

Potencial metanogénico y eficiencia de digestión de forrajeras megatérmicas utilizadas en la alimentación para rumiantes

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires, Área Ciencias Agropecuarias

Juan Manuel Cantet

Médico Veterinario – Universidad Nacional de La Plata - 2008

Lugar de trabajo: Cát. Nutrición Animal – Dpto. Producción Animal - FAUBA



FAUBA

Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano

Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



COMITÉ CONSEJERO

Director de tesis

Gustavo Jaurena

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

MSc; PhD (Pontificia Univ. Católica de Chile y Univ. of Wales, Aberystwyth/IGER)

Consejero de Estudios

Darío Colombatto

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

PhD (The University of Reading, Inglaterra)

JURADO DE TESIS

Director de tesis

Gustavo Jaurena

Ingeniero Agrónomo (Universidad de Buenos Aires)

MSc; PhD (Pontificia Univ. Católica de Chile y Univ. of Wales, Aberystwyth/IGER)

JURADO

Hugo Arelovich

Ingeniero Agrónomo (Universidad Nacional del Sur)

MSc; PhD (Oklahoma State University, EE.UU.)

JURADO

Diego Pablo Morgavi

Veterinario (Universidad Nacional del Litoral)

Master of Agriculture (Miyazaki University, Japón)

PhD (Kagoshima University, Japón)

HDR (Blaise Pascal University, Francia)

JURADO

Cecilia Cajarville Sanz

Doctor en Medicina y Tecnología Veterinaria (Universidad de la República, Uruguay)

Doctor (PhD) en Biología (Universidad de Lleida, España)

Fecha de defensa de la tesis: 23 de agosto de 2017

Dedicatoria

A Fran y Lulú, que son lo que soñé en el pasado,
lo que disfruto en el presente y
por quienes construyo mi futuro.

Agradecimientos

Este hermoso trayecto de mi vida comenzó en la FAUBA gracias a la recomendación de Fito, mi reconocimiento por el constante apoyo y empuje.

A Gustavo un especial agradecimiento por enseñarme y dedicarme horas y horas para que yo entienda lo inentendible. Te agradezco en lo académico y en lo personal por la compañía y apoyo cuando Buenos Aires se hacia nostálgica y solitaria.

A la Cátedra de Nutrición, materializada en compañeros, profesores, tesis, que se transformaron en amigos con los largos días de laboratorio, los almuerzos en la cátedra, los viajes a Congresos y las salidas. Gracias Pao, Susi, Tori, Jesi, José, Pato, Ro, Lau, Ale, Mara, Diego y Gustavo.

Mara, Pao y Susana, si los ensayos que realicé tuvieron rigor científico, fue por la ayuda invaluable que me dieron en el laboratorio. Gracias por eso y por la amistad que me brindaron sin fisuras, dentro y fuera de la facu.

Ale y Ro, vivir en Capital no hubiese sido lo mismo si no los hubiese conocido; la ayuda, los consejos, las charlas y el trabajo juntos forjaron una amistad que se independizó de la distancia. A José, un especial agradecimiento por los sabios consejos, la ayuda incondicional y por ofrecerme una amistad sin prejuicios.

A Rolando Barahona R., y todos los amigos colombianos con los cuales compartí una experiencia imposible de olvidar. Adrián, Isa, Seba, Raquel, Xiomara, Erika, Tomás, Natalia, Claudia, Cata, Sergio y tantos más, ¡Muchas gracias!

En el trabajo, tanto o más importante es el apoyo de afuera, de mi familia y amigos, los de Chivilcoy, los de La Plata, los de Concepción, cada uno de ellos fueron imprescindibles para que continúe y finalice con este proyecto. ¡Gracias a todos!

Finalmente, a la persona que me contuvo, me ayudo, se alegró y lloró conmigo, con la cual compartí esta fase, que, aunque tan importante, solo fue una pequeña parte de todo lo que nos queda por compartir... Ru, mi agradecimiento va más allá de las palabras.

Índice general

Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Índice general.....	v
Índice de cuadros.....	viii
Índice de figuras.....	xii
Declaración.....	xv
Abreviaturas.....	xvi
Resumen.....	xviii
Abstract.....	xix
Capítulo 1. Estado actual del conocimiento sobre el potencial metanogénico y eficiencia de digestión de forrajeras megatérmicas.....	1
1.1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1.1. Utilización de los compuestos secundarios en la función ruminal.....	5
1.1.2. Compuestos estructurales y no estructurales de los forrajes templados y tropicales y su rol en la fermentación ruminal.....	6
1.1.3. Utilización del sistema de producción de gas <i>in vitro</i> para la evaluación de forrajes.....	7
1.1.4. Importancia ambiental y nutricional de las emisiones de metano por parte de los rumiantes.....	8
1.2. OBJETIVOS.....	10
1.3. HIPÓTESIS.....	11
Capítulo 2. Estandarización de la producción de gas <i>in vitro</i>.....	12
2.1. RESUMEN.....	13
2.2. INTRODUCCIÓN.....	14
2.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
2.3.1. Consideraciones generales.....	18
2.3.2. Preparación de los inóculos.....	18
2.3.3. Incubación <i>in vitro</i>	20
2.3.4. Análisis químicos.....	21
2.3.5. Análisis estadístico.....	22
2.4. RESULTADOS.....	23
2.4.1. Composición inicial de los inóculos.....	23
2.4.2. Análisis de los blancos.....	23
2.4.3. Análisis de los sustratos.....	23
2.4.4. Correlaciones entre los parámetros A, B y c de los modelos de PGA con o sin corrección por blancos.....	29
2.5. DISCUSIÓN.....	30

