

Evaluación de la relación entre experimentos *in vitro* e *in situ* mediante un modelo dinámico mecanístico

Evaluation of the relationship between *in vitro* and *in situ* experiments by means of a dynamic mechanistic model

Luis Vargas-Villamil^a, Eric Ávila-Vales^b, Felipe Vargas-Villamil^c, Salvador Medina-Peralta^d

RESUMEN

Se desarrolló un modelo dinámico mecanístico del sistema ruminal (*Koókey*), para explicar las posibles causas de las diferencias encontradas entre las correlaciones de las variables obtenidas con las técnicas de la bolsa de nylon y la producción de gas *in vitro*. Este modelo describe de manera simplificada las reacciones anteriores a la producción de gas. Para el análisis se utilizaron los resultados de dos trabajos publicados, en los que se estudió, la degradación y la producción de gas de las hojas de maíz (DHM) y del ensilado (DEM). Utilizando el modelo y el conjunto de datos DHM y DEM se obtuvo la relación de producción acumulada de gas por unidad acumulada de materia seca degradada, para cada una de ellos. Para este fin, se utilizó una tasa fraccionaria de fermentación de $(k_{Sm,SmF})=0.20 \text{ h}^{-1}$ ó 0.40 h^{-1} . El tiempo de incubación para DHM fue de 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96 h mientras que para DEM fue de 2, 4, 8, 24 48 h. Se discuten las suposiciones del modelo, en especial las diferencias y similitudes entre las técnicas, y la relación entre el gas producido como función de la masa fermentada. Se concluye que las diferencias en los valores de las correlaciones son consecuencia de las diferencias entre los procesos de degradación y $k_{Sm,SmF}$, que es una entidad propuesta en este trabajo; y no como una diferencia de las características inherentes a la utilización de las técnicas *in situ* e *in vitro*.

PALABRAS CLAVE: Modelo mecanístico dinámico, Rumen, *In situ*, *In vitro*, Degradación, Gas, Maíz, Fermentación.

ABSTRACT

A dynamic mechanistic model (*Koókey*) of the ruminal system was developed. It is used to explain the possible causes of the differences found between the statistical correlations of the variables obtained using *in situ* nylon bag and *in vitro* gas production methods. This model describes in a simplified form the reactions that precede the gas production. The results published in two papers which studied the degradation and gas production of corn leaves (DHM) and silage (DEM) were used for the analysis. The model developed in this work was used to calculate the ratio of *in vitro* cumulative gas production per unit of degraded cumulative dry matter (DM) for the DHM and DEM data sets. With this purpose a fermentation fractionary rate of $(k_{Sm,SmF})=0.20 \text{ h}^{-1}$ and 0.40 h^{-1} was used. The DHM incubation time was 3, 6, 12, 24, 48, 72, and 96 h, while the DEM incubation time was 2, 4, 8, 24, and 48 h. The model assumptions are discussed. Special attention is given to the differences and similarities between the *in situ* and *in vitro* techniques and the produced gas as a function of the fermented mass. It is concluded that the statistical correlation differences are a result of the differences between the degradation processes and the $k_{Sm,SmF}$, which is an entity proposed in this study; they are not a result of the characteristics inherent to the utilization of *in vitro* and *in situ* techniques.

KEY WORDS: Dynamic mechanistic models, Rumen, *In situ*, *In vitro*, Degradation, Gas, Corn, Fermentation.

Una de las desventajas de los métodos *in vitro* para la obtención de datos cinéticos es que estos pueden ser diferentes del ambiente *in vivo*⁽¹⁾. Esta

One of the disadvantages shown by *in vitro* methods when used to obtain kinetic data is that it varies from the *in vivo* environment⁽¹⁾. This deficiency

Recibido el 30 de enero de 2004 y aceptado para su publicación el 17 de agosto de 2004.

a Colegio de Postgraduados *Campus* Tabasco, Periférico Carlos A. Molina Km. 3.5, AP 24, 86500, Cárdenas Tab., México. Tel +52 (937) 372-2386, Fax +52 (937) 372-2297. lvillamil@colpos.mx. Correspondencia al primer autor.

b Unidad de Posgrado e Investigación. Facultad de Matemáticas. Universidad Autónoma de Yucatán.

c Programa de Matemáticas Aplicadas y Computación. Instituto Mexicano del Petróleo.

d Facultad de Matemáticas, Universidad Autónoma de Yucatán.

deficiencia puede ser una ventaja cuando el objetivo es estudiar las propiedades intrínsecas del alimento o sustrato animal (SA), o se desea aislar algún fenómeno para su estudio.

Algunos investigadores han utilizado el método de producción de gas *in vitro* para evaluar la degradación de los alimentos. Tuah *et al.*⁽²⁾ encontraron en alimentos diferentes, que la correlación entre las degradaciones calculadas por los métodos *in situ* y producción de gas *in vitro*, a diferentes tiempos es alta, positiva y significativa ($r = 0.58$ a 0.95), recomendando una malla para molido de 3 mm para evitar el vaciado de material no degradado al medio. Sin embargo, Valentin *et al.*⁽³⁾ encontraron, al estudiar 416 coeficientes de correlación, solamente 15 % de correlaciones significativas ($P < 0.05$; $r > 0.63$) con dietas a base de ensilado de maíz con una malla para molido de 1 y 3 mm. Aunque, con el método *in vitro*, no encontraron grandes diferencias entre los dos tipos de molido, concluyen que el vaciado de material por los poros de la bolsa del método *in situ*, es lo que influyó en la degradación por los dos métodos; ya que el ensilado de maíz al secarse durante el experimento se volvió muy quebradizo.

Los métodos *in situ* y producción de gas *in vitro* no miden los mismos fenómenos, pero en ambos casos están relacionados con la población microbiana. Algunos modelos utilizados, como bases de las funciones de regresión, durante la estimación de parámetros cinéticos, en la técnica de producción de gas *in vitro*, asumen que la tasa a la cual el gas se produce es directamente proporcional a la tasa a la cual (SA) es degradado⁽⁴⁾. Se considera que la producción de gas por unidad de masa fermentada (f_{Gi}, F_i) es constante, sin embargo ésta puede variar⁽⁴⁾. La cantidad de gas producido depende de las relaciones estequiométricas y de las cantidades relativas de ácidos grasos volátiles (AGV)⁽⁵⁾. De cada mol de AGV liberado se forman 0.87 moles de gas proveniente de la reacción con el buffer⁽⁶⁾. El 50 % del volumen de gas es CO_2 y CH_4 proveniente de la fermentación de (SA) y el resto del buffer⁽⁷⁾. Por lo general, la producción de gas se mantiene constante cuando (SA) es un forraje y disminuye cuando aumenta la concentración de fibra⁽⁸⁾; una concentración alta de propionato (Pr)

could be an advantage when the objective is to study the intrinsic properties of the food or animal substratum (AS) or to isolate a phenomenon.

