

# Estudio Recapitulativo

## Factores que afectan la digestibilidad *in situ* de los alimentos en el rumen

Ma. Esther Ortega Cerrilla\*  
Ma. Elena Carranco Jáuregui\*

Quin *et al.*<sup>47</sup> iniciaron el empleo de la técnica *in situ*, también llamada técnica *in sacco* o técnica de la bolsa artificial para estudiar la digestibilidad o desaparición de los alimentos en el rumen. Desde entonces, este método ganó gran aceptación como una forma de medir la digestibilidad aparente de la materia seca, fibra, nitrógeno, etcétera,<sup>9,10,19,30,38,54,58,62,65</sup> predecir la digestibilidad de los nutrientes en el tracto digestivo<sup>1,2,41,53</sup> y la digestibilidad de varios sistemas de alimentación,<sup>5,63</sup> debido principalmente a que es una manera rápida de medir la proporción en que los constituyentes del alimento son susceptibles a la degradación ruminal. Sin embargo, la utilidad y confiabilidad de esta técnica dependen de varios factores, como el tamaño de poro de la bolsa utilizada, cantidad de muestra, tamaño de la bolsa y tamaño de partícula de la muestra, entre otros.

### Tamaño de poro de la bolsa

Se observa que la parte del alimento que desaparece más rápidamente durante las primeras horas de incubación *in situ*, corresponde a la parte soluble y partículas más finas de dicho alimento.<sup>5,6</sup> Esta parte soluble puede representar una proporción considerable de nutrientes, en particular de nitrógeno en el caso de forrajes fermentados.<sup>38</sup> Por ello, varios investigadores<sup>24, 34, 38</sup> han optado por lavar las bolsas con la muestra previa fermentación, para eliminar la fracción soluble y además simular la salivación.

Se ha visto que la incubación prerruminal de pasta de soya en agua, por 15 min a 39°C, ocasiona la pérdida de 15% de nitrógeno y 27% de materia seca al aumentar el tamaño de poro de la bolsa.<sup>36</sup> Esto demuestra que la porosidad del material de la bolsa es de gran importancia al determinar la digestibilidad aparente de los alimentos estudiados.

En estudios realizados por Uden *et al.*<sup>55</sup> se observó mayor desaparición de pasto guineo (*Panicum maximum*)

cuando lo incubaron en bolsas de dacrón con poros de 53 μm, comparado con una incubación similar usando bolsas de nailon con poros de 20 a 35 μm. Por su parte Weakley *et al.*<sup>65</sup> encontraron que la digestibilidad *in situ* de soya o granos de destilería fue mayor al incubarlas en bolsas de nailon con poros invisibles. Estos autores también encontraron que la digestibilidad *in situ*, de una ración completa, aumentó cuando se incubó en bolsas de dacrón con poros de 54 μm en comparación con bolsas de acropore (5 μm).

Uden y Van Soest<sup>57</sup> demostraron que la digestibilidad de la pared celular de pasto timothy (*Phleum pratense L.*) aumentó al incrementarse el tamaño de poro de la bolsa. Murphy y Nicoletti<sup>32</sup> observaron que al emplear bolsas con tamaño de poro de 6 a 20 μm, se redujo significativamente la digestibilidad del nitrógeno de pasta de soya al compararlo con la digestibilidad obtenida al emplear bolsas con tamaños de poro mayores. En el trabajo realizado por Lindberg y Varvikko,<sup>25</sup> la desaparición de materia seca fue mayor en bolsas con poros de 36 μm, seguida por bolsas con poros de 20 μm y 10 μm, respectivamente.

También se ha visto<sup>4,17,65</sup> que el tamaño de poro afecta la entrada y salida de materia seca a través de la bolsa, lo que puede representar una pequeña fuente de error si entra materia seca exógena y se toma como parte del alimento estudiado.

Mehrez y Orskov<sup>28</sup> encontraron que las bolsas pueden retener materia seca exógena, aumentando 0.03 g el peso de las bolsas vacías. Weakley *et al.*<sup>65</sup> también observaron un aumento promedio de 0.01 g en bolsas vacías y lavadas que fueron incubadas por 24 h, con lo cual se puede subestimar la pérdida de materia seca.

Es difícil establecer el tamaño de poro que debe tener la bolsa; depende más del tamaño de partícula de la muestra y de la naturaleza y tipo de alimento investigado.<sup>24, 36</sup> Sin embargo, una porosidad de 40 a 60 μm parece ser adecuada para permitir la entrada de microorganismos y líquido ruminal, así como la salida del material digerido; es muy importante conocer el tamaño de poro y tipo de material del que están hechas las bolsas.<sup>36</sup>

Recibido para su publicación el 15 de noviembre de 1991

\* Departamento de Nutrición Animal, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga No. 15, Tlalpan, 14000, México, D.F.

