

Evaluación del método de lavado de bolsas (manual vs lavadora) en la técnica de degradación ruminal *in situ*

Evaluation of bag rinsing procedures (manual vs machine) in the *in situ* ruminal degradation technique

Armín Javier Ayala Burgos^a, Cintya María Rosado Rivas^a, Concepción Manuela Capetillo
Leal^a, Carlos Alfredo Sandoval Castro^a

RESUMEN

El lavado de las bolsas empleadas en la técnica de degradación ruminal es una etapa importante del proceso que necesita ser estandarizado. Así, el objetivo del presente experimento fue comparar el lavado manual y con lavadora, de las bolsas utilizadas en el proceso de degradación ruminal. Se incubaron tres forrajes en orden reverso para 96, 72, 48, 36, 24 y 12 h (ocho bolsas por tiempo). Las bolsas fueron divididas y lavadas a mano (hasta que el agua se observó limpia al ser mirada contra un fondo blanco) o en lavadora (cinco ciclos de 5 min con cambio de agua después de cada ciclo). No se encontró diferencia entre métodos ($P > 0.05$). El porcentaje de desaparición de la materia seca obtenida para ambas metodologías fue descrita como: lavadora = 0.08 (EE 2.995) + 0.973 (EE 0.0801) manual, r^2 0.9696. La pendiente obtenida no fue diferente de 1 y el intercepto no fue diferente de 0. Se concluye que si el método manual y con lavadora son estandarizados, producirán resultados similares.

PALABRAS CLAVE: *In situ*, Lavado, Metodología, Estandarización.

ABSTRACT

A comparison was made between manual and machine rinsing procedures for ruminal incubation bags in an effort to standardize this important stage in ruminal incubation analysis. Three forage materials were ruminally incubated in reverse order for 96, 72, 48, 36, 24 and 12 h (eight bags per time). Incubated sample bags were divided equally between the manual rinsing (under running water) and machine rinsing (five cycles, 5 min each with water change after each cycle) procedures. No difference was found between the two procedures ($P > 0.05$). Dry matter disappearance percentage after each incubation time was described as: machine = 0.08 (SE 2.995) + 0.973 (SE 0.0801) manual, r^2 0.9696. The slope for the data did not differ from 1 and the intercept did not vary from 0 ($P > 0.05$). It was concluded that if the machine and manual rinsing methods are standardized, they will produce similar results.

KEY WORDS: *In situ*, Rinsing, Methodology, Standardization.

La técnica de degradación ruminal *in situ*, mediante el uso de la bolsa de nylon, se emplea frecuentemente en la evaluación de alimentos para rumiantes. El método tiene la ventaja de ser rápido, sencillo y económico. La muestra es sometida a un ambiente ruminal real, por lo que el proceso de degradación será similar al esperado en la realidad (*in vivo*)⁽¹⁾.

The nylon bag *in situ* ruminal degradation technique is frequently used in the evaluation of ruminant feeds. It has the advantages of being fast, simple and low-cost. Also, the sample is submitted to a real ruminal environment, meaning the degradation process will be similar to that expected in reality (*in vivo*)⁽¹⁾. This technique has a number of known

Recibido el 17 de diciembre de 2002 y aceptado para su publicación el 5 de mayo de 2003.

^a Departamento Nutrición Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán. AP 4-116, Itzimmá. Km 15.5 Carretera Mérida-Xmatkuil. 97100. Mérida, Yucatán, México. Correspondencia y solicitud de separatas al primer autor.

La técnica tiene varias limitantes conocidas: la falta de un proceso de rumia sobre la muestra y su reducida posibilidad de escape, las características de la bolsas (tamaño, número y estabilidad del poro)⁽²⁾ y el procesamiento de la muestra incubada. El empleo de metodologías estandarizadas y la evaluación de los materiales y procedimientos contribuyen a reducir el error experimental asociado a esta técnica. Así, se ha demostrado la factibilidad de emplear diversos tipos de tela para la fabricación de las bolsas y obtener resultados similares, siempre que la selección del material se haga con criterios objetivos como los ya señalados: tamaño, número y estabilidad del poro⁽³⁾.