2.5.1. <i>Objetivos y criterios de verificación</i>	30
2.5.2. <i>Producción de gas acumulada por los blancos</i>	30
2.5.3. <i>Perfiles de los ácidos grasos volátiles de los blancos</i>	33
2.5.4. <i>Características de la fermentación de los sustratos incubados con los inóculos pre-incubados</i>	34
2.5.5. <i>Correlación de parámetros de la modelación de PGA corregidos y sin corregir por blancos</i>	36
2.6. CONCLUSIONES	38
Capítulo 3. Efecto de los residuos insolubles en agua y en detergente neutro sobre la digestión ruminal y producción de metano de forrajeras tropicales y templadas	39
3.1. RESUMEN	40
3.2. INTRODUCCIÓN	41
3.3. MATERIALES Y MÉTODOS	43
3.3.1. <i>Colección y procesamiento de las muestras de forrajes</i>	43
3.3.2. <i>Tratamientos</i>	44
3.3.3. <i>Producción de gas in vitro</i>	44
3.3.4. <i>Cinética de fermentación y medición del metano in vitro</i>	45
3.3.5. <i>Análisis químicos de los forrajes utilizados como sustratos</i>	46
3.3.6. <i>Caracterización del licor ruminal y los residuos de la fermentación in vitro</i>	47
3.3.7. <i>Análisis estadísticos</i>	47
3.4. RESULTADOS.....	51
3.4.1. <i>Experimento 1</i>	51
3.4.1.1. <i>Compuestos solubles en agua</i>	51
3.4.1.2. <i>Producción de metano</i>	51
3.4.1.3. <i>Digestibilidad in vitro de los forrajes</i>	53
3.4.1.4. <i>Producción de gas in vitro</i>	57
3.4.1.5. <i>Caracterización del licor ruminal</i>	60
3.4.2. <i>Experimento 2</i>	69
3.4.2.1. <i>Compuestos solubles en detergente neutro</i>	69
3.4.2.2. <i>Producción de metano</i>	69
3.4.2.3. <i>Digestibilidad in vitro de los forrajes</i>	71
3.4.2.4. <i>Producción de gas in vitro</i>	73
3.4.2.5. <i>Caracterización del licor ruminal</i>	73
3.5. DISCUSIÓN	78
3.5.1. <i>Calidad nutricional de los forrajes tropicales y templados</i>	78
3.5.2. <i>Efecto de las fracciones solubles e insolubles en agua y en detergente neutro sobre la capacidad fermentativa y digestibilidad de las forrajeras tropicales y templadas</i>	81
3.5.3. <i>Potencial metanogénico de las forrajeras tropicales y el rol de los CS en la producción de CH₄</i>	83
3.5.4. <i>Relación estequiométrica entre los productos de fermentación</i>	86
3.5.4.1. <i>Primeras 24 h de fermentación</i>	86

3.5.4.2. Fermentaciones tardías, a 48 y 72 h.	89
3.5.5. <i>Efecto del tratamiento térmico en las paredes celulares purificadas</i>	90
3.6. CONCLUSIONES	92
Capítulo 4. Efecto de la adición de extractos de taninos en los perfiles de fermentación de forrajeras templadas y tropicales	93
4.1. RESUMEN	94
4.2. INTRODUCCIÓN	95
4.3. MATERIALES Y MÉTODOS	98
4.3.1. <i>Caracterización de los experimentos</i>	98
4.3.2. <i>Descripción de los sustratos utilizados en la producción de gas in vitro</i>	98
4.3.3. <i>Obtención de los extractos de TC</i>	99
4.3.4. <i>Tratamientos utilizados para analizar el efecto de los TC en la fermentación in vitro</i>	100
4.3.5. <i>Producción de gas in vitro y análisis de los residuos de la fermentación</i>	100
4.3.6. <i>Diseño experimental y análisis estadísticos</i>	102
4.4. RESULTADOS.....	103
4.4.1. <i>Experimento 1</i>	103
4.4.1.1. <i>Producción de metano in vitro</i>	103
4.4.1.2. <i>Digestibilidad in vitro</i>	103
4.4.1.3. <i>Cinética de la producción de gas in vitro</i>	103
4.4.1.4. <i>Caracterización del licor ruminal</i>	107
4.4.2. <i>Experimento 2</i>	111
4.4.2.1. <i>Producción de metano in vitro</i>	111
4.4.2.2. <i>Digestibilidad in vitro</i>	111
4.4.2.3. <i>Cinética de producción de gas in vitro</i>	115
4.4.2.4. <i>pH y partición de la energía durante la fermentación in vitro</i>	115
4.5. DISCUSIÓN	117
4.5.1. <i>Características fermentativas de forrajeras tropicales y templadas</i>	117
4.5.2. <i>Efecto de los taninos condensados en la fermentación in vitro de forrajeras tropicales y templadas</i>	120
4.5.3. <i>Papel de los TC en la cinética de producción de gas in vitro y potencial metanogénico de forrajeras</i>	122
4.5.4. <i>Distribución de la energía entre los productos finales de fermentación</i>	124
4.6. CONCLUSIONES	128
Capítulo 5. Conclusiones generales	129
Bibliografía	134

