

Influencia del uso de una muestra de referencia interna y del mezclado de heces sobre la reproducibilidad de la producción de gas *in vitro*

Silvio J. Martínez Sáez, Redimio M. Pedraza Olivera, Guillermo F. Guevara Viera, Guillermo Barreto Argilagos, Cecilia E. González Pérez y Marlene León González

Centro de Estudios para el Desarrollo de la Producción Animal (CEDEPA), Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Camagüey, Cuba

silvio.martinez@reduc.edu.cu

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar la influencia del uso de una muestra de referencia interna y del mezclado de las heces sobre la reproducibilidad de la producción de gas *in vitro* se utilizó como referencia una muestra homogénea de *P. maximum* de la que se conocen los promedios de gas acumulado en los diferentes tiempos. Para evaluar la efectividad de este tipo de corrección se estudiaron muestras de *A. bilimekii*, *H. brasiletto* y *A. pennatula*. La corrección hecha consistió en multiplicar el volumen acumulado por las muestras, para cada hora, por la relación entre el volumen promedio de la muestra patrón y la estudiada. La corrección empleada mejora en todos los casos la reproducibilidad, no obstante, los coeficientes de variación (CV) obtenidos, cuando se trata con heces muy diferentes, son superiores al 10 %, por lo que la efectividad tiene sus límites. Para evaluar la influencia del mezclado de heces se utilizaron muestras de *S. officinarum*, dos inóculos macroscópicamente diferentes, y la mezcla de ambos. La variabilidad cuando se usan heces sin mezclar es mayor que cuando se mezclan, pero no siempre se logra disminuir los CV entre inóculos a niveles no mayores al 5 %. Se recomienda trabajar en la búsqueda de indicadores para controlar la fuerza del inóculo.

Palabras clave: producción de gas, heces, reproducibilidad, muestra de referencia

Influence of Using an Inner Reference Simple and a Feces Mixtures upon Gas *in vitro* Production Generating Capacity

ABSTRACT

A *P. maximum* homogeneous sample with different average gas volumes accumulated through time was used as a reference to evaluate the influence of an inner reference sample and a feces mixture upon gas *in vitro* production generating capacity. Effectiveness assessment of this kind of correction was performed by studying *A. bilimekii*, *H. brasiletto*, and *A. pennatula* samples. This correction consisted in multiplying the sample hourly accumulated volume by the average volume ratio between the standard and the studied samples. Such a correction improved generating capacity in every case; however, variation coefficients from highly different feces mixtures were over 100 % indicating effectiveness limitations. Concerning the assessment of feces mixture influence, *S. officinarum* samples, two macroscopically different inocula, and a mixture of both were used. Variability was higher when using non-mixed feces compared to mixed ones, but variation coefficient levels for inocula remained within a 5 % range in some cases. Further work is needed to find out suitable indicators to control inoculum power.

Key Words: gas production, feces, generating capacity, reference sample

INTRODUCCIÓN

Los rumiantes tienen la capacidad para transformar productos que no pueden ser usados por los humanos y otros monogástricos, en alimentos de alta calidad como la leche y carne, lo que los coloca en un lugar destacado dentro de la cadena alimenticia y son los responsables de producir casi toda la leche y cerca de $\frac{1}{3}$ de la carne que se consume en todo el mundo (FAO, 2007).

Las técnicas de producción de gas *in vitro*, ampliamente usadas en la evaluación de ali-

mentos para rumiantes, inicialmente se basaban en la utilización de líquido ruminal como inóculo, pero en los últimos tiempos las heces han sido satisfactoriamente utilizadas en la investigación de alimentos para rumiantes (Mauricio *et al.*, 2001 y Martínez, 2005).

El incremento en el uso de estos sistemas en la evaluación de alimentos se relaciona con su relativamente buena repetibilidad, aunque tiene fuentes de variabilidad sobre las que ha de seguirse trabajando (Bueno *et al.*, 2005).

En la producción de gas *in vitro* con heces depuestas como inóculo, se pueden lograr niveles aceptables de repetibilidad (con un mismo inóculo), pero la reproducibilidad (con inóculos diferentes) se afecta por la influencia del animal donante (Martínez, 2005). En tal sentido, son prácticas comunes, cuando se usa líquido ruminal, mezclar inóculos provenientes de diferentes animales e introducir muestras de referencia para corregir las diferencias debidas a la influencia del inóculo (Mauricio *et al.*, 2001; Posada y Noguera, 2005).