### Tamaño de partícula

Al determinar la digestibilidad *in situ* de un alimento, éste no ha sido previamente masticado o sometido al proceso de rumia. Por tanto, debe molerse antes de someterlo a la incubación en el rumen.

Existe una gran controversia en el tamaño de partícula que debe tener el alimento sometido a estudios de digestibilidad *in situ*,<sup>31, 32, 33</sup> también si el alimento sometido a este tipo de estudios debe ser semejante al que se proporciona al animal o al que se obtiene después de la masticación y que llega al rumen. Generalmente partículas más grandes y enteras se asocian con una digestión más lenta, presentando los resultados mayor variación; las partículas más finas están sujetas a mayores pérdidas al incubarlas en las bolsas, lo que da por resultado tasas de digestión muy rápidas que, en ocasiones, pueden no ser reales. Sin embargo, la variación en los resultados es menor.<sup>36</sup>

No existen resultados concluyentes sobre el grado en que el tamaño de partícula influye sobre la digestibilidad *in situ* del alimento.

Weakley *et al.*<sup>64</sup> informan que la degradación de materia seca en pasta de soya fue menor al incubarla quebrada (2000 µm) que molida (520 µm). Ehle *et al.*<sup>8</sup> encontraron que los niveles de digestión de nitrógeno en varios alimentos fueron similares para las muestras con diferentes tamaños (1180, 600, 300 y 150 µm), al incubar 20 g de muestra en bolsas con tamaño de poro de 70 µm. En otro trabajo,<sup>65</sup> se observó que la pulverización (50 a 150 µm) de pasta de soya o granos de destilería aumentó la desaparición de materia seca y de nitrógeno.

Al moler el alimento (5 mm) aumenta la desaparición de nitrógeno y materia seca, en comparación con el alimento tal como lo consume el animal.<sup>35</sup> También el molido puede hacer variar el grado en que el nitrógeno y la materia seca son digeridos, ya que aumenta el área de superficie por unidad de peso de la muestra, haciéndola más accesible al ataque microbiano; además, partículas más pequeñas y uniformes dan por resultado una muestra menos variable y más uniforme. En trabajos realizados por Van Keuren y Heinemann,<sup>17</sup> no encontraron diferencias en la desaparición de materia seca en forrajes molidos con tamaños de 0.28, 0.42 y 0.84 mm, pero al disminuir el tamaño de partícula a menos de 0.6 mm hubo formación de grumos en la muestra, lo que disminuyó su digestibilidad. Solaiman *et al.*<sup>54</sup> observaron mayor digestibilidad de las paredes celulares de la alfalfa (*Medicago sativa*) y del pasto orchardgrass (*Dactylis glomerata*), al moler estos forrajes a un tamaño de 1 mm, que en partículas de 8 mm.

Es difícil establecer el tamaño de partícula más apropiado para estudios de digestibilidad *in situ*; el de 1-2 mm se considera como uno de los más adecuados.<sup>24, 34, 36</sup>

### Tamaño de la bolsa y cantidad de muestra

Las dimensiones de la bolsa y la cantidad de muestra son factores importantes que pueden afectar la digestibilidad *in situ* del alimento.

Playne *et al.*<sup>44</sup> estudiaron el efecto del tamaño de la bolsa sobre la digestibilidad *in situ* del alimento, manteniendo constante la cantidad de muestra (9 g); en este trabajo se usaron tres tamaños de bolsa (6 x 6, 6 x 12 y 6 x 18 cm). La digestibilidad de la muestra en la bolsa que medía 6 x 18 cm fue mayor que en las otras, lo cual podría reflejar no sólo un efecto debido al tamaño de la bolsa en sí, sino la motilidad de la muestra dentro del micro-ambiente de la bolsa.

La importancia de la relación cantidad de muestra: superficie de la bolsa ha sido demostrada por Mehrez y Orskov,<sup>28</sup> quienes incubaron 4.3 g de materia seca en bolsas de diversos tamaños (5 x 8, 17 x 9, 25 x 15 cm); observaron que la desaparición de materia seca de la bolsa más chica fue de 37.5% y en las otras dos de 85%. Ellos sugirieron que en la bolsa de 5 x 8 cm, no hubo una superficie suficiente para permitir la mezcla completa del alimento con el líquido y microorganismos ruminantes, ni la eliminación de productos finales del metabolismo de éstos. Por otra parte, el que la digestibilidad fuera similar en las bolsas más grandes (17 x 9 y 25 x 15 cm) indica que para tener una repetibilidad adecuada de los resultados, el tamaño de la bolsa debe ser de 17 x 9 cm para 5 g de muestra en base húmeda.