Índice de cuadros

Cuadro 1.1 Principales relaciones estequiométricas del proceso de metanogénesis ruminal.	4
Cuadro 2.1 Composición química de un suplemento comercial para vacas lecheras y de heno de alfalfa utilizados como sustratos (g/kg MS, excepto la materia seca, g/kg MH).	20
Cuadro 2.2 Producción de gas acumulada de las botellas blancos (<i>i.e.</i> licor + medio, sin sustrato) después de 24 h de fermentación, inoculadas con licores ruminales pre-incubados por 0, 1, 2 y 4 h (Control, Prei-1, Prei-2 y Prei-4, respectivamente) .	25
Cuadro 2.3 Perfil de ácidos grasos volátiles de las botellas blancos (<i>i.e.</i> licor + medio, sin sustrato) después de 24 h de fermentación, inoculadas con licores ruminales pre-incubados por 0, 1, 2 y 4 h (Control, Prei-1, Prei-2 y Prei-4, respectivamente).....	26
Cuadro 2.4 Parámetros de la cinética de producción de gas acumulada ($PGA = A + B * (1 - e^{(-c * tiempo)})$) con y sin corrección con blancos (<i>i.e.</i> Neta (PGAN) y Bruta (PGAB) respectivamente), digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia seca (ivDMS, g/kg MS), pH y N amoniacal (N-NH ₃) de licores pre-incubados por 0, 1, 2 y 4 h (Control, Prei-1, Prei-2 y Prei-4, respectivamente) e incubados por 24 h con 2 sustratos.	27
Cuadro 2.5 Perfil de ácidos grasos volátiles con y sin corrección de blancos de 2 sustratos; <i>i.e.</i> suplemento para vacas lecheras (Supl) y heno de alfalfa (Heno) después de 24 h de fermentación, inoculados con licores ruminales pre-incubados por 0, 1, 2 y 4 h (Control, Prei-1, Prei-2 y Prei-4, respectivamente).	28
Cuadro 2.6 Correlaciones entre valores después corregidos (PGAN) y sin corregir por blancos (PGAB) de los parámetros de producción de gas acumulada ($PGA = A + B * (1 - e^{(-c * tiempo)})$), obtenidos después de 24 h de fermentación, incubados con licores ruminales pre-incubados por 0, 1, 2 y 4 h (Control, Prei-1, Prei-2 y Prei-4, respectivamente).....	29
Cuadro 3.1 Composición química (g/kg, salvo para EB, Mcal/kg) de los ocho forrajes recuperados después de lavarlos con agua destilada (Lav) o sin lavar (Or).....	49
Cuadro 3.2 Composición química (g/kg, salvo para EB, Mcal/kg) de los tres forrajes tal cual (Or) o recuperados después de lavarlos con solución de detergente neutro y molidos en fresco (FDNfr) o después lavarlos con SDN y secarlos en estufa (60°C, 4h, FDNse).....	50
Cuadro 3.3 Producción de metano (g/kg) afectado por MS incubada (CH ₄ -MSi) o digerida (CH ₄ -MSd), MO digerida (CH ₄ -MOd) o como la proporción de energía perdida como metano (Y _m , mcal/mcal) de 8 forrajes lavados con agua o sin lavar (Original).....	52
Cuadro 3.4 Digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia seca y materia orgánica (ivDMS y ivDMO, respectivamente) de ocho forrajes templados y tropicales lavados con agua destilada o sin lavar (Original) después de 24, 48 y 72 h de fermentación.	54
Cuadro 3.5 Digestibilidad de la fibra en detergente neutro (DFDN) y FDN digerible (FDNd) de ocho forrajes templados y tropicales lavados con agua destilada o sin lavar (Original) después de 24, 48 y 72 h de fermentación.....	56

Cuadro 3.6 Fase Lag (h^{-1}) y tasas de producción de gas acumulada neta (post corrección con blancos) a la 10 y 60 h de ocho forrajes templados y tropicales lavados con agua destilada (Lav) o sin lavar (Original).....	60
Cuadro 3.7 Producción de ácidos grasos volátiles (AGV, mMol/l) después de 24 h de fermentación en de ocho forrajes templados y tropicales lavados con agua destilada o sin lavar (Original).....	63
Cuadro 3.8 Producción de ácidos grasos volátiles (AGV, mMol/l) después de 48 h de fermentación en de ocho forrajes templados y tropicales lavados con agua destilada o sin lavar (Original).....	64
Cuadro 3.9 Producción de ácidos grasos volátiles (AGV, mMol/l) después de 72 h de fermentación en de ocho forrajes templados y tropicales lavados con agua destilada o sin lavar (Original).....	65
Cuadro 3.10 pH y concentraciones de N proveniente del amoníaco ($N-NH_3$, mg/l) en el licor ruminal después de 24, 48 o 72 h de fermentación de ocho forrajes templados y tropicales lavados con agua destilada o sin lavar (Original).....	66
Cuadro 3.11 Producción de biomasa microbiana (BM, mg/100 mg de MO desaparecida) y eficiencia de síntesis de BM expresado como factor de partición (FP, mg de MO real digerida/ml de gas producido) de ocho forrajes templados y tropicales lavados con agua destilada o sin lavar (Original).....	68
Cuadro 3.12 Producción de metano (g/kg) afectado por MS incubada (CH_4-MSi) o digerida (CH_4-MSd), MO digerida (CH_4-MOd) o como la proporción de energía perdida como metano (Y_m , mcal/mcal) de 3 forrajes sin lavar (Original) o lavados con solución de detergente neutro analizados en fresco (FDNfr) o después de secados (FDNse).....	70
Cuadro 3.13 Digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia seca y materia orgánica (ivDMS y ivDMO, respectivamente) y digestibilidad de la fibra en detergente neutro (DFDN, % FDN) de 3 forrajes sin lavar (Original) o lavados con solución de detergente neutro analizados en fresco (FDNfr) o después de secados (FDNse).....	72
Cuadro 3.14 Producción de gas acumulada neta (PGAN, post corrección de blancos, ml), fase Lag (h^{-1}) y tasas de PGAN a las 10 y 42 h (T10 y T42, ml/h), de 3 forrajes sin lavar (Original) o lavados con solución de detergente neutro analizados en fresco (FDNfr) o después de secados (FDNse).....	74
Cuadro 3.15 Caracterización del licor ruminal por medio del pH, N proveniente del amoníaco ($N-NH_3$, mg/l), producción de biomasa microbiana (BM, mg MO real desaparecida) y eficiencia de síntesis de BM, expresada como factor de partición (FP, mg MO real desaparecida/ml de gas producido) en un sistema <i>in vitro</i> de 3 forrajes sin lavar (Original) o lavados con solución de detergente neutro analizados en fresco (FDNfr) o después de secados (FDNse).....	75
Cuadro 3.16 Perfil de ácidos grasos volátiles (AGV) después de 24 h de fermentación <i>in vitro</i> de 3 forrajes sin lavar (Original) o lavados con solución de detergente neutro analizados en fresco (FDNfr) o después de secados (FDNse).....	76