Some researchers have used *in vitro* gas production to assess degradation of feeds. Tuah *et al.*⁽²⁾ found that in feeds, the correlation between the degradation calculated using *in situ* and *in vitro* gas production methods at different periods is high, positive, and significant ($r = 0.58$ to 0.59). They recommend a 3 mm sieve to prevent the escape of non degraded material into the environment. However, when studying 416 correlation coefficients (in diets based on corn silage using 1 and 3 mm sieves), Valentin *et al.*⁽³⁾ found that only 15 % of them have a significant statistical correlation ($P < 0.05$; $r > 0.63$). Although, with the *in vitro* method, no major differences were found between the two types of grounds, they conclude that the emptying of material through the bag pores in the *in situ* method is what influenced the degradation in both methods. The corn silage became very brittle while drying during the course of the experiment.

In situ methods and *in vitro* gas production do not measure the same phenomena, however both are related to microorganism population. Some of the models used when estimating kinetic parameters, in the *in vitro* gas production method, assume that the rate at which gas is produced is directly proportional to the rate at which (AS) is degraded⁽⁴⁾. Gas production per unit of fermented mass (f_{Gi}, F_i) is generally assumed constant, however, it may change⁽⁴⁾. The amount of gas produced is a function of the stoichiometry and the relative amount of volatile fatty acids (VFA)⁽⁵⁾. One mol of VFA reacts with the buffer to form 0.87 mols of gas⁽⁶⁾. Half of the gas volume is CO_2 and CH_4 coming from the fermentation of AS, and the remainder from the buffer⁽⁷⁾. A high propionate (Pr) concentration is associated with a lower gas production, owing to an extra carbon included in the Pr that otherwise it would be transformed in CO_2 ⁽⁹⁾. In general, the gas production remains constant when AS is forage and decreases when the fiber content increases⁽⁸⁾. Some researchers think that differences in AS's chemical composition affect the system's behavior due to the differences in the rates and extent of the degradation, pH, and VFA production and molar compositions⁽⁴⁾.

está asociada con una producción más baja de gas, debido a un carbón extra incluido dentro del Pr que de otra forma se transformaría en CO_2 ⁽⁹⁾. Algunos investigadores opinan que las diferencias en la composición química de (SA) afectan el comportamiento del sistema, debido a las diferencias en las tasas y extensión de la degradación, pH, producción y proporciones molares de AGV⁽⁴⁾.

Uno de los aspectos que no han sido estudiados con detalle, es la tasa fraccionaria de la fermentación de la MS (k_{S_m, S_mF}) que queda suspendida en el líquido ruminal después de la degradación. Debido a la complementariedad de las técnicas *in situ* e *in vitro*, y de su relación indirecta en el sistema ruminal, se pretende, utilizar la información obtenida experimentalmente de esas técnicas para estudiar si k_{S_m, S_mF} es capaz de ayudarnos a explicar las diferencias obtenidas entre dos experimentos similares^(2,3), donde se estudió la correlación entre los resultados *in situ* e *in vitro*. Los resultados de trabajos como el presente, permitirán distinguir la utilidad y el alcance de cada una de estas técnicas y de los modelos dinámicos mecanísticos como herramientas para la obtención de información específica y general del sistema ruminal.

Se desarrolló y se obtuvo la solución analítica de un modelo dinámico mecanístico (*Koókay*) con la intención de analizar dos trabajos publicados^(2,3), donde se llegaron a conclusiones diferentes al relacionar los resultados obtenidos con las técnicas; de la bolsa de nylon *in situ* y producción de gas *in vitro*. El modelo *Koókay* que en maya significa luciérnaga, describe de una manera simplificada las principales reacciones (degradación, solubilización y fermentación) anteriores a la producción de gas en el sistema ruminal (Figura 1). Se decidió trabajar con maíz, ya que es un material común en los dos trabajos, por lo que del primero⁽²⁾ se utilizaron los datos de la evaluación de las hojas de maíz (DHM) y del segundo⁽³⁾ del ensilado de maíz (DEM).

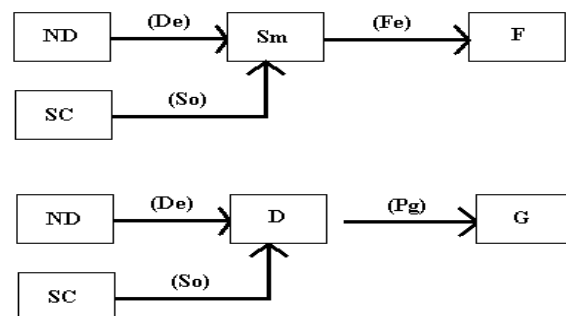
El presente trabajo consistió de dos estudios. En el primero, se comparó el efecto del cambio de k_{S_m, S_mF} a partir del material degradado y solubilizado en el medio ruminal para los dos conjuntos de datos^(2,3). En el segundo, se obtuvo, para cada uno de los conjuntos de datos (DHM y

One of the aspects that has not been studied in detail is the DM fractionary fermentation rate (k_{S_m, S_mF}), which remains suspended in the rumen fluid after degradation. Due to the complementarity of the *in situ* and *in vitro* techniques, and to their indirect relationship to the ruminal system, the researchers sought to use the information obtained experimentally from these techniques to determine if k_{S_m, S_mF} can help to explain the differences found in two similar experiments^(2,3), in which the correlation between *in vitro* and *in situ* results were studied. Results of studies similar to this one, will allow a distinction to be made between the use and scope of each technique and of the mechanistic dynamic models as tools for understanding the ruminal system.

An analytical solution of a dynamic mechanistic model (*Koókay*) is obtained. The objective is to analyze the data of two papers^(2,3) which arrived at different conclusions when results obtained through the *in situ* nylon bag and *in vitro* gas production techniques were compared. The *Koókay* model (a Mayan word meaning firefly), describes in a simplified form the main reactions (degradation, solubilization, and fermentation) previous to the gas production in the ruminal system (Figure 1). Corn was chosen, because it is used in both studies.

Figura 1. Representación esquemática del modelo *Koókay*

Figure 1. Schematic representation of the *Koókay* model



ND=fairly degradable phase; SC=highly degradable phase; F=fermented substratum; De=Degradation; So=Solubilization; Fe=Fermentation; Pg=Gas production

Note. The boxes represent the variables in physical states and arrows represent flows.

DEM), utilizando el modelo, la relación de producción acumulada de gas *in vitro* por unidad acumulada de materia seca (MS) degradada (G:D; ml de gas producido *in vitro* por mg de MS degradada *in situ*) para $k_{Sm,SmF} = 0.20 \text{ h}^{-1}$ ó 0.40 h^{-1} . Para el caso de DHM los tiempos obtenidos fueron $t_{iDHM} = \{3, 6, 12, 24, 48, 72, 96\}$ h. En el caso de DEM fueron $t_{iDEM} = \{2, 4, 8, 24, 48\}$ h. Debido a que son trabajos publicados, los tiempos son los reportados por los autores. Finalmente, se utilizó la información de los dos estudios, para evaluar las diferencias estadística y cinéticas de los dos tratamientos. El modelo *Koókay* (Cuadro 1) utilizado en el trabajo se desarrolló como un sistema de ecuaciones diferenciales (ecuaciones 1a,1b,1c).

$$(1a) \quad \begin{bmatrix} \frac{dQ_{ND}}{dt} \\ \frac{dQ_{SC}}{dt} \\ \frac{dQ_{Sm}}{dt} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -k_{ND,NDSm} & 0 & 0 \\ 0 & -k_{SC,SCSm} & 0 \\ k_{ND,NDSm} & k_{SC,SCSm} & -k_{Sm,SmF} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} Q_{ND} \\ Q_{SC} \\ Q_{Sm} \end{bmatrix}$$

Data on leaf evaluation (DHM) from the first⁽²⁾ and on silage (DEM) from the second study⁽³⁾ were used.