Lindberg<sup>21</sup> y Nocek<sup>36</sup> indican que la relación entre la superficie de la bolsa y el tamaño de muestra debe ser de 10 a 20 mg/cm<sup>2</sup> para la mayoría de los forrajes y concentrados. Sin embargo, la cantidad de muestra y el tamaño de la bolsa que se incuban dependerá del alimento estudiado, el tiempo que se va a incubar y el número de determinaciones o análisis que se quieran realizar en el residuo.<sup>36</sup>

### Acumulación de gas dentro de la bolsa

La acumulación de gas puede afectar la digestibilidad *in situ* del alimento, ya que puede causar que las bolsas floten, lo que impide su libre movimiento dentro del rumen y limita cualquier acción mecánica causada por los movimientos ruminantes. También puede reducir el flujo de líquido ruminal a la bolsa y la entrada de sustancias y microorganismos para digerir el alimento.

La producción de gas es un subproducto de la fermentación microbiana; por tanto su acumulación puede inhibir el metabolismo microbiano. Por otra parte, se ha observado que bolsas con tamaños de poro grande tienden a favorecer la acumulación de gas.

Uden *et al.*<sup>55</sup> y Nocek *et al.*<sup>37</sup> observaron acumulación de gas en bolsas con tamaño de poro entre 20 y 30 µm, mientras que Van Helleny y Ellis<sup>15</sup> no observaron acumulación de gas en bolsas con poros tan pequeños como 0.2 µm; asimismo estos autores y Weakley *et al.*<sup>63</sup> no observaron acumulación de gas en poros desde no aparentes hasta de 52 µm. En los estudios en los que no se observó acumulación de gas,<sup>15, 65</sup> la ausencia de gas en las bolsas se relacionó con la presencia de ingesta rica en fibra en el retículo-rumen, ya que las diferentes presiones y la acción abrasiva del material fibroso pudieron remover partículas pequeñas del alimento, o de limo bacteriano (exopolisacáridos bacterianos), de los poros de las bolsas, impidiendo la acumulación de gas.

## Residuos microbianos

La determinación de la degradación de la proteína del alimento con la técnica de digestibilidad *in situ* es una alternativa atractiva de los métodos de digestibilidad *in vivo*, debido a su simplicidad y reproducibilidad.

Sin embargo, como lo reconocen varios investigadores, la degradación real de la proteína puede ser errónea debido a la presencia de proteína microbiana en los residuos de alimento después de la incubación ruminal.<sup>16, 26, 27, 35, 38, 40, 43, 50, 59</sup>

Se ha demostrado<sup>16, 27, 35, 38</sup> que muchas especies bacterianas se asocian a las paredes celulares de las plantas a través de la cubierta de glucoproteínas, durante el proceso de degradación.

El grado de adherencia microbiana varía; en los concentrados generalmente hay poca,<sup>27, 28, 60</sup> mientras que en los forrajes es más elevada.<sup>38</sup> Por tanto, los errores en el cálculo de desaparición de proteína pueden ser mayores en forrajes con bajo contenido de proteína.

Varvikko y Lindberg<sup>60</sup> informan que la velocidad con que se dirigió la materia seca de forrajes fue mayor al hacer la corrección por residuos microbianos, que al no hacerla.

Nocek y Grant<sup>38</sup> encontraron una relación muy baja ( $r=-.19$ ) entre el nivel de digestión de nitrógeno y el contenido de fibra neutro detergente en diferentes forrajes. Sin embargo, al hacer la corrección para nitrógeno bacteriano, la relación entre la digestión de nitrógeno y concentración de fibra neutro detergente fue muy alta ( $r=-.83$ ).

La adherencia microbiana aumenta con el tiempo de incubación. Esto sugiere que las bacterias se unen a las partículas del alimento hasta un determinado tiempo de exposición ruminal; después, éstas se adhieren a otros sitios, según la disponibilidad del sustrato.

Además del tamaño de la partícula, al aumentar el tamaño del poro de la bolsa, se puede causar un aumento significativo en la adhesión de bacterias.<sup>60</sup>

Se recomienda que al menos en alimentos con bajo contenido de proteína, se haga la corrección debido a la adherencia microbiana, para lo cual se emplean distintos marcadores (ácido diaminopimélico, ácido ribonucleico (ARN), N<sup>15</sup>), pues si no se cuantifica en los residuos sin digerir, se reduce la confiabilidad de los resultados obtenidos en la digestibilidad *in situ*, para estimar la digestibilidad del nitrógeno, sobre todo en el caso de forrajes con bajo contenido de éste.<sup>36</sup>

## Animales

En la técnica de digestibilidad *in situ* se emplean diferentes especies animales: vacas adultas, vaquillas, borregos, cabras, caballos y cerdos.<sup>18, 20, 28, 37, 46, 51, 56, 57, 64</sup> Las especies que más se utilizan son bovinos y ovinos. Siddons y Paradine<sup>52</sup> compararon borregos con novillos alimentados con la misma dieta a nivel de mantenimiento. Observaron en los borregos mayor concentración de amoniaco en el rumen que en los novillos y menor concentración de ácidos grasos volátiles, mientras que el pH ruminal y la tasa de dilución

de fluidos en el rumen fueron similares.