Cuadro 3.17 Perfil de ácidos grasos volátiles (AGV) después de 48 h de fermentación <i>in vitro</i> de 3 forrajes sin lavar (Original) o lavados con solución de detergente neutro analizados en fresco (FDNfr) o después de secados (FDNse).	77
Cuadro 4.1. Composición química (g/kg) de los dos forrajes que se utilizaron como sustrato (raigrás, RG y kikuyo, KK) y de los dos que se utilizaron como fuente de taninos condensados (TC; <i>Lotus uliginosus</i> , LU y Sauco) realizando los extractos correspondientes del experimento 2.....	99
Cuadro 4.2. Producción de metano (g/kg) después de 24 o 48 h de fermentación, afectado por MS incubada (CH4-MSi) o digerida (CH4-MSd), MO digerida (CH4-MOd) o como la proporción de energía perdida como metano (Ym, mcal/mcal) de 2 forrajes con el agregado de extracto de taninos condensados (TC).	104
Cuadro 4.3 Digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia seca (ivDMS), de la materia orgánica (ivDMO, g/kg MS) de la FDN (DFDN, g/ kg FDN) y FDN digestible (FDNd, g FDN/kg MS) después de 24 y 48 h de fermentación de 2 forrajes con de extracto de taninos condensados (TC) de <i>Lotus corniculatus</i> , <i>Quebracho sp.</i> o sin TC (Control), con o sin la adición de polietilenglicol (PEG o NP).....	105
Cuadro 4.4 Cinética de producción de gas acumulada neta (PGAN), con los parámetros de un modelo no lineal (parámetros A, B y c del modelo según Orskov), Fase Lag (h) y tasas horarias de PGAN a las 1, 10 y 42 h (ml/h, T1, T10 y T42) de la fermentación de 2 forrajes con extracto de taninos condensados (TC) de <i>Lotus corniculatus</i> , <i>Quebracho sp.</i> o sin TC (Control), con o sin la adición de polietilenglicol (PEG o NP).	106
Cuadro 4.5 Caracterización del licor ruminal, pH y concentración de nitrógeno amoniacal (N-NH ₃ , mg/lt), producción de biomasa microbiana (BM, mg/100 mg de MO desaparecida) y eficiencia de síntesis de BM expresado como factor de partición (FP, mg/ml) después de 24 y 48 h de fermentación de 2 forrajes con extracto de taninos condensados (TC) de <i>Lotus corniculatus</i> , <i>Quebracho sp.</i> o sin TC (Control), con o sin la adición de polietilenglicol (PEG o NP).....	108
Cuadro 4.6 Perfil de ácidos grasos volátiles (AGV) después de 24 h de fermentación de 2 forrajes con extracto de taninos condensados (TC) de <i>Lotus corniculatus</i> , <i>Quebracho sp.</i> o sin TC (Control), con o sin la adición de polietilenglicol (PEG o NP).	109
Cuadro 4.7. Perfil de ácidos grasos volátiles (AGV) después de 48 h de fermentación de 2 forrajes con extracto de taninos condensados (TC) de <i>Lotus corniculatus</i> , <i>Quebracho sp.</i> o sin TC (Control), con o sin la adición de polietilenglicol (PEG o NP).	110
Cuadro 4.8 Producción de metano (g/kg) después de 12, 24 o 48 h de fermentación, afectado por MS incubada (CH4-MSi) o digerida (CH4-MSd) o MO digerida (CH4-MOd) de 2 forrajes con el agregado de extracto de taninos condensados.	112
Cuadro 4.9 Digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia seca (ivDMS) y de la materia orgánica (ivDMO, g/ kg MS) después de 12, 24, 48 y 72 h de fermentación de 2 forrajes con la adición de diferentes extractos de taninos condensados.....	113

Cuadro 4.10 Cinética de producción de gas acumulada neta (PGAN), con los parámetros de un modelo no lineal ($PGA = A + B \times (1 - e^{-c \times t})$), Fase Lag (h) y tasas horarias instantáneas de PGAN a las 3, 11, 33 y 60 h (T3, T11 T33 y T60) de la fermentación de 2 forrajes con la adición de extractos de taninos condensados.	114
Cuadro 4.11 Eficiencia de síntesis de BM expresado como factor de partición (mg de MO digerida/ml de gas producido) de dos forrajes con extracto de taninos condensados.	116