Una etapa importante de la metodología es el lavado de las bolsas después de su incubación en rumen, cuyo propósito es eliminar material contaminante, y evitar errores en la estimación de la desaparición de la muestra incubada. No obstante, este proceso es muy variable; una gran proporción (60 %) de investigadores emplea lavadoras, pero no mencionan fabricantes o programas de lavado empleados⁽⁴⁾. Al analizar los resultados de muestras idénticas incubadas en diferentes laboratorios, se concluyó que el lavado de las bolsas debería ser estandarizado para reducir la variación encontrada⁽⁵⁾. En nuestro laboratorio se ha estandarizado el lavado de bolsas, permitiendo reducir la variación entre operadores.

Se han comparado diversos procedimientos de lavado en lavadora^(4,6) encontrando que se pueden lavar simultáneamente hasta 200 bolsas sin afectar los resultados; sin embargo, si las muestras contienen partículas menores a 1 mm provocarán mayores pérdidas de material⁽⁷⁾. Adicionalmente, la severidad del lavado (agitado y centrifugado) tendría una influencia sólo en materiales con partículas pequeñas.

El procesamiento manual de un gran número de bolsas emplea una gran cantidad de tiempo, y está sujeto a una variación por efecto de operador (intensidad de lavado, criterio de limpieza y cansancio), por lo que procesos que permitan agilizar esta operación y obtener resultados similares es deseable. Así, Cherney *et al.*⁽⁶⁾ realizaron una comparación de lavado manual y con lavadora, y concluyeron que un ciclo de 2 min era más adecuado

limitations, including lack of a rumination process on the sample, reduced escape possibility, bag characteristics (i.e. size, number and pore stability)⁽²⁾ and processing of the incubated sample. The use of standardized methods and evaluation of materials and procedures contribute to reducing experimental error in this technique. For example, the feasibility of using different types of fabric for bag manufacture has been proven as long as objective criteria are used (e.g. size, number and pore stability)⁽³⁾.

Bag washing after incubation in the rumen is an important step in the methodology. It is intended to eliminate contaminating material and avoid errors in incubated material disappearance estimation. This process is extremely variable, however, and most researchers (60 %) use washing machines, though they do not mention the machine characteristics or the wash cycle used⁽⁴⁾. After analyzing results from identical samples incubated in different laboratories, it has been concluded that bag rinsing should be standardized to reduce results variation⁽⁵⁾. Bag rinsing has been standardized in our laboratory and has effectively reduced results variation between operators.

A number of machine rinsing procedures have been compared^(4,6) and it has been determined that up to 200 bags can be simultaneously rinsed without affecting results. However, if samples contain particles smaller than 1 mm, this will lead to greater material loss⁽⁷⁾. The intensity of the rinse (agitation and centrifugation) should also only affect materials with smaller particles.

Manual processing of a large number of bags requires lots of time and is subject to variation depending on the operator (e.g. rinsing intensity, criteria and fatigue). Processes that facilitate this operation and results standardization are an advantage. To this end, Cherney *et al.*⁽⁶⁾ compared manual and machine rinsing and found that a 2 min machine rinse cycle was more effective than manual rinsing, and that it allowed simultaneous rinsing of up to 200 bags. The greatest source of variability in manual rinsing is likely the lack of uniform criteria to determine when a bag is adequately rinsed.

que el lavado manual, permitiendo este último lavar hasta 200 bolsas simultáneamente. La mayor variabilidad del procedimiento manual puede deberse a la falta de criterios uniformes para determinar cuando una bolsa se encuentra limpia.

El objetivo del presente trabajo fue la evaluación del proceso de lavado manual empleando el criterio de observación visual contra fondo blanco, con el que usa una lavadora para la limpieza de las bolsas empleadas en la incubación ruminal de alimentos, midiendo la digestibilidad de tres forrajes tropicales.

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UADY. Se utilizaron cuatro vacas cruzadas (*Bos taurus* x *Bos indicus*) de 350 kg y cuatro años de edad.

Se colectaron muestras de pasto Taiwán (*Pennisetum purpureum*), Ramón (*Brosimum alicastrum*) y pasto estrella (*Cynodon nlemfluensis*) las cuales se secaron a 60 °C, molidas en un molino de martillo (2 mm) y conservadas en recipientes de plástico hermético hasta su uso.