Por su parte, Prigge *et al.*<sup>46</sup> observaron valores promedio mayores de retención de sólidos en el rumen en bovinos que en ovinos (26 y 17.4 h respectivamente), sin que hubiera diferencias en los niveles de dilución de líquido entre las dos especies.

Dentro de la misma especie, las diferencias relacionadas con el sexo y estado fisiológico pueden ocasionar variación. En diversos estudios se han encontrado diferencias en los parámetros ruminantes asociados a la edad, gestación y etapa de lactación.<sup>7, 14, 36, 45</sup> Muchas de estas diferencias pueden deberse a la relación entre el tipo de dieta que se proporciona y el estado fisiológico del animal, lo cual puede afectar otros factores ruminantes además de la digestión.<sup>46, 52</sup>

Sin embargo, un factor muy importante es la variación que puede haber entre animales, aun en las mismas condiciones fisiológicas, y la asociada al tiempo de incubación de las bolsas en el rumen. Mehrez y Orskov,<sup>28</sup> utilizando borregos, encontraron que las diferencias en la desaparición *in situ* de materia seca y de cebada se debieron a los diferentes valores observados entre animales, seguida por la variación entre días y entre bolsas. En contraste, Weakley *et al.*,<sup>65</sup> al emplear vacas, no encontraron diferencias entre animales en la desaparición *in situ* de materia seca y nitrógeno en pasta de soya. Estos autores sugieren, a partir de los resultados de su trabajo, que no son importantes los efectos relacionados con el animal en la digestibilidad *in situ* de la materia seca y nitrógeno, al menos en alimentos similares físicamente a la pasta de soya.

Para decidir qué animales deben emplearse en experimentos de digestibilidad *in situ*, se deben evaluar los objetivos específicos del experimento y de preferencia emplear el tipo de animales hacia los que está dirigida la investigación.

## Dieta

La dieta es el principal factor que determina la cantidad y tipo de microorganismos que se encuentran en el rumen y, por lo tanto, el grado de digestión de los nutrientes dietarios. Por ejemplo, la alimentación de dietas altas en concentrados con un elevado contenido de carbohidratos fermentables, reduce el pH ruminal y causa un cambio en la población microbiana, aumentando los organismos amilolíticos y disminuyendo los celulolíticos.<sup>22</sup>

Debido a que las muestras de alimento que se someten a pruebas de digestibilidad *in situ* están en íntimo contacto con los microorganismos ruminantes, es muy importante que se encuentren en el rumen aquéllos capaces de digerir el tipo de alimento estudiado,<sup>36</sup> por lo que es necesario proporcionar una dieta adecuada para favorecer su crecimiento.

Mertens y Lofton,<sup>29</sup> observaron que el grado de digestión de la pared celular de diferentes forrajes disminuyó al aumentar el contenido de almidón en la dieta de 0 a 80 porciento.

Weakley *et al.*<sup>65</sup> alimentaron vacas con dietas con 25, 40, 60 y 80% de heno de alfalfa, para evaluar la

digestibilidad del nitrógeno en pasta de soya. En las dietas que contenían 25% de heno se observaron los valores más bajos de digestión de nitrógeno y con 80% los más altos. Estos autores indican que además de los factores microbianos, algunos factores físicos asociados a la dieta pueden contribuir a aumentar la digestión, como la menor producción de limo bacteriano asociado a dietas altas en concentrados y la acción abrasiva entre la superficie de las bolsas y el material fibroso en las dietas altas en forrajes.

Algunos estudios<sup>12, 22, 23</sup> indican que dietas altas en concentrados disminuyen la digestibilidad de la fibra, por lo que en el caso de forrajes también puede disminuir la digestibilidad del nitrógeno; sin embargo los residuos bacterianos también pueden afectar esta interpretación.<sup>38</sup>

La concentración de nitrógeno y de energía en la ración han mostrado diferentes efectos sobre la digestibilidad *in situ* de diversos alimentos. De Faria y Huber<sup>11</sup> evaluaron la digestibilidad *in situ* de ensilado de maíz, ensilado de alfalfa y heno de pasto, en dietas con tres niveles diferentes de proteína (8.1, 11.3 y 13.3%) y de energía (39, 29.9 y 21%). Estos autores observaron que ni los niveles de proteína ni los de energía tuvieron un efecto significativo sobre la desaparición de la materia seca en ninguno de los forrajes.

