d
500	0,50:1	32,4 ±4,50c	36,3 ±3,24b	38,2 ±6,45cd	32,1 ±2,16d

1: Líquido ruminal. Todos los tratamientos fueron comparados con respecto al líquido ruminal.

£ Letras distintas en la misma columna indican diferencias (p<0,05).

H: heces                      S: saliva

## 6.4 Relaciones inóculo de heces-saliva

El cuadro 6.5 muestra las proporciones en que se incrementó el inóculo en mililitros, resalta que pese a que tentativamente se esperaría un crecimiento en la cantidad de microorganismos, al aumentar la cantidad inóculo, no hubo filtración.

**Cuadro 6.5.** Incrementó el inóculo a diferentes proporciones de heces-saliva.

Disolución	Concentración heces-saliva de McDougal (Kg/L)	Proporción inóculo-saliva de McDougall (ml:ml)	Filtración
1	0,45:1	20:30	No
		30:20	No
		40:10	No
2	0,50:1	20:30	No
		30:20	No
		40:10	No

## 7. Discusión

### Etapa 1

En la literatura que se tuvo acceso se encontró que no había consistencia en cuánto a cómo debe ser el uso de la solución de heces, ya que para el uso de heces como inóculo se necesita preparar una solución de éstas.

El hecho de que no se haya filtrado la solución de heces ni los blancos se podría atribuir a la alta viscosidad de las soluciones, lo cual impidió su paso por el papel filtro de poro medio.

Cubillos *et al.* (2010) encontraron que la viscosidad es importante para la producción de gas *in vitro*, para evaluar la fuerza del inóculo de heces y que a mayor viscosidad hay mayor presencia de microorganismos. Sin embargo cuando hay gran cantidad de partículas suspendidas de tamaño pequeño, los poros del papel filtro se tapan lo cual impide la filtración.

Los resultados obtenidos no coinciden con el hecho de que filtra tal como lo reportado por El-Meadaway *et al.*, (1998); Guzmán, (2011); Kalan *et al.*, (2006); Utomo *et al.*, (2011)

### Etapa 2

Según lo reportado en la literatura la digestibilidad *in vitro* usando los rangos de las soluciones heces-saliva, se equipararía el potencial equivalente al líquido ruminal sin embargo no fue así.

No obstante se obtuvo un potencial de digestibilidad menor a lo logrado con el líquido ruminal, lo cual se puede atribuir a que no se alcanzó el número o tipo de microorganismos necesarios para equiparar al líquido ruminal y así lograr la misma digestión.

Shimada (2009) menciona que existe una proporción variable de bacterias en el rumen las cuales van de 5 000 a 20 000 millones de bacterias por gramo de contenido ruminal y que las mismas bacterias están presentes en el intestino grueso sólo que en proporciones mucho menores. Sin embargo el buscar equiparlas representa un reto ya que como se menciona antes la viscosidad es un factor importante.

Los resultados obtenidos no coinciden con lo reportado por Akhter y Hossain, (1998); Akhter *et al.*, (1999); Utomo *et al.*, (2011); Hughes *et al.*, (2012) los cuales usando concentraciones similares de heces-saliva lograron un potencial de digestibilidad equivalente al líquido ruminal.

### **Etapa 3**

Buscando equiparar el potencial de equivalencia de líquido ruminal para realizar la digestibilidad *in vitro* se aumentaron las concentraciones de la relación heces-saliva sin embargo no se logró alcanzar los niveles del líquido ruminal.

### **Etapa 4**

Destaca la presencia de digestibilidad en los incubados sólo con saliva la cual resultó con menor nivel que las usadas con heces, el hecho de que no haya existido un aumento en las digestibilidades con concentraciones mayores de heces, pudiera explicarse por la falta de nutrientes y amortiguadores que provee la saliva de McDougall.

Church (1993) menciona que los microorganismos ruminales necesitan nutrientes y un medio cercano a la neutralidad para poder sobrevivir y actuar sobre el sustrato, ya que la saliva de McDougall provee de estos mismos (Cutrignelli *et al.*, 2005), lo cual podría explicar el por qué al aumentar la concentración de heces no aumentó la digestibilidad.