Se emplearon bolsas de nylon de 7 x 14 cm con un tamaño de poro de 55 a 70 μ (Lockertex, Warrington, England). En cada bolsa se depositaron 3 g de materia seca (MS) de los distintos materiales evaluados, identificando cada bolsa de manera individual. Los tiempos de incubación empleados fueron 12, 24, 36, 48, 72 y 96 h, incubadas en orden inverso para ser retiradas todas ellas simultáneamente. En total se incubaron dos bolsas por tiempo para cada animal, totalizando ocho bolsas por tiempo, por material.

Transcurrido el tiempo de incubación, las bolsas fueron retiradas del rumen, y colocadas en un contenedor de agua fría para retirar el exceso de material ruminal y detener la actividad microbial. Las ocho bolsas correspondientes a cada tiempo de incubación fueron subsecuentemente divididas en los dos tratamientos: lavado manual, y lavado en lavadora.

El lavado manual consistió en la limpieza (individual) bajo un chorro de agua a temperatura

The present study objective was to evaluate the manual rinsing process, using visual observation against a white background, versus a machine rinsing process for rinsing bags used in feed ruminal incubation and measuring digestibility in three tropical forages.

The study was carried out at the Animal Nutrition Laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of the Autonomous University of Yucatan (Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán) using four cows (*Bos taurus* x *Bos indicus* cross), each was four years of age and weighed 350 kg.

Samples of Taiwan grass (*Pennisetum purpureum*), ramon tree (*Brosimum alicastrum*), and star grass (*Cynodon nlemfluensis*) were collected. These were dried at 60 °C, milled in a hammer mill (2 mm) and stored in hermetic plastic containers until use. Nylon bags were used measuring 7 x 14 cm and with a 55 a 70 μ pore size (Lockertex, Warrington, England). Samples of 3 g dry material from one of the evaluated materials were placed in each bag, and the bags were labeled individually. Incubation times were 12, 24, 36, 48, 72 and 96 h, incubated in inverse order to remove all bags simultaneously. A total of two bags per time per animal were incubated, for a total of eight bags per incubation time per forage material.

The bags were removed from the rumens when the incubation period ended and placed in a container of cold water to remove excess ruminal matter and stop microbial activity. The eight bags for each incubation time were then divided into two treatments, with four bags subjected to manual rinsing and four to machine rinsing. Manual processing involved individual rinsing of each incubation bag under flowing water at room temperature (approx. 20 °C). This was continued until the water from each bag, forced from the bag by hand squeezing into a transparent glass precipitate cup (100 to 120 ml nominal capacity), was seen to be colorless and particle-free against a white background.

For machine processing, the 24 bags for each incubated material were grouped together and placed

ambiente (aproximadamente 20 °C) de cada una de las bolsas de incubación, pasando agua a través de ellas hasta que el agua que saliera de cada una al exprimirla en un vaso de precipitado de cristal transparente (100 a 120 ml capacidad nominal), se observara limpia (sin color y sin partículas) sobre un fondo blanco.

Para el proceso en lavadora (Whirlpool, mod. ELA8624FQ0), se agruparon las 24 bolsas correspondientes a cada material incubado, en bolsas de malla (25 x 40 cm), y se colocaron simultáneamente los tres grupos (72 bolsas) en la lavadora, empleando el ciclo regular y agua a temperatura ambiente (aproximadamente 20 °C). Las bolsas se sometieron a cinco ciclos de lavado de 5 min, cambiando el agua de lavado después de cada ciclo, sin emplear el centrifugado, tiempo tras el cual el agua residual del lavado se observó limpia. Concluidos los cinco ciclos, las bolsas de nylon se abrieron y se colocaron por breves instantes bajo un flujo de agua de llave para lograr que la muestra remanente se ubicara en el fondo de la bolsa. Una vez concluido el lavado de todas las bolsas, éstas fueron secadas a 60 °C por 48 h, pesadas, y se calculó la desaparición del material por diferencia entre el material incubado y el material residual después del lavado.

Los datos de cada material incubado se analizaron por separado empleando un diseño factorial de seis tiempos de incubación por dos tipos de lavado, considerando la interacción tiempo por tipo para la partición del error (Proc GLM). Adicionalmente, la relación entre el valor obtenido por lavado manual y lavadora fue analizado por medio de una regresión lineal. Los análisis fueron realizados mediante el paquete estadístico Minitab 12⁽⁸⁾.