Vik-Mo y Lindberg<sup>61</sup> indican que, en general, la desaparición de nitrógeno y materia seca en diferentes alimentos fue mayor con dietas altas en proteína. Otros investigadores<sup>13, 42</sup> han demostrado que la concentración de nitrógeno en el rumen carece de efecto sobre la desaparición *in situ* de la materia seca.

Conviene que la digestibilidad *in situ* de la dieta o componentes de la dieta que se van a estudiar se realice en animales alimentados con esa dieta o con dichos componentes. Sin embargo, cuando son muchos los alimentos que se desean estudiar, el tiempo necesario para adaptar a los animales a esa dieta o alimento puede ocasionar la pérdida de una de las mayores ventajas de la técnica de digestibilidad *in situ*, su rapidez.<sup>28, 49</sup> Por lo que los resultados obtenidos cuando no es posible adaptar a los animales a la dieta o alimento estudiado, deben ser considerados solamente como indicadores de la digestibilidad relativa de esa dieta o alimento.

### Posición de las bolsas dentro del rumen

Rodríguez<sup>48</sup> observó que la variabilidad entre duplicados en novillos se redujo cuando las muestras se incubaron en bolsas sujetas a un cordón de 50 cm de largo atado a la fístula ruminal, en comparación con las mismas muestras incubadas en bolsas atadas a cordones de 30 cm de largo. Este autor sugiere que la variación se redujo debido a que el cordón de 50 cm permite mayor movimiento de las bolsas en el rumen.

Mehrez y Orskov<sup>28</sup> llegaron a conclusiones similares, y recomiendan que en borregos las bolsas deben estar sujetas a un cordón de 25 cm de largo.

Es importante que las bolsas queden completamente sumergidas en el contenido ruminal, para reducir la variabilidad en los resultados obtenidos.

Se sugiere que para determinar la digestibilidad *in situ* de alimentos en el rumen, se utilicen bolsas con tamaño de poro de 40 a 60 µm, que el tamaño de partícula de la muestra se encuentre en 1-2 mm antes de ser incubada y que la relación entre la superficie de la bolsa y el tamaño de muestra sea de 10 a 20 mg/cm<sup>2</sup>. Los animales empleados de preferencia deben ser homogéneos en cuanto a peso, edad y sexo. Si no es posible proporcionar la dieta estudiada, se debe ofrecer una con 50% de forrajes y 50% de concentrados. Además las bolsas deben colocarse a una distancia adecuada dentro del rumen de acuerdo a la especie utilizada y permanecer el tiempo necesario para permitir su degradación ruminal. En cereales y suplementos proteínicos se considera conveniente incubarlos hasta por 24 a 48 h y en forrajes hasta por 72 a 96 h, si se quiere determinar la máxima degradación del alimento a nivel ruminal. Sin embargo, es muy importante establecer el tiempo de incubación de acuerdo a los objetivos del estudio, por lo que no es posible generalizar el tiempo que un determinado alimento debe permanecer en el rumen.

La técnica de digestibilidad *in situ* empleando bolsas de nailon es una forma útil y rápida para determinar la digestibilidad aparente de los alimentos en el rumen; no obstante, debe tenerse cuidado en no evaluar esta información en términos absolutos.

### Abstract

There are many factors which may affect *in situ* digestibility of livestock feed. In this review, some of the most important factors affecting *in situ* digestibility in ruminants, like bag porosity size, particle size, sample size to bag surface ratio, gas accumulation in the bags, microbial contamination, animal effects, dietary effects and position of the bags within the rumen, are discussed.

### Literatura citada

1. Arieli, A., Ben-Moshe, A., Zamwel, S. and Tagari, H.: *In situ* evaluation of the ruminal and intestinal digestibility of heat treated whole cotton seeds. *J. Dairy Sci.*, 72: 1228-1233 (1989).
2. Arieli, A., Bruckental, I. and Smoler, E.: Prediction of duodenal nitrogen supply from degradation of organic and nitrogenous matter *in situ*. *J. Dairy Sci.*, 72: 2532-2539 (1989).
3. Bailey, C.B.: Rates of digestion of swallowed and unswallowed dried grass in the rumen. *Can. J. Anim. Sci.*, 42: 49-54 (1962).
4. Belasco, I.J., Gribbins, M.F. and Kolterman, D.A.: The response of rumen microorganisms to pasture grasses and prickly pear cactus following foliar application of urea. *J. Anim. Sci.*, 17: 209-217 (1958).
5. Chalupa, W.: Amino-acid nutrition of growing cattle. In: Tracer studies on nonprotein nitrogen for ruminants. Proceedings of Research Coordinate Meeting Panel. Vienna, Austria. 1975. 175. International Atomic Energy Agency. Vienna, Austria (1975).
6. Crawford, J., Hoover, W.H., Sniffer, C.J. and Crooker, H.: Degradation of feedstuffs nitrogen in the rumen vs. nitrogen solubility in the three solvents. *J. Anim. Sci.*, 46: 1768-1775 (1978).
7. Ehle, F.R., Martin, F. and Wheaton, J.E.: Influence of forage source and level on intake, milk production, growth hormones, rate of passage and body composition during lactation. *Can. J. Anim. Sci.*, 64 (Suppl.): 82 (1984) (Abstr.).