Índice de figuras

- Figura 1.1** Productos derivados de la síntesis de los principales ácidos grasos volátiles producidos por fermentación ruminal.2
- Figura 1.2.** Estrategias más comunes utilizadas en la actualidad para reducir las emisiones de metano provenientes del rumen (adaptado de Eckard et al., 2010).9
- Figura 2.1** Representación esquemática de las 3 patas de la técnica de producción de gas *in vitro* (ivTPG). El sustrato es el elemento a evaluar, el medio actúa como una pata robusta, mientras que el inóculo supone el más variable y problemático de los componentes.15
- Figura 2.2** Arreglo metodológico utilizado para crear los tratamientos de pre-incubación (*i.e.* Control, Prei-1, Prei-2 y Prei-4; 0, 1, 2 y 4 horas de pre-incubación).19
- Figura 2.3** Comportamiento de los parámetros B y c del modelo no lineal de $PGA = A + B * (1 - e^{-(c * tiempo)})$ de los blancos en función del tiempo de pre-incubación.32
- Figura 2.4** Cinética de producción de gas bruta *in vitro* para cuatro inóculos tratados (Control [0 h de pre-incubación] y 1, 2 y 4 h de pre-incubación) para blancos (B, licor ruminal + medio buffer, sin sustrato, línea llena) y para botellas con un suplemento comercial para vaca lechera (S, línea punteada) y heno de alfalfa (H, línea con punto y raya) como sustratos.34
- Figura 2.5** Correlación entre valores corregidos y sin corregir por blancos de los parámetros de producción de gas acumulada ($PGA = A + B * (1 - e^{-(c * tiempo)})$), obtenidos después de 24 h de fermentación de 2 sustratos; *i.e.* suplemento para vacas lecheras y heno de alfalfa, incubados con licores ruminales pre-incubados por 0, 1, 2 y 4 h (Control, Prei-1, Prei-2 y Prei-4, respectivamente).37
- Figura 3.1** Digestibilidad *in vitro* de la materia seca (ivDMS, n=3) y materia orgánica (ivDMO, n=3) después de 48 h de fermentación para 5 sustratos (PD, *Paspalum dilatatum*, azul; ALF, Alfalfa (*Medicago sativa*, verde); RG, Raigrás (*Lolium perenne*, bordó); UB, *Urochloa brizanta*, gris; CC, *Cenchrus ciliaris*, violeta) evaluados tal cual (barras con colores enteros) y después de lavarlos con agua destilada (cilindros con trama). Interacción sustrato × tratamiento, las diferencias entre los tratamientos para cada sustrato fueron significativas; $p < 0,05$53
- Figura 3.2** Digestibilidad *in vitro* de la materia seca (ivDMS, n=3) y de la materia orgánica (ivDMO, n=3) después de 72 h de fermentación para 2 sustratos (PD, *Paspalum dilatatum*, azul y CC, *Cenchrus ciliaris*, violeta) evaluados tal cual (barras con colores enteros) y después de lavarlos con agua destilada (cilindros con trama). Interacción sustrato × tratamiento, las diferencias entre los tratamientos para cada sustrato fueron significativas; $p < 0,05$55
- Figura 3.3** Digestibilidad de la fibra en detergente neutro (DFDN, % FDN, n=3) después de 48 y 72 h de fermentación para 3 sustratos (PD, *Paspalum dilatatum*, azul; MC, *Milium coloratum*, naranja y ALF, Alfalfa (*Medicago sativa*, verde)) evaluados tal cual (barras con colores enteros) y después de lavarlos con agua destilada (cilindros con trama). Interacción sustrato × tratamiento, las diferencias entre los tratamientos para cada sustrato fueron significativas; $p < 0,05$57

- Figura 3.4** Producción de gas acumulada *in vitro* en función del tiempo de incubación para ocho forrajeras (ALF, Alfalfa (*Medicago sativa*); MC, *Milium coloratum*; CG, *Chloris gayana*; PD, *Paspalum dilatatum*; RG, Raigrás (*Lolium perenne*); UB, *Urochloa brizanta*; CC, *Cenchrus ciliaris*; MM, *Megathyrsus maximus*, n=3). **58**
- Figura 3.5** Producción de gas acumulada neta (post-corrección con blancos, PGAN, ml) después de 48 y 72 h de fermentación para 2 sustratos (PD, *Paspalum dilatatum*, azul y CC, *Cenchrus ciliaris*, violeta, n=3) evaluados tal cual (barras con colores enteros) y después de lavarlos con agua destilada (cilindros con trama). Interacción sustrato × tratamiento, las diferencias entre los tratamientos para cada sustrato fueron significativas; $p < 0,05$ **58**
- Figura 3.6** Fase Lag de fermentación (período inicial sin fermentación detectable, h^{-1}) para 3 sustratos (PD, *Paspalum dilatatum*, azul, RG, Raigrás (*Lolium perenne*, bordó) y MC, *Milium coloratum*, naranja, n=3) evaluados tal cual (barras con colores enteros) y después de lavarlos con agua destilada (conos con colores degradados). Interacción sustrato × tratamiento, las diferencias entre los tratamientos para cada sustrato fueron significativas; $p < 0,05$ **59**
- Figura 3.7** Tasas horarias de producción de gas acumulada neta (medianas) para distintas horas de incubación para ocho forrajeras (ALF, Alfalfa (*Medicago sativa*); MC, *Milium coloratum*; CG, *Chloris gayana*; PD, *Paspalum dilatatum*; RG, Raigrás (*Lolium perenne*); UB, *Urochloa brizanta*; CC, *Cenchrus ciliaris*; MM, *Megathyrsus maximus*) evaluadas tal cual (Originales, n=3) y después de lavarlas con agua (Lavados, n=3). **61**
- Figura 3.8** Factor de partición (mg de MO desaparecida/ ml de gas producido) después de 48 y 72 h de fermentación para 2 sustratos (PD, *Paspalum dilatatum*, azul y CC, *Cenchrus ciliaris*, violeta, n=3) evaluados tal cual (barras con colores enteros) y después de lavarlos con agua destilada (cilindros con trama). Interacción sustrato × tratamiento, las diferencias entre los tratamientos para cada sustrato fueron significativas; $p < 0,05$ **67**
- Figura 3.9** Producción de metano (g/kg) afectado por MS digerida (CH₄-MSd, n=6) y MO digerida (CH₄-MOd, n=6) de 3 forrajes (CG, *Chloris gayana*, celeste, entero; MC, *Milium coloratum*, naranja, puntillado y RG, Raigrás (*Lolium perenne*, bordó con cuadrículas) después de 24 o 48 h de incubación. Letras diferentes en cada grupo de barras indican $p < 0,05$ **71**
- Figura 3.10** Producción de gas acumulada observada (líneas y marcadores enteros) y estimada a través del modelo de Orskov ($PGA = A + B \times (1 - \exp^{-c \times t})$, líneas punteadas, marcadores sin relleno, n=6), de *Milium coloratum* (MC, naranja, cuadrados) y *Paspalum dilatatum* (PD, azul, triángulos). **79**
- Figura 3.11** Producción de gas acumulada estimada a través del modelo de Orskov y McDonald (1979; $PGA = A + B \times (1 - \exp(-c \times t))$) de ocho forrajeras; ALF, Alfalfa (*Medicago sativa*); MC, *Milium coloratum*; CG, *Chloris gayana*; PD, *Paspalum dilatatum*; RG, Raigrás (*Lolium perenne*); UB, *Urochloa brizanta*; CC, *Cenchrus ciliaris*; MM, *Megathyrsus maximus*, n=3). **80**