The present paper is made up of two studies. In the first, the effect of changes in the fractionary fermentation rate ($k_{Sm,SmF}$) was studied based on the degraded and solubilized material in the ruminal environment for both sets of data^(2,3). In the second study, for each set of data (DHM and DEM), the ratio between *in vitro* gas accumulated production per accumulated unit of degraded dry material (DM) (G:D; ml gas produced *in vitro* per *in situ* degraded DM mg) for $k_{Sm,SmF} = 0.20^{-1}$ and 0.40^{-1} was obtained using the model. The time periods for DHM is $t_{iDHM} = \{3, 6, 12, 24, 48, 72, 96\}$ h, and for DEM, $t_{iDEM} = \{2, 4, 8, 24, 48\}$ h. Since published data is used, these time periods correspond to those reported by the authors. Finally, the information from these two studies was used to evaluate statistical and kinetic differences from both DHM⁽²⁾ and DEM⁽³⁾ treatments.

The *Koókay* model (Figure 1, Table 1) is formed by the following set of differential equations:

Cuadro 1. Expresión de biocálculo para el modelo *Koókay*

Table 1. Expression of bio-calculus for the *Koókay* model

Let def	(Degradation) (Solubilization) (Fermentation)	ND => Sm SC => Sm Sm => F ND + SC = D, (Fe) * f _{dG,dF} = Gin	$k_{ND,NDSm}$, $k_{SC,SCSm}$, $k_{Sm,SmF}$,
In corn leaves (DHM):	** $Q_{ND}(0) = 139 \text{ mg ND}$, $Q_{SC}(0) = 22.8 \text{ mg SC}$, $Q_{Sm}(0) = \epsilon \text{ mg Sm}$, $Q_F(0) = \epsilon \text{ mg F}$, $Q_D(0) = \epsilon \text{ mg D}$, $Q_G(0) = \epsilon \text{ mg G}$, $f_{Gi,Fi} = 0.40 \text{ mlG(mgF)}^{-1}$		
	$k_{ND,NDSm} = 0.020 \text{ h}^{-1}$, $k_{SC,SCSm} = E \text{ h}^{-1}$, $k_{Sm,SmF} = 0.20 \text{ h}^{-1}$ o 0.40 h^{-1} *		
In corn silage (DEM):	*** $Q_{ND}(0) = 82 \text{ mg ND}$, $Q_{SC}(0) = 76 \text{ mg SC}$, $Q_{Sm}(0) = \epsilon \text{ mg Sm}$, $Q_F(0) = \epsilon \text{ mg F}$, $Q_D(0) = \epsilon \text{ mg D}$, $Q_G(0) = \epsilon \text{ mg G}$, $f_{Gi,Fi} = 0.40 \text{ mlG(mgF)}^{-1}$		
	$k_{ND,NDSm} = 0.045 \text{ h}^{-1}$, $k_{SC,SCSm} = E \text{ h}^{-1}$, $k_{Sm,SmF} = 0.20 \text{ h}^{-1}$ o 0.40 h^{-1} *		

* Several data are obtained for each value.

** Tuah *et al.* (2); *** Valentin *et al.*(3); ϵ Sufficiently small; E Sufficiently big.

Compounds: ND = Hairly degradable phase, SC = Highly degradable phase; Sm = microbial substratum; F = Fermented substratum; D = Degraded substratum; G = Produced gas; $f_{Gi,Fi}$ = Produced gas as a function of fermented mass.

Notation: Q_i = quantity of i mg o ml(200 mgMS)⁻¹ : k_{ij} = coefficient for transaction j - k dependence of i (h)⁻¹ $f_{i,j}$ = ratio between i and j (ml i)(mg j)⁻¹

$$(1b) \quad \begin{bmatrix} \frac{dQ_F}{dt} \\ \frac{dQ_D}{dt} \\ \frac{dQ_G}{dt} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0 & 0 & k_{Sm,SmF} \\ k_{ND,NDSm} & k_{SC,SCSm} & 0 \\ 0 & 0 & k_{Sm,SmF} f_{dG,dF} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} Q_{ND} \\ Q_{SC} \\ Q_{Sm} \end{bmatrix}$$

$$(1a) \quad \begin{bmatrix} \frac{dQ_{ND}}{dt} \\ \frac{dQ_{SC}}{dt} \\ \frac{dQ_{Sm}}{dt} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -k_{ND,NDSm} & 0 & 0 \\ 0 & -k_{SC,SCSm} & 0 \\ k_{ND,NDSm} & k_{SC,SCSm} & -k_{Sm,SmF} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} Q_{ND} \\ Q_{SC} \\ Q_{Sm} \end{bmatrix}$$

con las condiciones iniciales

$$Q_{ND}(0); Q_{SC}(0); Q_{Sm}(0);$$

$$Q_F(0); Q_G(0); Q_D(0)$$

y $G : D(t) = \frac{Q_G}{Q_D} \dots\dots\dots(1c)$

$$(1b) \quad \begin{bmatrix} \frac{dQ_F}{dt} \\ \frac{dQ_D}{dt} \\ \frac{dQ_G}{dt} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0 & 0 & k_{Sm,SmF} \\ k_{ND,NDSm} & k_{SC,SCSm} & 0 \\ 0 & 0 & k_{Sm,SmF} f_{dG,dF} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} Q_{ND} \\ Q_{SC} \\ Q_{Sm} \end{bmatrix}$$

cuya solución analítica es,

$$Q_{ND} = Q_{ND}(0) \exp(-k_{ND,NDSm} t) \dots\dots\dots (2)$$

$$Q_{SC} = Q_{SC}(0) \exp(-k_{SC,SCSm} t) \dots\dots\dots(3)$$

$$Q_{Sm} = \frac{k_{ND,NDSm} Q_{ND}}{k_{Sm,SmF} - k_{ND,NDSm}} + \frac{k_{SC,SCSm} Q_{SC}}{k_{Sm,SmF} - k_{SC,SCSm}} + \xi \dots\dots(4)$$

$$Q_F = \frac{k_{Sm,SmF} Q_{ND}}{k_{ND,NDSm} - k_{Sm,SmF}} + \frac{k_{Sm,SmF} Q_{SC}}{k_{SC,SCSm} - k_{Sm,SmF}} + Q_{ND}(0) + Q_{SC}(0) + Q_{Sm}(0) + Q_F(0) - \xi \dots(5)$$

$$Q_G = f_{dG,dF} Q_F \dots\dots\dots(6)$$

$$Q_D = (Q_{ND}(0) - Q_{ND}) + (Q_{SC}(0) - Q_{SC}) \dots\dots\dots(7)$$

donde:

$$\xi = \left(Q_{Sm}(0) - \frac{k_{ND,NDSm} Q_{ND}(0)}{k_{Sm,SmF} - k_{ND,NDSm}} - \frac{k_{SC,SCSm} Q_{SC}(0)}{k_{Sm,SmF} - k_{SC,SCSm}} \right) \exp(-k_{Sm,SmF} t)$$