El proceso de lavado de las bolsas no tuvo un efecto ($P > 0.05$) sobre los valores de desaparición de la materia seca a partir de las bolsas incubadas en el rumen. La excepción fue el valor obtenido para lavadora con las muestras de pasto taiwán a 48 h, valor significativamente menor ($P < 0.05$) al obtenido por el proceso manual, inclusive numéricamente menor al valor obtenido a las 36 h. Debido a la observación irregular en la hora 48

in a single 25 x 40 cm mesh bag. All three group bags (72 bags total) were then simultaneously placed into the washing machine (Whirlpool, mod. ELA8624FQ0), and rinsed using the regular cycle and room temperature (approx. 20 °C) water. The bags were rinsed in five, five minute rinse cycles, without centrifuging, after which the residual rinse water was seen to be clean. After the five rinse cycles the nylon bags were opened and briefly placed under flowing tap water to wash the remaining sample into the bottom of the bag. Once all the bags were rinsed they were dried at 60 °C for 48 h, weighed and the material disappearance calculated by the difference between the incubated material and post-rinse residual material.

The data for each incubated material was separately analyzed using a factorial design of six incubation times by two rinse types, using the time/type interaction for error separation (Proc GLM). Also, the ratio between the manual rinse and machine rinse values was analyzed using linear regression. All analyses were done using Minitab 12⁽⁸⁾ statistics package.

The two bag rinsing processes had no effect on dry material disappearance values from the rumen incubated bags. The one exception was the machine rinse value for the Taiwan grass samples incubated for 48 h, which was significantly less ($P < 0.05$) than the corresponding manual rinse value. This same machine rinse value was also numerically smaller than the manual rinse value at 36 h. Because of the irregular result for the Taiwan grass 48 h sample, the relationship for the two processes was described with and without this value, using the following equations:

With 48 h value;

$$\text{Machine (\%)} = 1.92 \text{ (SE 4.753)} + 0.931 \text{ (SE 0.0700) manual; } r^2 \text{ 0.9171}$$

Without 48 h value;

$$\text{Machine (\%)} = 0.08 \text{ (SE 2.995)} + 0.973 \text{ (SE 0.0801) manual; } r^2 \text{ 0.9696}$$

In both cases, the slope did not differ from 1 and the intercept did not vary from 0 ($P > 0.05$). With

para el pasto Taiwán, la relación de los dos procedimientos fue descrita con y sin este valor por las siguientes ecuaciones:

Con el valor de 48 h:

$$\text{Lavadora (\%)} = 1.92 \text{ (EE 4.753)} + 0.931 \text{ (EE 0.0700) manual; } r^2 \text{ 0.9171}$$

Sin el valor de 48 h:

$$\text{Lavadora (\%)} = 0.08 \text{ (EE 2.995)} + 0.973 \text{ (EE 0.0801) manual; } r^2 \text{ 0.9696}$$

En ambos casos la pendiente no es diferente de 1, ni el intercepto de 0 ($P > 0.05$); en el primer caso únicamente el dato de 48 h ya señalado queda fuera de los límites del intervalo de confianza (95 %). En el segundo caso, todas las observaciones se encuentran dentro del intervalo de confianza, por lo que se puede concluir que ambas metodologías aportan el mismo resultado.

Punto importante del presente trabajo radica en la implementación del criterio uniforme de lavado manual ya mencionado, lo que permitió obtener los mismos resultados con ambas metodologías, y permite obtener confianza en la implementación de cualquiera de ellas en el laboratorio.

the first equation, only the data for the 48 h Taiwan grass sample was outside the confidence interval limits (95 %), while with the second equation all the values were within the confidence interval. It can be concluded, therefore, that both methodologies provide the same result.

An important aspect of this study is the use of uniform criteria in the manual rinse process. This allows the same results to be produced with both rinse methodologies, meaning either can be used confidently in the laboratory.

The individual material break down shows that, with the exception of the machine rinse Taiwan 48 h samples, no difference was observed between rinse procedures (Table 1). Simultaneous rinsing of all the bags in the washing machine did not appear to affect the results, which coincides with reports in the literature^(4,6). Confirming this allows processing of large numbers of bags (post-incubation) with a fast, uniform process that reduces or altogether avoids individual manual rinsing.