- Figura 3.12** Producción de gas acumulada (PGA, líneas violeta, rombos), digestibilidad *in vitro* de la MS (ivDMS, líneas naranjas, cuadrados, g/kg de MS) y FDN digestible (FDNd, líneas verdes, círculos, g FDN/kg de MS) producto de la fermentación de *Paspalum dilatatum* (PD) sin lavar (líneas y marcador enteros, n=3) o después de lavarlo con agua para extraer los compuestos solubles (líneas punteadas, marcador vacío, n=3)..... **82**
- Figura 3.13** Relación entre la PGA observada en el sistema *in vitro* (en 24 h), y la PG estimada estequiometricamente a partir del perfil de AGV, según (Blümmel et al., 1999) de ocho forrajes en el exp. 1, (ALF, Alfalfa (*Medicago sativa*); MC, *Milium coloratum*; CG, *Chloris gayana*; PD, *Paspalum dilatatum*; RG, Raigrás (*Lolium perenne*); UB, *Urochloa brizanta*; CC, *Cenchrus ciliaris*; MM, *Megathyrsus maximus*)..... **87**
- Figura 3.14** Relación entre la PGA observada en el sistema *in vitro* (en 24 h), y la PG estimada estequiometricamente a partir del perfil de AGV según Blümmel et al. (1999) de los sustratos evaluados en el exp. 2 (MC, *Milium coloratum*; CG, *Chloris gayana*; RG, Raigrás (*Lolium perenne*)). **88**
- Figura 3.15** Relación entre la PGA observada en el sistema *in vitro* (en 24 h), y la PG estimada estequiometricamente a partir del perfil de AGV según Blümmel et al. (1999) de los sustratos evaluados tal cual (Or), lavados con SDN, frescos (FDNFr) y secados en estufa (FDNSe) del exp. 2..... **89**
- Figura 4.1.** Producción de gas acumulada neta (PGAN, ml/g de MS incubada) de los sustratos utilizados en los dos experimentos (exp. 1, n=18 y exp. 2, n=18) que conforman el presente capítulo (RG, raigrás, *Lolium perenne*, KK, kikuyo, *Penisetum purpureum*; MM, *Megathyrsus maximus*). **118**
- Figura 4.2** Relación entre la producción de metano *in vitro* y la producción de ácido acético productos de la fermentación *in vitro* de *Megathyrsus maximus* (MM) y raigrás (*Lolium perenne*, RG) después de 24 h de incubación..... **119**
- Figura 4.3** Relación entre la producción de metano *in vitro* y la producción de ácido acético productos de la fermentación *in vitro* de *Megathyrsus maximus* (MM) y raigrás (*Lolium perenne*, RG) después de 48 h de incubación. **120**
- Figura 4.4.** Relación entre la producción de gas acumulada (PGA) observada en el sistema *in vitro* (en 24 h), y la PG estimada estequiometricamente a partir del perfil de AGV según Blümmel et al. (1999) de los sustratos evaluados en el exp. 1 (MM, *Megathyrsus maximus*; RG, Raigrás (*Lolium perenne*)). **121**
- Figura 4.5** Concentración de ácidos grasos volátiles totales (AGV) y proporciones de los AGV más importantes (ácidos acético, propiónico y butírico) del residuo de fermentación *in vitro* después de 24 o 48 h para los tratamientos sin agregado de TC (Control) o con extracto de *Lotus corniculatus* o Quebracho del exp. 1 (n=12). **125**
- Figura 4.6** Relación entre la concentración de ácidos grasos volátiles totales (AGV, acético, propiónico y butírico, n=12) del residuo de fermentación y producción de CH₄ *in vitro* (g/kg MS o MO desaparecida, CH₄-MSd y CH₄-MOb, respectivamente), después de 24 o 48 h para los tratamientos sin agregado de TC (Control) o con extractos de *Lotus corniculatus* o Quebracho del exp. 1. **126**

Declaración

“Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original, producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución”

Abreviaturas

Ac: Pro	Relación molar acético/propiónico
aFDN _{MO}	Fibra insoluble en detergente neutro con α -amilasa y libre de cenizas
AGV	Ácidos grasos volátiles
AGVt	Concentración total de ácidos grasos volátiles
ALF	Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>)
BM	Biomasa microbiana
CC	<i>Cenchrus ciliaris</i>
CE	Carbohidratos estructurales
Cen	Cenizas
CG	<i>Chloris gayana</i>
CH ₄ -MOd	Producción de metano afectado por la materia orgánica desaparecida
CH ₄ -MSd	Producción de metano afectado por la materia seca desaparecida
CH ₄ -MSi	Producción de metano afectado por la materia seca incubada
CS	Compuestos solubles
CSA	Compuestos solubles en agua
CSDN	Compuestos solubles en detergente neutro
CV	Coefficiente de variación
CVMS	Consumo voluntario de la materia seca
DE	Desvío estándar
DFDN	Digestibilidad de la fibra insoluble en detergente neutro
<i>e.g.</i>	“por ejemplo” del latín “ <i>exempli gratia</i> ”
EB	Energía bruta
EE	Extracto etéreo
EEM	Error estándar de la media
ESBM	Eficiencia de síntesis de biomasa microbiana
FDA _{MO}	Fibra insoluble en detergente ácido libre de cenizas
FDN	Fibra insoluble en detergente neutro
FDNd	Fibra insoluble en detergente neutro digestible
Hemi	Hemicelulosa
<i>i.e.</i>	“esto es” del latín “ <i>id est</i> ”
ivDMO	Digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia orgánica
ivDMS	Digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia seca
LDA _{MO}	Lignina obtenidas
MC	<i>Milium coloratum</i>
MH	Materia húmeda
MM	<i>Megathyrsus maximus</i>
MS	Materia seca
NH ₃	Amoníaco
N-NH ₃	Nitrógeno amoniacal