Q_i es la cantidad de i mg o ml por cada 200 mg de MS (mg o ml i (mgMS)⁻¹), $k_{i,jk}$ es el coeficiente de la transacción $j-k$ dependencia de i (h)⁻¹, $f_{i,j}$ es la relación de i en j (ml i)(mg i)⁻¹, ND es la fase

with the initial conditions

$$Q_{ND}(0); Q_{SC}(0); Q_{Sm}(0);$$

$$Q_F(0); Q_G(0); Q_D(0)$$

and $G : D(t) = \frac{Q_G}{Q_D} \dots\dots\dots (1c)$

where the analytical solution is,

$$Q_{ND} = Q_{ND}(0) \exp(-k_{ND,NDSm} t) \dots\dots\dots (2)$$

$$Q_{SC} = Q_{SC}(0) \exp(-k_{SC,SCSm} t) \dots\dots\dots (3)$$

$$Q_{Sm} = \frac{k_{ND,NDSm} Q_{ND}}{k_{Sm,SmF} - k_{ND,NDSm}} + \frac{k_{SC,SCSm} Q_{SC}}{k_{Sm,SmF} - k_{SC,SCSm}} + \xi \dots\dots(4)$$

$$Q_F = \frac{k_{Sm,SmF} Q_{ND}}{k_{ND,NDSm} - k_{Sm,SmF}} + \frac{k_{Sm,SmF} Q_{SC}}{k_{SC,SCSm} - k_{Sm,SmF}} + Q_{ND}(0) + Q_{SC}(0) + Q_{Sm}(0) + Q_F(0) - \xi \dots(5)$$

$$Q_G = f_{dG,dF} Q_F \dots\dots\dots(6)$$

$$Q_D = (Q_{ND}(0) - Q_{ND}) + (Q_{SC}(0) - Q_{SC}) \dots\dots\dots(7)$$

medianamente degradable de (SA), SC es la fase altamente degradable de (SA), Sm es el substrato microbiano, F es el substrato fermentado, D es el substrato degradado, G es el gas y $f_{Gi,Fi}$ es la relación entre el gas producido como función de la masa instantánea fermentada ($\text{mlG}(\text{mgF})^{-1}$).

En el modelo *Koókay* se asume: a) complementariedad indirecta entre los sistemas *in situ* e *in vitro*; b) existencia de un solo compuesto intermediario, al que se llamará en este trabajo substrato microbiano (Sm); c) transformación continua de Sm hacia substrato fermentado (F); d) $f_{Gi,Fi} = 0.40$ ($\text{mlG}(\text{mgF})^{-1}$) y e) la tasa fraccionaria de degradación de (SA) ($k_{(SA),NSm}$) comprende las tasa fraccionaria de degradación de ND ($k_{ND,NDSm}$) y de SC ($k_{SC,SCSm}$). Se utilizan valores de parámetros y constantes obtenidos a partir de los resultados publicados en los dos trabajos (Cuadro 1). En el caso de los valores de $k_{ND,NDSm}$ utilizado en el modelo *Koókay*, se obtuvieron del ajuste de los residuales de la MS reportada previamente^(2,3).

Los modelos mecanísticos se desarrollan en base a niveles biológicos y resolución. Se describe un comportamiento biológico a un nivel n como función del nivel inferior ($n-1$). La resolución es el nivel de detalle del modelo. En este trabajo, se describe la relación entre producción acumulada de Gas (G) y Degradación (D) (nivel n). La base del modelo *Koókay* son los procesos simplificados de G y D (nivel $n-1$), descrita cada una de ellas con una tasa fraccionaria. El objetivo no es modelar, en detalle, los mecanismos de estos procesos, sino estudiar el efecto que tiene $k_{Sm,SmF}$ sobre G:D y la correlación. La existencia de un compuesto intermediario (Sm) en el modelo, no supone la ausencia de otros en la reacción, sino que, es de utilidad en la comprensión cuantitativa del sistema ruminal.

En la literatura científica es difícil encontrar trabajos enfocados a la evaluación de las diferencias y similitudes de los resultados de las técnicas *in situ* e *in vitro*. Muchas veces las similitudes son reconocidas parcialmente por el investigador. Una técnica *in situ* o *in vitro* puede ser utilizada para evaluaciones donde sus resultados son considerados válidos para el estudio específico de un proceso en particular. Por ejemplo, en el caso de las técnicas *in situ* se considera que su importancia radica en el estudio de las cinéticas dentro del sistema ruminal en general⁽¹⁾, mientras que para el estudio *in vitro*, de las cinéticas

where:

$$\xi = \left(Q_{Sm}(0) - \frac{k_{ND,NDSm} Q_{ND}(0)}{k_{Sm,SmF} - k_{ND,NDSm}} - \frac{k_{SC,SCSm} Q_{SC}(0)}{k_{Sm,SmF} - k_{SC,SCSm}} \right) \exp(-k_{Sm,SmF} t)$$

Q_i represents the amount of i mg or ml for each 200 mg of DM (mg or ml $i(\text{mgMS})^{-1}$); $k_{i,jk}$ is the transaction coefficient $j-k$ of i (h^{-1}); f_{ij} is the ratio between i and j ($\text{ml } i(\text{mg } i)^{-1}$); ND is AS's fairly degraded phase; SC is AS's highly degraded phase; Sm is the microbial substratum; F is the fermented substratum; D is the degraded substratum; G is the gas; and $f_{Gi,Fi}$ is the relation between the produced gas as a function of fermented mass ($\text{mlG}(\text{mgF})^{-1}$).

In the *Koókay* model the following is assumed: a) indirect complementarily between the *in situ* and *in vitro* systems; b) presence of only one intermediate compound, to be named in this study as microbial substratum (Sm); c) continuous transformation of Sm into fermented substratum (F); d) a relation between the produced gas as a function of fermented mass, $f_{Gi,Fi} = 0.40$ ($\text{mlG}(\text{mgF})^{-1}$); and e) AS's fractionary degradation rate ($k_{(SA),NSm}$) results from the fractionary degradation rate for ND ($k_{ND,NDSm}$) and SC ($k_{SC,SCSm}$).

Model parameters and constants were obtained from^(2,3) and are shown in Table 1. The $k_{ND,NDSm}$ values used in the *Koókay* model were obtained fitting the DM residuals reported^(2,3).