8. Ehle, F.R., Murphy, M.R. and Clark, J.H.: *In situ* particle size reduction and dry matter in the rumen of dairy steers. *J. Dairy Sci.*, 65: 963-971 (1982).
9. Erasmus, L.J., Prinsloo, J. and Botha, P.M.: Establishment of a ruminal protein degradation data base for dairy cattle using the *in situ* polyester bag technique. 2. Energy sources. *South Afr. J. Anim. Sci.*, 20: 124-129 (1990).
10. Erasmus, L.J., Prinsloo, J., Botha, P.M. and Meissner, H.H.: Establishment of a ruminal protein degradation data base for dairy cattle using the *in situ* polyester bag technique. 3. Roughages. *South Afr. J. Anim. Sci.*, 20: 130-135 (1990).
11. Faria de, V.P. and Huber, J.T.: Influence of dietary protein and energy on disappearance of dry matter from different forage types from dacron bags suspended in the rumen. *J. Anim. Sci.*, 59: 246-252 (1984).
12. Ganev, G., Orskov, E.R. and Smart, R.: The effect of roughage or concentrate feeding and rumen retention time on total degradation of protein in the rumen. *J. Agric. Sci.*, 93: 651-656 (1979).
13. Grummer, R.R., Clark, J.H., Davis, C.L. and Murphy, M.R.: Effect of ruminal ammonia-nitrogen concentration on protein degradation *in situ*. *J. Dairy Sci.*, 67: 2294-2301 (1984).
14. Harnell, G.F. and Satter, L.D.: Determination of rumen fill, retention time and ruminal turnover rates of digesta at different stages of lactation in dairy cows. *J. Anim. Sci.*, 48: 381-392 (1979).
15. Hellen van, R.W. and Ellis, W.C.: Sample container porosities for rumen *in situ* studies. *J. Anim. Sci.*, 44: 141-146 (1977).
16. Kennedy, P.M., Hazlewood, G.P. and Milligan, C.P.: A comparison of methods for the estimation of the proportion of microbial nitrogen in duodenal digesta, and of correction for microbial contamination in nylon bags incubated in the rumen of sheep. *Br. J. Nutr.*, 52: 403-417 (1984).
17. Keuren van, R.W. and Heinemann, W.W.: Study of a nylon bag technique for *in vivo* estimation of forage digestibility. *J. Anim. Sci.*, 21: 340-345 (1962).
18. Koller, B.L., Hintz, H.F., Robertson, J.B. and Soest van, P.J.: Comparative cell wall and dry matter digestion in the caecum of the pony and the rumen of the cow using the *in vitro* and nylon bag techniques. *J. Anim. Sci.*, 47: 209-215 (1978).
19. Kunje, P.J.G., Ram, M. and Kukreja, J.L.: *In situ* dry matter disappearance and protein degradability of concentrate mixtures in the rumen of buffaloes. *Indian J. Anim. Nutr.*, 4: 77-82 (1987).
20. Laurent, F., Hasna, J. et Vignon, B.: Étude de la digestion des paille chez la chevre laitière à l'aide des sachets de nylon mobiles dans l'intestine. *Reprod. Nutr. Dév.*, 28 (Suppl. 1): 127-128 (1988).
21. Lindberg, J.E.: The effect of sample size and sample structure on the degradation of dry matter, nitrogen and cell walls in nylon bags. *Swed. J. Agric. Res.*, 11: 71-76 (1981).
22. Lindberg, J.E.: The effect of basal diet on the ruminal degradation of dry matter, nitrogenous compounds and cell wall in nylon bags. *Swed. J. Agric. Res.*, 11: 159-164 (1981).
23. Lindberg, J.E.: Rumen degradation pattern of dry matter and nitrogenous compounds of some concentrates studied with the nylon bag technique. *Swed. J. Agric. Res.*, 11: 171-176 (1981).
24. Lindberg, J.E.: Factors affecting predictions of rumen degradability using the nylon bag (*in sacco*) technique and a comparison between *in vivo* and *in vitro* degradability measurements. *Nutr. Abst. Rev. Ser. B*, 53: 715-716 (1983).
25. Lindberg, J.E. and Varvikko, T.: The effect of bag pore size on the ruminal degradation of dry matter, nitrogenous compounds and cell walls in nylon bags. *Swed. J. Agric. Res.*, 12: 163-171 (1982).
26. Marinucci, M.T., Dehority, B.A. and Loerch, S.C.: *In vitro* and *in vivo* studies of factors affecting digestion of feeds in synthetic fiber bags. *J. Anim. Sci.*, 70: 296-307 (1992).
27. Mathers, J.C. and Aitchison, E.M.: Direct estimation of the extent of contamination of food residues by microbial matter after incubation within synthetic fibre bags in the rumen. *J. Agric. Sci.*, 96: 691-693 (1981).