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar la influencia del uso de una muestra de referencia interna y del mezclado de heces depuestas usadas como inóculo, sobre la reproducibilidad de la producción de gas *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizó como referencia una muestra seca de *Panicum maximum* (Guinea) tomada con aproximadamente 60 días de rebrote en al menos 10 plantas ubicadas en la Finca Taburete el oeste de la ciudad de Camagüey. Se molió 1 kg de materia seca hasta pasar por un tamiz de 1 mm. La muestra fue colocada en un recipiente de vidrio de boca ancha y se mezcló de forma manual para garantizar su homogeneidad. Los promedios de gas acumulado (Martínez, 2005) en los diferentes tiempos con el uso de 14 inóculos diferentes y 36 réplicas de dicha muestra se usaron entonces como referencia.

Comprobación de la efectividad de la muestra de referencia

Se utilizaron tres corridas con inóculos diferentes. La primera con heces cuyos parámetros de producción de gas diferían de las medias de gas acumulado para las muestras de referencia más del 10 % de la magnitud de esta, que se describen como “alteradas” y las dos restantes con heces calificadas como “normales”, siguiendo el criterio de Schofield (2000). Se utilizaron muestras de *Acacia bilimekii* var. Robusta Miranda (Tehuixtle) y *Haemotoxylum brasiletto* (Brazil) y las vainas de *Acacia pennatula* (Cubata), colectadas en la región de la Mixteca Poblana al sureste del estado de Puebla, México, según se describe por Hernández (2006). En todos los casos se incorporaron tres réplicas de la muestra de referencia de *P. maximum* para ser usadas en la corrección de las diferencias debidas al inóculo. La corrección hecha consiste en multiplicar el volumen acumu-

lado por las muestras, para cada hora, por la relación entre el volumen promedio de la muestra patrón de *P. maximum* y el obtenido por dicha muestra en la corrida en cuestión para la misma hora.

Se utilizó el coeficiente de variación como medida de la reproducibilidad para evaluar la efectividad del uso de la corrección.

Evaluación del uso de heces mezcladas

Se llevaron a cabo tres corridas con muestras de bagazo de caña (*Saccharum officinarum*) tomadas de la casa de bagazo del central “Panamá” en el municipio Vertientes. En cada corrida experimental se montaron tres réplicas de bagazo y tres de Guinea. Cada una de ellas se trabajó con dos inóculos diferentes macroscópicamente (elegidos por inspección visual), y la mezcla de ambos. Se midieron los volúmenes de gas acumulado a las 24, 48 y 72 horas.

Se comparó el coeficiente de variación entre las corridas para ambas muestras cuando se trabajaba con los diferentes inóculos por separado y cuando se hacía con una mezcla de ambos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla se puede apreciar la influencia de la corrección por la muestra de referencia y el tipo de inóculo corregido sobre la reproducibilidad y en la Fig. 1 los coeficientes de variación a las 24, 48 y 72 horas para las muestras de forrajes analizadas.

Influencia de la corrección por muestra de referencia y el tipo de inóculo corregido sobre la reproducibilidad (CV - %)

Hora	Heces "normales"			Heces "alteradas"		
	24	48	72	24	48	72
Sin corregir	27,5	18,2	10,4	45,9	46,1	38,3
Corregidas	10,8	3,3	2,2	16,1	17,6	16,9

La corrección empleada mejora en todos los casos la reproducibilidad. Los coeficientes de variación obtenidos cuando se incluye la corrida con heces “alteradas”, no obstante la mejora por la corrección, quedan a un nivel muy alto (superior al 10 %) lo que indica que hay límites que no pueden ser corregidos por este tipo de tratamiento y requieren del rechazo de la corrida (Schofield, 2000), o la búsqueda de otras alternativas para disminuir la influencia.

La corrección será mejor cuando sea posible usar diferentes muestras de referencia, en con-