Mechanistic models are developed based on biological levels and resolution. A biological behavior can be described at the n level as a function of the lower level ($n-1$). Resolution is the model's level of detail. In this work, the ratio between accumulated gas production (G) and Degradation (D) (level n) is described. The basis of the model is the simplified processes of G and D (level $n-1$), each described by a fractionary rate. Therefore, the objective is not to model the mechanisms of these processes in detail, but to study the effect of $k_{Sm,SmF}$ on G:D and the statistical correlation. The presence of an intermediate compound (Sm) in the model does not suppose the absence of others in the reaction, but it is useful in understanding the ruminal system quantitatively.

intrínsecas de las fracciones de los alimentos. Pero, aunque los resultados de las dos técnicas están relacionados indirectamente al sistema ruminal por medio de sus subsistemas de degradación y producción de gas, no se analizan integralmente como sistemas complementarios. Sin embargo, algunos autores han utilizado el método de producción de gas *in vitro* para la evaluación de la degradación ruminal de los alimentos^(2,3).

Los resultados del primer estudio (Cuadro 2) muestran la tendencia del coeficiente de correlación (r) y de los parámetros b0 y b1 en la regresión lineal cuando se aumenta, en el modelo *Koóka*, $k_{Sm,SmF}$ de 0.2 a $\infty(h)^{-1}$, para cada uno de los tratamientos DHM y DEM. Con excepción de $k_{Sm,SmF} = 0.40 (h)^{-1}$, la r y b0 aumentan, contrario a lo encontrado con b1, pero siguiendo el mismo patrón. También, se observa que el valor de r se acerca a 1.00 cuando $k_{Sm,SmF}$ se acerca a ∞ y que, los valores de los parámetros de degradación (pd), modifican el valor de r cuando el valor de $k_{Sm,SmF}$ es igual, siendo el valor de r mayor para el tratamiento DHM que para DEM.

En los Cuadros 3 y 4 se presentan los resultados del segundo estudio. En ellos se puede observar que la relación G:D experimental aumenta progresivamente al aumentar el tiempo de incubación para ambos tratamientos, haciendo suponer que existe más G por unidad de D a mayor tiempo de incubación. En el segundo estudio, el valor de $k_{Sm,SmF} = 0.40 (h)^{-1}$ explica los resultados experimentales encontrados en el tratamiento DHM, al igual que $k_{Sm,SmF} = 0.20 (h)^{-1}$ hace con DEM.

En la Figura 2, se presentan algunos coeficientes estadísticos obtenidos a partir de los datos experimentales, los cuales no difieren de los obtenidos de los datos simulados con el modelo. Este análisis, parece sugerir que las diferencias estadísticas encontradas entre DHM⁽²⁾ y DEM⁽³⁾ pueden ser explicadas con las suposiciones implícitas dentro del modelo y los valores de los pd, $k_{Sm,SmF}$ y $f_{Gi,Fi}$ es muy probable que, las principales diferencias estadísticas entre ambos trabajos, sea como consecuencia de las diferencias entre los valores de los pd.

El valor de $k_{Sm,SmF}$ adquiere un mayor peso cuando los valores de los pd, entre tratamientos, son menores o cuando el valor de $k_{Sm,SmF}$ aumenta. El valor de $k_{ND,NDSm}$ es de $0.020 (h)^{-1}$ con 14 % de SC en el

In the scientific literature, it is difficult to find studies focused on the evaluation of the differences and similarities of *in vitro* and *in situ* results. Often, similarities are partially acknowledged by researchers.

In the case of *in situ* techniques, it is believed that their importance rests in the study of the ruminal system global kinetics⁽¹⁾, while that of *in vitro* lies in the intrinsic kinetics of the feed fractions. Although results from both techniques are indirectly related to the ruminal system through the degradation and gas production subsystems, they are not analyzed comprehensively as complementary systems. However, some authors have used the *in vitro* gas production method to evaluate the feed ruminal degradation^(2,3).

Results of the first study (Table 2) show the tendency of the correlation coefficient (r) and of the b0 and b1 parameters in the linear regression when increasing $k_{Sm,SmF}$ from 0.2 to $\alpha(h)^{-1}$, for each one of the DHM and DEM treatments. With the exception of $k_{Sm,SmF}=0.40 (h)^{-1}$, r and b0 increase, contrary to what happens with b1. However, they follow the same pattern. Also, it was observed that the value of r is close to 1.00 when $k_{Sm,SmF}$ approaches α and that the degradation parameters (dp) modify the value of r for the same value of $k_{Sm,SmF}$. r is higher for the DHM treatment than for the DEM. In Tables 3 and 4

Cuadro 2. Valores de coeficientes a diferentes tasas fraccionarias de fermentación ($k_{Sm,SmF}$)

Table 2. Coefficients values for different fractionary fermentation rates ($k_{Sm,SmF}$)

	Statistical coefficients			
	0.2	0.4	0.8	Infinite
Corn leaves (DHM)				
r	0.99981	0.99962	0.99993	1.00000
b0	-8.50	-4.61	-2.04	0.00
b1	0.46	0.43	0.41	0.40
Corn silage (DEM)				
r	0.99323	0.99177	0.99843	1.00000
b0	-38.45	-19.41	-6.83	0.00
b1	0.65	0.53	0.46	0.40

r= Regression coefficient.

b0, b1= Parameters fitted using linear regression.

tratamiento DHM⁽²⁾, mientras que en el tratamiento DEM⁽³⁾, el valor de $k_{ND,NDSm}$ es de 0.045 con 48 % de SC, lo cual representa una diferencia considerable entre tratamientos. Aunque la degradación parece ser determinante, en el presente trabajo, para definir las diferencias entre las correlación de los trabajos estudiados^(2,3), $k_{Sm,SmF}$ tiene mayor peso en la determinación de los parámetros de regresión, ya que la utilización de valores diferentes de $k_{Sm,SmF}=0.40$ ó 0.20 (h) para el primer y segundo trabajos, respectivamente, alejarían los valores simulados a los datos experimentales.

Aunque r , obtenida con el modelo, tiene la misma tendencia que la obtenida con los datos experimentales, los valores absolutos de r son diferentes. Lo anterior, puede ser explicado con la variación presente en los datos experimentales. Cuando se modificó el modelo *Koókay* para estudiar el efecto de la variación aleatoria en r , se encontró que la variación disminuía r en todos los casos estudiados, y transmitía la variación de los datos hacia los valores de los parámetros de regresión, con una media cercana a los valores obtenidos sin el efecto de la variación aleatoria (datos no publicados).

Otra explicación posible de la disminución de r entre DHM y DEM, puede ser la presencia, en la degradación, de lo que algunos autores llaman tiempo de retraso y que se presenta al inicio del tratamiento DEM. Si este comportamiento es como

results of the second study are shown. In them, the experimental G:D ratio increases gradually upon increasing the incubation time for both treatments, which lets us infer that more G exists per unit of D at a greater incubation time. In the second study, the value of $k_{Sm,SmF}=0.40$ (h)⁻¹ explains the experimental results found in the DHM treatment, just as $k_{Sm,SmF}=0.20$ (h)⁻¹ does with DEM.