28. Mehrez, A.Z. and Orskov, E.R.: A study of the artificial bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. *J. Agric. Sci.*, 88: 645-650 (1977).
29. Mertens, D.R. and Lofton, J.R.: The effect of starch on forage fiber digestion kinetics *in vitro*. *J. Dairy Sci.*, 63: 1437-1446 (1980).
30. Mizuno, T., Okamoto, M. and Maeng, W.J.: Effects of amount of feed intake on protein digestibility in the rumen. *Res. Bull. Obihiro Univ. Ser. I*, 16: 15-23 (1988).
31. Moseley, G. and Jones, J.R.: The physical digestion of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) and white clover (*Trifolium repens*) in the foregut of sheep. *Br. J. Nutr.*, 52: 381-390 (1984).
32. Murphy, M.R. and Nicoletti, J.M.: Potential reduction of forage and rumen digest particle size by microbial action. *J. Dairy Sci.*, 67: 1221-1226 (1984).
33. Negi, S.S., Singh, B. and Makkar, H.P.S.: *In situ* rumen degradation of dry matter and nitrogen in some concentrate feed supplements. *Indian J. Anim. Nutr.*, 6: 1-12 (1989).
34. Nocek, J.E.: Evaluation of specific variables affecting *in situ* estimates of ruminal dry matter and protein digestion. *J. Anim. Sci.*, 60: 1347-1358 (1985).
35. Nocek, J.E.: Characterization of *in situ* dry matter and nitrogen of various corn grain forms. *J. Dairy Sci.*, 70: 2291-2301 (1987).
36. Nocek, J.E.: *In situ* and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility: A review. *J. Dairy Sci.*, 71: 2051-2069 (1988).
37. Nocek, J.E., Cummins, K.A. and Polan, C.E.: Ruminal disappearance of crude protein and dry matter in feeds and combined effect in formulated rations. *J. Dairy Sci.*, 62: 1587-1598 (1979).
38. Nocek, J.E. and Grant, A.L.: Characterization of *in situ* nitrogen and fiber digestion and bacterial nitrogen contamination of hay crop forages preserved at different dry matter percentages. *J. Anim. Sci.*, 64: 552-564 (1987).
39. Nocek, J.E. and Kohn, R.A.: *In situ* particle size reduction of alfalfa and timothy hay as influenced by form and particle size. *J. Dairy Sci.*, 71: 932-945 (1988).
40. Olubobokun, J.A., Craig, W.M. and Pond, K.R.: Effects of mastication and microbial contamination on ruminal *in situ* forage disappearance. *J. Anim. Sci.*, 68: 3371-3381 (1990).
41. Orskov, E.R. and McDonald, I.: The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighed according to rate of passage. *J. Agric. Sci.*, 92: 499-503 (1979).
42. Ortega, M.E., Stern, M.D. and Satter, L.D.: The effect of rumen ammonia concentration on dry matter disappearance *in situ*. *J. Dairy Sci.*, 62 (Suppl. 1): 79 (1979) (Abstr.).
43. Ould-Bah, M.V. et Michalet-Doreau, B.: Influence du traitement des fourrages verts sur la cinétique de dégradation *in sacco* de l'azote dans le rumen. *Reprod. Nutr. Dév.*, 28 (Suppl. 1): 103-104 (1988).
44. Playne, M.J., Khumnuathong, W. and Echevarria, M.G.: Factors affecting the digestion of oesophageal fistula samples and hay samples in nylon bags in the rumen of cattle. *J. Agric. Sci.*, 90: 193-204 (1978).
45. Pond, K.R., Goode, L., Leonard, E.S. and Mann, L.D.: Intake, digesta fill and flow kinetics pre- and postpartum. *Can. J. Anim. Sci.*, 64 (Suppl.): 68 (1984) (Abstr.).
46. Prigge, E.C., Baker, M.J. and Varga, G.A.: Comparative digestion, rumen fermentation and kinetics of forage diets by steers and wethers. *J. Anim. Sci.*, 59: 237-245 (1984).
47. Quin, J.I., Wath van der, J.G. and Myburgh, S.: Studies on the alimentary tract of Merino sheep in South Africa. 4. Description of experimental technique. *Onderstepoort J. vet. Sci. Anim. Ind.*, 11: 341-360 (1938).
48. Rodriguez, H.: *In vivo* bag digestibility: The relative position within the rumen. *Cuban J. Agric. Sci.*, 2: 285-287 (1968).
49. Roper, J.F.D.: The effect of fat encapsulation on the fate of labile nutrients in the ruminant gut. Ph. D. thesis. Department of Agricultural Biochemistry and Nutrition. University of Newcastle Upon Tyne. Newcastle Upon Tyne, England, 1987.
50. Sanderson, M.A. and Wedin, W.F.: *In situ* digestion of detergent fiber nitrogen in alfalfa stems. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 30: 1-9 (1990).