Or	Sustrato utilizado tal cual, sin ningún tratamiento de lavado
PB	Proteína bruta
PCH ₄	Producción de metano
PCP	Pared celular purificada. Referido al residuo después de lavar con SDN.
PD	<i>Paspalum dilatatum</i>
PEG	Polietilenglicol (inhibidor específico de los taninos condensados)
PG	Producción de gas
PGA	Producción de gas acumulada
PGAB	Producción de gas acumulada bruta, sin corrección por blancos
PGAN	Producción de gas acumulada neta, post-corrección por blancos
RG	Raigrás (<i>Lolium perenne</i>)
SDN	Solución de detergente neutro
TC	Taninos condensados
UB	<i>Urochloa brizanta</i>
VN	Valor nutritivo
YM	Proporción de energía bruta incubada/consumida perdida como metano

Resumen

El propósito general de este trabajo fue contribuir al conocimiento sobre el potencial metanogénico y el valor nutricional de varias forrajeras tropicales (*i.e.* metabolismo fotosintético C4). Se analizaron *Milium coloratum*; *Chloris gayana*; *Paspalum dilatatum*; *Urochloa brizanta*; *Cenchrus ciliaris* y *Megathyrsus maximus*, además de Alfalfa (*Medicago sativa*) y Raigrás (*Lolium perenne*), evaluando las características nutricionales y el rol de los compuestos solubles (**CS**), las características de la pared celular (**PC**) y la presencia de compuestos secundarios (*i.e.* taninos condensados, **TC**) sobre la eficiencia de digestión y los productos de la fermentación (gases, ácidos grasos volátiles (**AGV**) y biomasa microbiana, **BM**). Se utilizó la técnica de producción de gas *in vitro* (**PG**), y se hipotetizó que una pre-incubación del licor ruminal generaría un inóculo más homogéneo, conjetura que resultó refutada. Aún teniendo perfiles químicos similares, se encontró un comportamiento heterogéneo en la eficiencia de digestión y potencial metanogénico de las forrajeras C4, dependiente tanto de características de los CS como de las PC. Al eliminar los CS de *P. dilatatum*, aumentó la digestibilidad y disminuyó la PG (con el consecuente aumento de BM), lo cual indica que algún CS (o el mismo lavado) afectó la fermentación sólo en este forraje. Asimismo, el secado de los sustratos previo a la incubación *in vitro* alteró la fermentación en forma diferencial. La adición de extractos de TC indujo diferencias en los perfiles fermentativos en las forrajeras, por lo cual se recomienda una mejor caracterización de los TC para estudios futuros. A su vez, el análisis estequiométrico de los procesos bioquímicos del rumen demostró que la relación entre los AGV y la PG dependería de las diferencias asociadas al sustrato, sugiriendo la necesidad de profundizar su estudio.

Palabras Clave: Compuestos secundarios, Estequiometría ruminal, Forrajeras tropicales, Gases con efecto invernadero, Metabolismo ruminal, Metano, Nutrición de rumiantes, Pared celular, Taninos condensados.

Abstract

The overall purpose of this work was to contribute to the studies about methanogenic capacity and the nutritional value of various tropical forages (*i.e.* C4 pathway of photosynthesis); *Milium coloratum*; *Chloris gayana*; *Paspalum dilatatum*; *Urochloa brizanta*; *Cenchrus ciliaris* and *Megathyrsus máximus*, in addition to Alfalfa (*Medicago sativa*) and Ryegrass (*Lolium perenne*) were analyzed. Their nutritional characteristics and the role performed by the soluble components (**SC**), the cell wall (**CW**) characteristics and the presence of secondary compounds (*i.e.* condensed tannins, **CT**) on the efficiency of digestion and the fermentation products (gases, volatile fatty acids (**VFA**) and microbial biomass, **MB**) were analyzed. The *in vitro* gas production (**GP**) technique was used, and it was hypothesized that a pre-incubation of the rumen fluid would generate a more homogeneous inoculum, conjecture that was rejected. Even with similar chemical profiles, a heterogeneous behaviour was found in the efficiency of digestion and methanogenic capacity of C4 forages, depending on both the characteristics of SC and on the CW. By eliminating SC of *P. dilatatum*, digestibility increased and GP decreased (with the consequent increase in MB), indicating that a SC (or the same wash) affected fermentation only in this forage. Moreover, the drying of substrates prior to *in vitro* incubation modified fermentation differentially. The addition of extracts of CT induced differences in forage fermentation profiles, therefore a better characterization of the CT is recommended for future studies. In turn, the stoichiometric analysis of biochemical processes in the rumen showed that the relationship between the VFA and GP depend on the differences associated to the substrate, suggesting the need for further study.

Keywords: Cell wall, Condensed tannins, Greenhouse gases, Methane, Ruminal metabolism, Ruminal stoichiometric, Ruminant nutrition, Soluble compound, Tropical forages.

Capítulo 1.