In Figure 2 some statistical coefficients obtained from experimental data are shown which are similar to those obtained from simulation using the model. This analysis suggests that the statistical differences found between DHM⁽²⁾ and DEM⁽³⁾ could be explained by the model suppositions and the values of dp , $k_{Sm,SmF}$, and $f_{Gi,Fi}$; in all likelihood, the main statistical differences between both studies is due to differences in the dp values.

The value of $k_{Sm,SmF}$ are more important when the values of dp between treatments are smaller or when $k_{Sm,SmF}$ increases (Table 2). In the DHM treatment⁽²⁾, $k_{Sm,SmF}=0.020$ (h)⁻¹ with 14 % SC, while in the DEM⁽³⁾, $k_{ND,NDSm}=0.045$ with 48 % SC; this represents a considerable difference between treatments. Although the degradation seems to be important to explain the differences between the statistical correlations between⁽²⁾ and⁽³⁾, results show that $k_{Sm,SmF}$ is more important. When

Cuadro 3. Relación entre gas producido y materia seca degradada de las hojas de maíz (DHM)

Table 3. Ratio between gas production and degraded dry matter (DM) in corn leaves (DHM)

Time (h)	DM (mg(200mgDM) ⁻¹)	GAS (ml(200mgDS) ⁻¹)	G:D ratio (ml gas (mg degraded DM) ⁻¹)		
			Experimental	Estimated 1 [‡]	Estimated 2 ^{‡‡}
3	5.22*	1.5	0.28	0.16	0.25
6	18.6*	3.6	0.19	0.23	0.32
12	41.2*	12.1	0.30	0.30	0.35
24	76.00	29.10	0.38	0.35	0.38
48	107.80	42.50	0.39	0.38	0.39
72	120.40	48.10	0.40	0.39	0.39
96	125.00	50.00	0.40	0.39	0.40

G:D= ratio between the *in vitro* cumulative gas production and the cumulative degraded DM (mlG(mgD)⁻¹).

* Calculated using the equation $p=a+b(1-e(-ct))$.

‡ *in vitro* G:D ratio estimated through the model using $k_{Sm,SmF} = 0.20$ (h)⁻¹.

‡‡ *in vitro* G:D ratio estimated through the model using $k_{Sm,SmF} = 0.40$ (h)⁻¹.

‡‡‡ Tuah et al⁽²⁾.

Cuadro 4. Relación entre gas producido y materia seca degradada del ensilado de maíz (DEM)

Table 4. Ratio between gas production and degraded dry matter (DM) in corn silage (DEM)

Time (h)	DM (mg(200mgDM) ⁻¹)	GAS (ml(200mgDM) ⁻¹)	G:D ratio (ml gas (mg degraded DM) ⁻¹)		
			Experimental	Estimated 1 [‡]	Estimated 2 ^{‡‡}
2	78.60	7.60	0.10	0.13	0.21
4	82.80	11.91	0.14	0.21	0.30
8	82.20	23.50	0.28	0.29	0.36
24	122.60	48.16	0.39	0.37	0.39
48	152.20	59.61	0.39	0.39	0.40

G:D ratio between *in vitro* accumulated gas production and accumulated degraded DM (mlG(mgD)⁻¹).

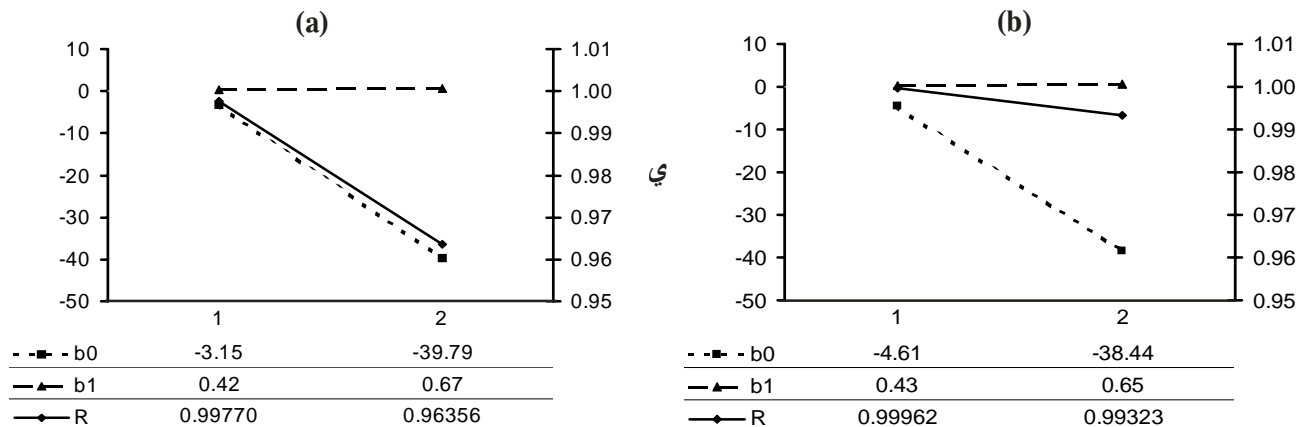
[‡] *in vitro* G:D ratio estimated through the model using $k_{Sm,SmF} = 0.20$ (h)⁻¹.

^{‡‡} *in vitro* G:D ratio estimated through the model using $k_{Sm,SmF} = 0.40$ (h)⁻¹.

Valentin *et al*(³).

Figura 2. Diferencias entre coeficientes estadísticos, calculados a partir de datos experimentales (a) y simulados (b)

Figure 2. Differences between statistical coefficients calculated using experimental data (a) and simulated (b)



consecuencia de la variación aleatoria y se cumplen los supuestos determinados en el modelo *Koókey*, es probable, que disminuya el valor de *r*, como ya analizamos anteriormente. Por si solo, este comportamiento peculiar de la curva no tiene por qué afectar *r*, a menos que no exista una relación entre el material degradado y el gas producido en los puntos donde se presenta el retraso.

Lo anterior, pudiera darse en alimentos con una fracción soluble grande, $k_{ND,NDSm}$ y $k_{Sm,SmF}$ alta. El material solubilizado puede fermentarse aunque no exista nueva degradación de la MS. En este trabajo, parece ser, que el tiempo de retraso es

different values of $k_{Sm,SmF}$ (0.40 or 20.0 (h)⁻¹) are used to estimate the G:D results of (2) and (3), respectively, the simulated results differ from the experimental data (Tables 3,4).

Although *r*, which was obtained using the model, shows the same trend as when it was obtained using experimental data, their absolute values are different. This could be explained as a result of experimental data variations. In all the cases studied, *r* decreases when random variations on *r* were simulated. Moreover, the regression parameters were also affected. However, the parameter means were close to the parameters obtained using the unperturbed model.

como consecuencia de la variación aleatoria, ya que los puntos donde se presenta son cercanos, existe una leve pendiente entre las 2 y 8 h, y la producción de gas es baja en los tiempos iniciales, siguiendo la misma tendencia de D.