51. Sauer, W.C., Hargog den, L.A., Huisman, J., Leeuwen van, P. and Lange de, C.F.M.: The evaluation of the mobile nylon bag technique for determining the apparent protein digestibility in a wide variety of feedstuffs for pigs. *J. Anim. Sci.*, 67: 432-440 (1989).
52. Siddons, R.C. and Paradine, J.: Protein degradation in the rumen of sheep and cattle. *J. Sci. Food Agric.*, 34: 701-708 (1983).
53. Soest van, P.J., Sniffer, D.R., Martens, D.R., Fox, D.G., Robinson, P.H. and Krishnamoorthy, U.: A net protein system for cattle: The rumen submodel for nitrogen. In: Symposium on Protein Requirements for Cattle. Stillwater, Oklahoma. 1982. 265. Oklahoma State University. Stillwater, Oklahoma (1982).
54. Solaiman, S.G., Marty, F.A., Belyea, R.L. and Weiss, M.F.: Effect of diet composition and forage particle size on cell wall digestion rates of alfalfa and orchardgrass *in situ*. *J. Dairy Sci.*, 65 (Suppl. 1): 144 (1982) (Abstr.).
55. Uden, P., Parra, R. and Soest van, P.J.: Factors influencing reliability of the nylon bag technique. *J. Dairy Sci.*, 57 (Suppl. 1): 662 (1974) (Abstr.).
56. Uden, P. and Soest van, P.J.: Comparative digestion of timothy (*Phleum pratense*) fibre by ruminants, equines and rabbits. *Br. J. Nutr.*, 47: 267-272 (1982).
57. Uden, P. and Soest van, P.J.: Investigations of the *in situ* bag technique and a comparison of the fermentation in heifers, sheep, ponies and rabbits. *J. Anim. Sci.*, 58: 213-221 (1984).
58. Varga, G.A. and Whitsel, T.J.: Effect of nonstructural to structural carbohydrate ratio on rate and extent of nutrient utilization *in situ*. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 32: 275-286 (1991).
59. Varvikko, T.: Microbially corrected amino acid composition of rumen-undergraded feed protein and amino acid degradability in the rumen of feeds enclosed in nylon bags. *Br. J. Nutr.*, 56: 131-134 (1986).
60. Varvikko, T. and Lindberg, J.E.: Estimation of microbial nitrogen in nylon-bag residues by feed  $^{15}\text{N}$  dilution. *Br. J. Nutr.*, 54: 473-481 (1985).
61. Vik-Mo, L. and Lindberg, J.E.: *In sacco* degradability of protein (N) and dry matter in samples of individual feeds or combinations tested with diets medium or high in protein. *Acta Agric. scand.*, 35: 117-128 (1985).
62. Vuuren van, A.M., Bergsma, K., Frol-Kramer, F. and Beers van, J.A.A.: Effects of addition of cell wall degrading enzymes on the chemical composition and the *in sacco* degradation of grass silage. *Grass Forage Sci.*, 44: 223-230 (1989).
63. Waldo, D.R. and Glenn, B.P.: Comparison of new protein systems for lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 67: 1115-1133 (1984).
64. Weakley, D.C., Owens, F.N., Heath, D.G. and Shockley, B.J.: Particle size and soybean meal value for ruminants. *J. Anim. Sci.*, 45 (Suppl 1): 268 (1977) (Abstr.).
65. Weakley, D.C., Stern, M.D. and Satter, L.D.: Factors affecting disappearance of feedstuffs from bags suspended in the rumen. *J. Anim. Sci.*, 56: 493-507 (1983).