El hecho de que la incubación previa de las soluciones haya sido mejor a los 25 minutos, así como a 60 minutos, pero no a las 480 minutos, se podría explicar por el tiempo mínimo de duplicación bacteriana, el cual dura 20 min (Harvey *et al.*, 2008). Además se conoce que con el tiempo, el crecimiento de las bacterias disminuye hasta cesar por completo (fase estacionaria), a medida que los nutrientes se van agotando y se acumulan productos de excreción tóxicos. Si se mantienen en fase estacionaria durante un largo periodo de tiempo, las células acabarían muriendo (Harvey *et al.*, 2008).

## **8. Conclusiones**

- Existen evidencias que se debe tomar una alícuota a partir de la solución de heces y mezclarlo con la saliva a semejanza como se realiza con el líquido ruminal en la técnica de Tilley y Terry, de otra forma no hay filtración.
- La relación heces-saliva con mayor potencial de equivalencia de degradación del sustrato con respecto al líquido ruminal fue la relación 450g:1 y 500g:1 litro de saliva de McDougall.
- La incubación previa de la solución de heces por 25 minutos incrementó el potencial de equivalencia del líquido ruminal, sin embargo no fue equivalente al líquido ruminal.

## 9. Bibliografía

- Akhter, S., y Hossain, M. M. 1998. Cow Faeces in in vitro Digestibility Assay of Forage. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 11(1), 51–54.
- Akhter, S., Owen, E., Theodorou, M. K., Butler, E. A., y Minson, D. J. 1999. Bovine faeces as a source of micro-organisms for the in vitro digestibility assay of forages. *Grass and Forage Science*, 54(3), 219–226. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2494.1999.00174.x>
- Barradas, B. H., Bernal, S. G., Carrasco, G. B., Castellanos, R. A., Chávez, S. A., Ferreiro, G. H., yTejada, C. I. 1990. *Manual de técnicas de investigación en rumiología*. (R. A. Castellanos, L. G. Llamas, & A. Shimada, Eds.) (Primera ed). México: Sistema de educación continua en producción animal en México, A.C.
- Bovera, F., Morra, F., y Di Meo, C. 2006. Use of the in vitro gas production technique to study feed digestibility in domesticated ostriches (*Struthio camelus* var. domesticus). *EPC 2006-12th European Poultry*. Retrieved from <http://www.cabi.org/animalscience/Uploads/File/AnimalScience/additionalFiles/WPSAVerona/10121.pdf>
- Church D.C., Pond W.G., Pound K.R. 2007. Fundamentos de nutrición y alimentación de animales. 2nda edición. Limusa Wiley. México.
- CONAGUA (Comisión Nacional del AGUA). 2015. Resúmenes mensuales de temperatura y lluvia.  
Disponible en:  
[http://smn.cna.gob.mx/index.php?option=com\\_content&view=article&id=12&Itemid=112](http://smn.cna.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=12&Itemid=112)
- Cutrignelli, M. I., Calabrò, S., Tudisco, R., Zicarelli, F., Gazaneo, M. P., y Piccolo, V. (2005). Comparison of buffalo rumen liquor and buffalo faeces as inoculum for the in vitro gas production technique. *Italian J. of Anim Sci*, 4(SUPPL. 2), 319–321. <https://doi.org/10.4081/ijas.2005.2s.319>
- Dehority, B. A. 2003. *Rumen microbiology*. England: Ed. Nottingham University Press.
- El-Meadaway, a., Mir, Z., Mir, P. S., Zaman, M. S., y Yanke, L. J. 1998. Relative efficacy of inocula from rumen fluid or faecal solution for determining in vitro digestibility and gas production. *Canadian Journal of Animal Science*, 78(4), 673–679.