Una observación detallada (Cuadro 4) del segundo experimento⁽³⁾, muestra que la relación G:D experimental es más pequeña que en el primer trabajo⁽²⁾, en las horas iniciales hasta alcanzar un valor máximo, el cual es similar a los reportados para la fermentación de FDN *in vitro*, que se encuentra entre 0.37 a 0.39 ml de gas (mg FDN)⁻¹^(8,9) o el calculado por los autores, a partir de los datos reportados⁽³⁾ para un grupo variado de cinco plantas tropicales de 0.37 (\pm 0.09) ml de gas (mgD)⁻¹ (datos no publicados), lo que hace suponer que el valor de f_{GiFi} sea cercano a 0.40 (h)⁻¹ para los dos tratamientos (DHM, DEM). En un trabajo previo⁽⁹⁾, se calculó que la fracción soluble del detergente neutro, que es la fracción de la planta extraída por un detergente neutro⁽¹⁰⁾, se fermenta a una $k_{Sm,SmF}$ entre 0.15 y 0.19 (h)⁻¹.

En el Cuadro 5 se presenta la composición química de la planta de maíz y del ensilado de maíz (DEM). Aunque no se mencionó la composición del tratamiento DHM⁽²⁾, el reporte de la composición de la planta de maíz (DPM)⁽¹¹⁾ puede ayudar en la interpretación de los resultados. El CC (100-FDN) para DPM es menor (32 %) al mencionado para DEM (55 %). En DEM, una fracción de CC corresponde al almidón (31 %) y otra principalmente al ácido láctico, que en algunos ensilados puede representar entre el 5 y 10 % de la MS⁽¹²⁾, y por diferencia se obtiene un porcentaje entre 14 a 19 % de carbohidratos (CH₂O) solubles, 13 % menor a lo presente en DPM. Todo lo anterior, está de acuerdo a la tendencia de los valores de los parámetros de degradación encontrados. La fracción soluble ($Q_{SC}(0)$) que se relaciona a CC, es menor para el tratamiento DHM (22.8 / 2=11.4 %) que en el caso de DEM (76 / 2=38 %). La tasa de degradación es menor en el tratamiento DHM ($k_{ND,NDSm}$ 0.020 h⁻¹) que en el DEM ($k_{ND,NDSm}$ =0.045 h⁻¹).

En el tratamiento DEM, la FDN seguramente cambió su estructura como consecuencia de un proceso inicial de degradación, que pudo haber propiciado una mejor degradación de las partículas y por consiguiente una $k_{ND,NDSm}$ alta. La existencia de este proceso se refleja

Another possible explanation for a low r could be the presence, during the degradation process, of what some authors call delay time, which is found at the beginning of the DEM treatment. If this r behavior is a consequence of random variations and the model suppositions holds, it is probable that r would decrease, as stated before. By itself, the curve's peculiar behavior should not affect r, unless there is no relationship between the degraded material and the gas produced at those points showing a delay.

The above could be seen in feeds having a large soluble fraction, $k_{ND,NDSm}$ and high $k_{Sm,SmF}$. Solubilized material could ferment even without new DM degradation. In this work, it seems that the initial curve behavior is a consequence of random variations because the points where it shows up are close, a slight slope showing between 2 and 8 h, and gas production is low at initial times, following the same tendency as D.

The second experiment⁽³⁾ (Table 4) shows that the experimental G:D ratio is lower than in the first work⁽²⁾ in the beginning hours. Then, a maximum value is reached. This is similar to those reported for *in vitro* NDF fermentation (between 0.37 and 0.39 ml gas (mgNDF)⁻¹^(8,9) or to that calculated by the authors from reported data⁽³⁾ for a varied group of five tropical plants (0.37 (\pm 0.09) ml of gas (mgD)⁻¹; unpublished data). These results lets us assume that the value of f_{GiFi} is near 0.40 (h)⁻¹ for both treatments (DHM, DEM).

In a previous work⁽⁹⁾, it was calculated that the neutral detergent soluble fraction which is the fraction of the plant extracted by a neutral detergent⁽¹⁰⁾, ferments at a $k_{Sm,SmF}$ between 0.15 and 0.19 (h)⁻¹.

Table 5 shows the corn plant and the corn silage (DEM) chemical compositions. Although no mention is made of the DHM treatment composition⁽²⁾, data on corn plant composition (DPM)⁽¹¹⁾ could be useful to interpret results.

According to Table 5, CC (100-NDF) for DPM is lower (32 %) than for DEM (55 %). DEM is composed by a fraction of CC that is formed by starch (31 %) and another fraction that is mainly formed by lactic acid. In some silages, it represents between 5 and 10 % of the DM⁽¹²⁾. The soluble

en el nivel bajo de pH reportado por los autores⁽³⁾ y que, no disminuyó el valor de $k_{ND,NDSm}$. El comportamiento de la fermentación de los dos tratamientos fue contrario a lo encontrado con la degradación. La $k_{Sm,SmF}$ fue mayor para DHM. La diferencia puede radicar, en una menor fermentación de CH_2O solubles en DEM que, aunque desde el punto de vista de la concentración de CC (55 %), fue menor; sin embargo, la mayor parte está compuesto de almidón (31 %) y ácido láctico (~ 8 %), representando la concentración de CH_2O solubles menor al 30 %, en relación a CC. En cambio en DHM es cercano al 100 %.

La gran concentración de almidón, presente en DEM, puede ser la causa de una fermentación baja cuando se compara con DHM, pero también pueden contribuir: el pH ácido de 3.68, que puede inhibir la fermentación, menor cantidad de sustancias fermentables, cambio de la estructura y composición de MS, y menor producción de gas por efecto del aumento de productos de la fermentación (ácido láctico, etc.), como consecuencia del ensilado. Para poder aclarar estos puntos, hacen falta más trabajos enfocados a subprocesos particulares.

Debido a que el modelo *Koókay* es una súper simplificación del sistema ruminal, puede coexistir con diferentes interpretaciones de éste, a diferentes niveles. Las suposiciones son simples, enfocadas al estudio cuantitativo de $k_{Sm,SmF}$, y el efecto que tiene sobre los coeficientes estadísticos obtenidos de datos experimentales. $k_{Sm,SmF}$ representa múltiples reacciones que serán estudiadas con mayor detalle en otros trabajos⁽¹³⁾. Al relacionar los procesos estudiados en cada una de las dos técnicas mediante un modelo, se busca el análisis de los procesos como un todo. Se procura comprender lo que individualmente es difícil por las características particulares de cada una de las técnicas.

Se concluye que la utilización del modelo permite suponer que, las diferencias encontradas en las correlaciones entre las técnicas *in situ* e *in vitro*, son como consecuencia de las diferencias entre los procesos de degradación y la tasa fraccionaria de fermentación ($k_{Sm,SmF}$). El valor de $k_{Sm,SmF}$ entre 0.20 y 0.40 (h)⁻¹, utilizado en este trabajo, es capaz de explicar la producción de gas *in vitro* mediante el

Cuadro 5. Composición de la planta de maíz (DPM) y ensilado de maíz (DEM) (%)

Table 5. Corn plant (DPM) and corn silage (DEM) composition (%)

	Corn plant*	Corn silage**
DM,	89	31
CC (100-FDN),	32	55
Starch,	NR	31
FDN,	67	45
FDA,	37	23
Lignin,	3.6	3.1
pH	NR	3.68

NR= Non reported data.