The similarity in the results for the two rinse procedures was expected since no factors that have been reported to modify machine rinse results (i.e.

Cuadro 1. Efecto del tipo de lavado sobre la medición de la desaparición de materia seca a partir de bolsas de nylon incubadas en rumen de bovinos (%)*

Table 1. Effect of rinse type on measurement of dry material disappearance from nylon bags incubated in bovine rumens (%)*

hours	Taiwan grass		Ramon		Star grass	
	Manual	Machine	Manual	Machine	Manual	Machine
12	37.78 ^a	39.11 ^a	57.00 ^a	51.03 ^a	35.98 ^a	36.65 ^a
24	55.18 ^a	53.65 ^a	73.98 ^a	68.23 ^a	50.79 ^a	46.21 ^a
36	62.68 ^a	62.11 ^a	74.44 ^a	75.23 ^a	55.94 ^a	55.84 ^a
48	77.58 ^a	60.89 ^b	82.82 ^a	76.32 ^a	62.92 ^a	58.90 ^a
72	79.38 ^a	76.25 ^a	83.66 ^a	83.79 ^a	67.07 ^a	64.51 ^a
96	81.45 ^a	81.61 ^a	84.20 ^a	84.19 ^a	70.48 ^a	71.13 ^a
SE	2.604		2.446		1.866	

* 4 bags per time and rinse method.

SE= standard error.

ab Values with different letter superscript in the same row are statistically different ($P < 0.05$)

El desglose de cada material individual se presenta en el Cuadro 1. Se observa que salvo la muestra ya señalada (Taiwán 48 h) no existe diferencia entre los procedimientos de lavado. Es importante señalar que el lavado simultáneo de las bolsas en la lavadora no parece afectar el resultado, concordando con lo mencionado en la literatura^(4,6). La confirmación de este resultado permite que el proceso de un gran número de bolsas (post-incubación) sea de una manera más rápida y uniforme, al reducir o evitar el proceso individualizado de lavado.

La similitud de los resultados obtenidos por los dos procedimientos era esperada, ya que se evitó emplear el centrifugado, tamaño de partícula ≤ 1 mm y el empleo de detergentes, factores que han sido mencionados como efectos principales en la modificación de los resultados de lavado^(6,7,9,10)

Puede concluirse que el lavado a mano y con lavadora de bolsas incubadas en el rumen producirá resultados similares; sin embargo, es necesario llevar a cabo evaluaciones adicionales que confirmen las metodologías empleadas.

LITERATURA CITADA

1. Arieli A, Werner D. Calorimetric determination of the degradation rate of rapidly fermentable organic matter of forages. *Anim Feed Sci Technol* 1989;26:299-308.
2. Nocek JE. In situ and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility: A review. *J Dairy Sci* 1988;71:2051-2069.
3. Rosado RCM, Ayala BAJ. Estandarización de la técnica de degradación ruminal 1. Evaluación de telas locales [resumen]. XXXV Reunión nacional de investigación pecuaria. Mérida, Yuc. 1999:226.
4. Huntington JA, Givens DI. Studies on in situ degradation of feeds in the rumen: 2. The effect of bag numbers incubated and post-incubation processing of residues. *Anim Feed Sci Technol* 1997;68:115-129.
5. Wilkerson VA, Klopfenstein TJ, Stroup WW. A collaborative study of in situ forage protein degradation. *J Anim Sci* 1995;73:583-588.
6. Cherney DJR, Patterson JD, Lemenager RP. Influence of in situ bag rinsing technique on determination of dry matter disappearance. *J Dairy Sci* 1990;73:391-397.
7. Hyslop J. The storage and nutritional value of wet malt distillers grains for ruminants [PhD thesis]. Glasgow, Glasgow University; 1991.
8. Minitab 12. Minitab User's Guide 2; Data analysis and quality tools. State College, PA, USA. 1997.
9. Kridis MS. Energy evaluation of grass silage [PhD thesis]. Glasgow, Glasgow University; 1989.
10. Givens DI, Deaville ER, Moss AR. The effect of fertilizer nitrogen on the solubility and rumen degradability of dry matter and nitrogen in wheat grain. *Anim Feed Sci Technol* 1990;66:247-256.

End of english version