<https://doi.org/10.4141/A97-109>

- El-Share, H. M., Omed, H. M., Chamberlain, A. G., y Axford, R. F. E. 1987. Use of faecal organisms from sheep for the in vitro determination of digestibility. *Journal of Agricultural Science*, 109, 257–259.
- France, J., y Kebreab, E. 2008. *Mathematical modelling in animal nutrition (1er ed.)*. CABI Publishing, (p.32-25).
- Guzmán, M. 2011. Comparación de inóculos microbianos en la determinación de la digestibilidad in vitro. Tesis para especialización. Universidad Nacional de Córdoba.
- Harvey, R. A., Champe, P. C., y Fisher, B. D. 2008. *Microbiología (2nd ed.)*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, (p.59-68).
- Hobson, P., & Stewart, C. 2012. *The rumen microbial ecosystem (2<sup>nd</sup> ed.)*. London: Springer Science & Business Media.
- Hughes, M., Mlambo, V., Lallo, C. H. O., y Jennings, P. G. A. 2012. Potency of microbial inocula from bovine faeces and rumen fluid for in vitro digestion of different tropical forage substrates. *Grass and Forage Science*, 67(2), 263–273. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.2011.00841.x9>
- Kalan, D., Danelón, M., y Agron, J. L. F. 2006. Desaparición de MS y fibra en incubaciones in vitro utilizando heces ovinas. En 29° Congreso de la Asociación Argentina de Producción Animal (p. 818).
- Kalan, D., Wawrzkievicz, M., y Danelón, M., 2007. Relación entre la producción de gas acumulada *in vitro* y la digestión de sustrato empleando dos fuentes de inóculo alternativas. Revista Argentina de Producción Animal, Vol 27 Supt. 1. (p. 5-7) Argentina, Buenos Aires.
- Laudadio, V., Lacalandra, G. M., Khorchani, T., Hammadi, M., y Tufarelli, V. 2009. Faecal liquor as alternative microbial inoculum source for in vitro (Daisy II) technique to estimate the digestibility of feeds for camels. *Journal of Camelid Science* 2, 1–7.
- López, S., Prieto, M., Dijkstra, J., Kebreab, E., Dhanoa, M. S., y France, J. 2004. Functions for microbial growth. In E. Kebreab, J. Dijkstra, A. Bannink, W. J. J. Gerrits, & J. France

(Eds.), *Nutrient digestion and utilization in farm animals*. CABI Publishing.

Mauricio, R. M., Mould, F., y Owen, E. 1998. Comparison of rumen liquor and faeces from cows as sources of microorganisms for their *in vitro* gas production technique. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária E Zootecnia*, 50(5), 569–572. Retrieved from <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=10007980>

McDonald, P., Edwards, R. A., Greenhalgh, J. F. D., Morgan, C. A., Sinclair, L. A., y Wilkinson, R. G. 2013. *Nutrición animal* (Septima ed). Editorial ACRIBIA S.A. España.

Morfín L.L. 2016. Bromatología. Manual de laboratorio. FESC. UNAM.

Omed, H. M., Axford, R. F. E., Chamberlain, A. G., y Givens, D. I. 1989. A comparison of three laboratory techniques for the estimation of the digestibility of feedstuffs for ruminants. *Journal of Agricultural Science*, 113, 35–39.

Posada, S. L., y Noguera, R. R. 2005. Técnica *in vitro* de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. *Livestock Research for Rural Development*, 4(April).

Posada, S. L., Noguera, R. R., y Bolívar, D. 2006. Relación entre presión y volumen para la implementación de la técnica *in vitro* de producción de gases en Medellín, Colombia. *Rev Col Cienc Pec*, Vol. 19:4.

Ramírez L., R. G. 2009. *Nutrición de rumiantes: sistemas extensivos* (2a ed.). México: Trillas S.A. de C.V.

Ruiz, P. R. 2011. Comparación de dos métodos *in vitro* para estimar la digestibilidad de pastos tropicales en rumiantes. *CITESCA*, 2, 13–25.

Shimada, A. 2009. *Nutrición animal* (Segunda). México: Trillas S.A. de C.V. (p.96-105).

Tilley J.M., Terry R.A. 1963. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *Grass Forag. Sci.* 10 (2): 104-111

Utomo, R., Soejono, M., y Widyobroto, B. P. 2011. Determination of *in vitro* Rumen Fluid Alternative, (December), 207–211. <https://doi.org/10.5398/medpet.2011.34.3.207>

Váradyová, Z., Baran, M., y Zeleňák, I. 2005. Comparison of two in vitro fermentation gas production methods using both rumen fluid and faecal inoculum from sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 123–124 Pa, 81–94.  
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.04.030>