*Valentín *et al*⁽³⁾.

**Amorim *et al*⁽¹¹⁾.

carbohydrates (CH_2O), which are obtained by difference, represent a 14 to 19 %, 13 % less than what is present in DPM. This is in accordance with the tendency of the degradation parameters mentioned in Table 1. The soluble fraction ($Q_{sc}(0)$) which is related to CC, is lower in the DHM treatment ($22.8/2=11.4$ %) than in the DEM ($76/2=38.0$ %). The degradation rate is lower in the DHM treatment ($k_{ND,NDSm} = 0.020$ h⁻¹) than in the DEM ($k_{ND,NDSm} = 0.045$ h⁻¹).

In the DEM treatment, NDF surely changed its structure as a consequence of an initial degradation process. It may propitiated a better particle degradation and therefore a high $k_{ND,NDSm}$. The presence of this process reflects in the low pH reported by the authors⁽³⁾, and which did not diminish the value of $k_{ND,NDSm}$. Fermentation performance in both treatments was contrary to that found in degradation. The $k_{ND,NDSm}$ was higher for the DHM. This difference may be due to lower soluble carbohydrates fermentation in the DEM that, although being lower from the CC concentration (55 %) point of view, is less. Moreover, the majority is made up of starch (31 %) and lactic acid (~ 8 %). This adds up to less than 30 % of soluble CH_2O , relative to CC. On the other hand, in DHM it is close to 100 %.

The high starch concentration present in the DEM, may be the cause for a low fermentation when compared to the DHM. However, other factors may

modelado del sistema ruminal; encontrándose cercano a lo reportado en la literatura. El modelo *Koókey* es una herramienta útil para el estudio de las diferencias encontradas entre los resultados de las técnicas *in vitro* e *in situ*. Se requieren más trabajos para evaluar la importancia del parámetro k_{S_m, S_mF} en el estudio de la cinética ruminal.

LITERATURA CITADA

- Mertens DR. Rate and extent of digestion. In: Forbes JM, France J editors. Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism. CAB Internacional. 1993:13-51.
- Tuah AK, Okai DB, Ørskov ER, Kyle D, Shand W, Greenhalgh JFD, *et al.* *In sacco* dry matter degradability and *in vitro* gas production characteristics of some Ghanaian feeds. *Liv Res Rur Dev* 1996;8(1):1-10.
- Valentin SF, Williams PEV, Forbes JM, Sauvant D. Comparison of the *in vitro* gas production technique and the nylon bag degradability technique to measure short- and long-term processes of degradation of maize silage in dairy cows. *Anim Feed Sci Tech* 1999;78(1-2):81-90.
- Dhanoa MS, Lopez S, Dijkstra J, Davies DR, Sanderson R, Williams BA, *et al.* Estimating the extent of degradation of ruminant feeds from a description of their gas production profiles observed *in vitro*: comparison of models. *Bri J Nut* 2000;83(2):131-142.
- Hungate RE. The rumen and its microbes. New York, NY, USA: Academic Press Inc; 1966.
- Blümmel M, Ørskov ER. Comparison of *in vitro* gas production and nylon-bag degradability of roughage in predicting feed intake in cattle. *Anim Feed Sci Tech* 1993;40(2-3):109-119.
- Cone JW, Van Gelder AH, Visscher GJW, Oudshoorn L. Influence of rumen fluid and substrate concentration on fermentation kinetics measured with a fully automated time related gas production apparatus. *Anim Feed Sci Tech* 1996;61(1-4;8):113-128.
- Schofield P, Pitt RE, Pell AN. Kinetics of fiber digestion from *in vitro* gas production. *J Anim Sci* 1994;72(11):2980-2991.
- Schofield P, Pell N. Measurement and kinetic analysis of the neutral detergent-soluble carbohydrate fraction of legumes and grasses. *J Anim Sci* 1995;73(11):3455-3463.
- Van Soest PJ. Nutritional ecology of the ruminant. 2nd ed. USA: Comstock Publishing Associates, A Division of Cornell University Press; 1994.
- Amorim AC, De Resende KT, Medeiros AN, De Almeida SD, Campos de Araújo JA. Composición bromatológica y degradabilidad *in situ* de la parte aérea de la planta de maíz, producida por hidroponía. En: Sierra I, Alcalde MJ, González P, Fernández V, Morales FA editores. XXVI Jornadas Científicas y V Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Sevilla, España. 1990:519-523.
- Meneses M, Andrade HM, Megias MD, Hernández F, Madrid J. Evaluación de la degradabilidad de dos subproductos agroindustriales ensilados, Brócoli (*Brassica oleracea*, var. *Italica*) y Alcachofa (*Cynara scolymus*), empleando técnicas *in vitro*. En: Sierra I, Alcalde MJ, González P, Fernández V, Morales FA editores. XXVI Jornadas Científicas y V Internacionales de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Sevilla, España. 1990:588-593.
- Vargas-Villamil LM, Ku-Vera J, Vargas-Villamil FJ, Medina-Peralta S. Modelo para la estimación de tres parámetros ruminales biológicos. *Interciencia* 2004;29(6):296-302.

also contribute: a 3.68 pH, which can inhibit the fermentation; a lower quantity of fermentable substances; changes in the DM structure and composition; and lower gas production owing to an increase in fermentation products (lactic acid, etc.) as a result of the silage. To clarify these points, more studies focused on particular sub-processes are needed.

Because the *Koókey* model is a simplified ruminal system, it can coexist with different interpretations at different levels. Its assumptions are focused on the quantitative study of k_{S_m, S_mF} and its effect on the statistical coefficients obtained from experimental data. This parameter, k_{S_m, S_mF} , represents multiple reactions which shall be studied in greater detail in other works⁽¹³⁾.

The integration of various processes (or sub processes) into a model is useful to understand the whole system, and to test different hypothesis. Since each technique (*in vitro* and *in situ*) has different assumptions, the objective is to identify and differentiate the inherent characteristics of each technique and those that correspond to the system.

It is concluded that the model (*Koókey*) developed in this work is a useful tool for studying the differences between *in vitro* and *in situ* techniques. As a result, it is considered that the differences found in the statistical correlations between *in situ* and *in vitro* techniques are a consequence of the differences between the degradation process and the fractionary fermentation rate k_{S_m, S_mF} . The k_{S_m, S_mF} value between 0.20 and 0.40 h⁻¹ used in this study helps to explain *in vitro* gas production through a ruminal system model, with values near to those found in literature. More studies are needed to assess the importance of the k_{S_m, S_mF} parameter for the study of ruminal kinetics.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Jennifer La Casella for her invaluable help in reviewing and correcting the English translation of this article.

End of english version