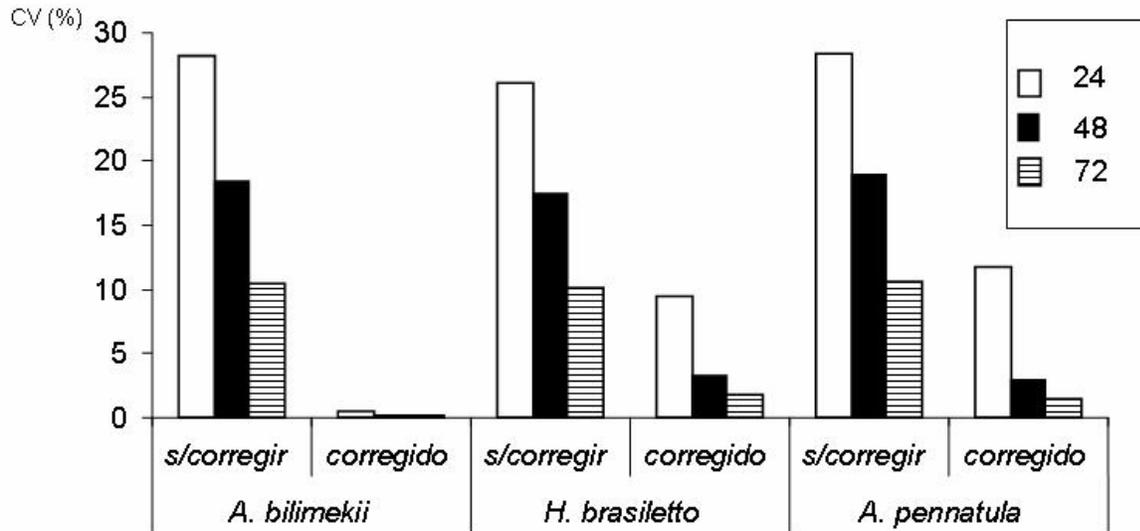


Fig. 1. Coeficientes de variación a las 24, 48 y 72 horas para las muestras analizadas, con y sin corrección por la de referencia.

cordancia con el rango de las que se pretende corregir (Sales *et al.*, 2007). Este hecho será importante no sólo desde el punto de vista de los niveles de gas, sino del comportamiento cinético, pues como en todos los pares referencia/muestra, el resultado será mejor en la medida en que más cerca estén las características de ambos (Skoog *et al.*, 1996).

Evaluación del uso de heces mezcladas

La Fig. 2 muestra los volúmenes de gas producidos por *S. officinarum* y *P. maximum* a las 72 horas con el uso de inóculo sin mezclar y mezclados.

No hay regularidad al comparar la cantidad de gas producido por las heces mezcladas y la de los inóculos que dieron origen a la mezcla. Por ejemplo, para *S. officinarum* de la corrida 1 el volumen producido por las heces mezcladas es inferior ($p < 0,05$) al producido por las heces sin mezclar, sin embargo, para este mismo sustrato en la corrida 3 ocurre exactamente lo contrario. Para *P. maximum*, el volumen producido por la mezcla tiene un valor intermedio entre el producido por los dos inóculos que la originaron. Se trata de consorcios de microorganismos que pueden, en algunas ocasiones, tener interacción positiva o negativa frente a determinado sustrato y en otras no, pero no siempre hay una clara explicación al respecto (Akhter *et al.*, 1999).

En la Fig. 3 se puede apreciar que la variabilidad entre las tres corridas es mayor cuando se

mezclan que cuando no, pero no siempre se logra disminuir los CV entre inóculos diferentes a niveles no mayores al 5 % a las 72 h.

Dado lo complejo del problema, es este un tema que requiere de más estudios, pero es práctica común también, cuando se emplea líquido ruminal como inóculo, utilizar la mezcla de más de un animal para tratar de evitar el sesgo por la influencia del inóculo. (Menke y Steingass, 1988; Getachew *et al.*, 2004), lo que no siempre se puede asegurar en la práctica.

CONCLUSIONES

El uso de una muestra de referencia interna y la mezcla de las heces depuestas provenientes de animales diferentes, mejora la reproducibilidad de la producción de gas *in vitro*, aun cuando no

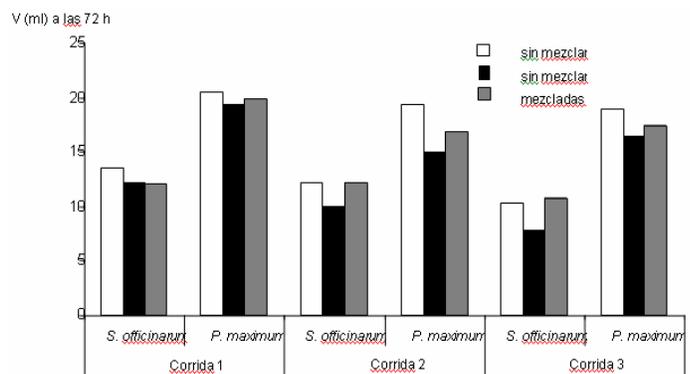


Fig. 2. Producción acumulada de gas a las 72 horas en las tres corridas con el uso de heces sin mezclar y mezcladas

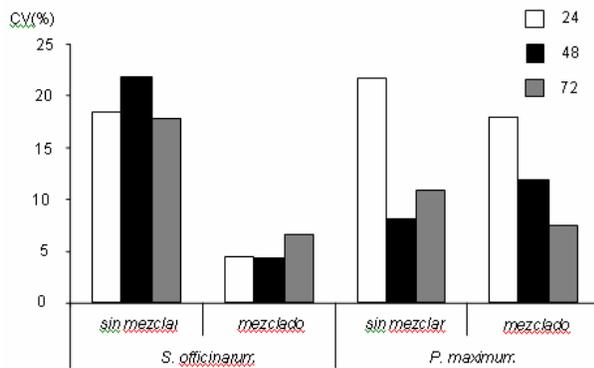


Fig. 3 Coeficientes de variación producido con inóculo sin mezclar y mezclado

siempre resuelve el problema de la influencia de la fuerza del inóculo.

RECOMENDACIÓN

Mezclar las heces depuestas a ser usadas como inóculo y utilizar en cada corrida una muestra de referencia interna, con vista a mejorar la reproducibilidad de la producción de gas *in vitro*; y trabajar en la búsqueda de indicadores alternativos para controlar la fuerza del inóculo en aras de disminuir su influencia sobre el volumen de gas producido.

REFERENCIAS

- 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. *Blackwell Science Ltd, Grass and Forage Science*, 54, 219-226.
- BUENO, I. C. S.; CABRAL FILHO S. L. S.; GOBBOA, S. P.; LOUVANDINI, H.; VITTI, D. M. y ABDALLA, A. L. (2005). Influence of Inoculum Source in A Gas Production Method. *Animal Feed Science and Technology*, 123-124 (2005) 95-105.
- FAO (2007). FAOSTAT data, 2007. Food and Agriculture Organization. Rome, Italy.
- GETACHEW, G.; DEPETERS, E. y ROBINSON, P. (2004). *In Vitro* Gas Production Provides Effective Method for Assessing Ruminant Feeds. *California Agriculture, Jan-Mar*. Extraído en enero de 2006, desde

<http://www.bioparametrics.com/Pdf/Neil%20Jesso%20Publications.pdf>.

- HERNÁNDEZ, J. E. (2006). *Valoración de la caprinocultura en la Mixteca Poblana: socioeconomía y recursos arbóreo-arbustivos*. Tesis de doctorado en Ciencias Veterinarias, Universidad de Camagüey, Cuba.
- MARTÍNEZ, S. J. (2005). *Implementación de la técnica de producción de gas in vitro con heces vacunas como inóculo y su empleo para evaluar el follaje de algunas leguminosas arbustivas*. Tesis de maestría en Producción Bovina Sostenible, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Camagüey, Cuba.
- MAURICIO, R. M.; OWEN, E.; MOULD, F. L.; GIVENS, D. I.; THEODOROU, M. K.; FRANCE, D.; DAVIES, R. y DHANOA, M. S. (2001). Comparison of Bovine Rumen Liquor and Bovine Faeces as Inoculum for An *In Vitro* Gas Production Technique for Evaluating Forages. *Anim. Feed Sci. Technol*, 89, 33-48.
- MENKE, K. H. y STEINGASS, H. (1988). Estimation of The Energetic Feed Value Obtained from Chemical Analysis and *In Vitro* Gas Production Using Rumen Fluid. *Anim. Res. Dev*, 28, 7-56.
- 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*, 17 (4). Extraído en septiembre de 2006, desde <http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd17/4/posa17036>.
- SALES, A. M.; RODRÍGUEZ, A. M.; MARCHISIO, P. F.; RODRÍGUEZ, M. I. y SALES, L. A. (2007). *Implementación de una rutina para el control de calidad de un proceso de medida química*. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia-UNT. Extraído en mayo de 2008, desde <http://www.uniram.com.ar/Jornadas/XXVII/18%20IMPLEMENTACION%20DE%20UNA%20RUTINA%20PARA%20EL%20CONTROL%20DE%20>
- SCHOFIELD, P. (2000). Gas Production Methods. En J. P. F. D'Mello (Ed.), *Farm Animal Metabolism and Nutrition* (pp. 209-232). Wallingford, UK: CABI Publishing.
- SKOOG, D. A.; WEST, M. W. y HOLLER, F. J. (1996). *Fundamentals of Analytical Chemistry* (7th Ed., pp. 625 y 684). UK: Saunders College Publishing.

Recibido: 6-5-2009

Aceptado: 8-8-2009