Estado actual del conocimiento sobre el potencial metanogénico y eficiencia de digestión de forrajeras megatérmicas

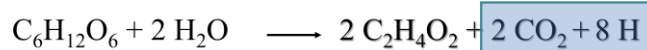
1.1. Introducción

Los rumiantes poseen un sistema digestivo altamente especializado que gracias a la presencia de estructuras anatómicas fuertemente adaptadas, les permite retener una población microbiana (bacterias, metanógenos, protozoarios ciliados y hongos anaeróbicos) que mediante una estrecha relación simbiótica les otorga la capacidad de obtener nutrientes y energía a partir de alimentos fibrosos en forma más eficiente que otros herbívoros (Morgavi et al., 2010). Los microorganismos ruminales transforman los polisacáridos en ácidos grasos volátiles (**AGV**), biomasa microbiana (**BM**) y productos gaseosos de desecho (*e.g.* dióxido de carbono y metano, Van Soest, 1994).

Los AGV retienen buena parte de la energía originalmente disponible en los carbohidratos y son aprovechados para el metabolismo energético de los rumiantes. Además, la concentración total así como la proporción de cada uno de ellos en la producción total (*i.e.* perfil de AGV), están relacionados en gran medida con el volumen y la composición de los gases de fermentación (Blümmel et al., 1999), ya que solo la formación de acético y butírico libera CO₂ y H₂, que actúan como precursores de CH₄, mientras que, por el contrario, la formación de propiónico demanda H⁺ (Figura 1.1, Janssen, 2010). Teniendo en cuenta que la fermentación del alimento y la síntesis de proteína microbiana en el rumen son los principales eventos producto de la digestión en los rumiantes, las herramientas de evaluación de alimentos deberían ser capaces de describirlos (Kiran y Krishnamoorthy, 2007).

Las técnicas *in vitro* de producción de gas (Cone, 1998; Menke y Steingass, 1988; Schofield y Pell, 1995a; Theodorou et al., 1994) son herramientas muy valiosas para los nutricionistas, ya que pueden cuantificar la desaparición del sustrato incubado, la cinética de fermentación y los productos que generan los microorganismos presentes en el inóculo. Sin embargo, aunque esta técnica es utilizada ampliamente para describir la calidad nutricional de los alimentos para rumiantes, aún existen investigadores que cuestionan algunos aspectos de la metodología (*e.g.* la variabilidad existente en los diferentes inóculos utilizados, Mould et al., 2005b) y reclaman estudios que permitan desarrollar una herramienta más confiable, con menor variabilidad (Krishnamoorthy et al., 2005).

Acetato



Propionato (ruta del acrilato)



Butirato

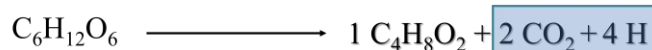


Figura 1.1 Productos derivados de la síntesis de los principales ácidos grasos volátiles producidos por fermentación ruminal.

La retención de energía y nutrientes por parte de los animales determina en buena medida la productividad de los sistemas ganaderos y desde el punto de vista nutricional está mayoritariamente determinada por las características del alimento (*e.g.* contenidos de fibra, lignina, almidón) y su interacción con el sistema digestivo del animal (AFRC, 1987; NRC, 2001). Producto de dicha interacción, durante el proceso de aprovechamiento de los alimentos (*i.e.* digestión) suceden pérdidas de energía y nutrientes, como ser pérdidas fecales, gaseosas e incremento calórico (asociado al trabajo digestivo y a la fermentación ruminal), y con el metabolismo de los nutrientes, *i.e.* pérdidas urinarias y de calor, vinculado con el calor dinámico específico de los nutrientes (Van Soest, 1994).

Al comparar distintos alimentos, las pérdidas fecales pueden variar entre un 10 y un 70% de la energía bruta (EB) del alimento, lo que posiciona a esta pérdida como el factor singular con mayor contribución al valor nutritivo del alimento (Blaxter, 1989). Durante la digestión ruminal, la producción de gas asociada (principalmente CO₂ y CH₄) constituye un significativo desperdicio (Beauchemin et al., 2008), que además contribuye con gases de efecto invernadero (Benchaar et al., 2008). La pérdida por CH₄ puede variar entre 2 y 15% de la EB consumida y está influida por el nivel de consumo y por las características de la dieta (*e.g.* el procesamiento del forraje, contenido y composición de la fibra, uso de ionóforos o compuestos anti-nutricionales, presencia de ácidos grasos poli-insaturados, nitratos y sulfatos, Beauchemin et al., 2008; Benchaar et al., 2008; Johnson y Johnson, 1995). Por último, la pérdida de EB como calor de fermentación rondaría entre el 5 y el 10%; para la pérdida urinaria se suele considerar entre un 5 y un 8% (Blaxter, 1989).

Actualmente, existe un creciente interés en estudiar la contribución de los rumiantes a la emisión de sustancias con efecto invernadero, ya que se estima que los rumiantes producen 80 millones de toneladas de CH₄ por año, representando el 28% de las emisiones antropomórficas con efecto invernadero (Beauchemin et al., 2008). El proceso de metanogénesis ruminal implica la captación de H⁺ y la reducción gradual de CO₂ por parte de *archaea* metanogénicas ruminales (*e.g.* *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobacterium formicicum* y *Methanomicrobium móbile*; Morgavi et al., 2010). Estos microorganismos pueden sintetizar metano a partir de distintos sustratos, aunque mayoritariamente emplean H₂ y CO₂ y en menor medida pueden utilizar formiato (sal del ácido fórmico, Ungerfeld, 2015), acetato, metanol y metilaminas (Church, 1993, Cuadro 1.1).

Las interacciones entre los microorganismos ruminales son múltiples y variadas, se generan lazos entre diferentes microorganismos, como por ejemplo *Methanobrevibacter ruminantium* que aparece unido a la pared de los protozoarios. Se supone que esta relación facilita la transferencia de H₂ y extiende la sobrevivencia de estos hospedadores (Janssen, 2010). Alrededor de un 25 % de las *archaea* metanogénicas actualmente conocidas están asociadas a los protozoarios (Morgavi et al., 2010).

Cuadro 1.1 Principales relaciones estequiométricas del proceso de metanogénesis ruminal.

Sustrato	Ecuación		
H ₂ y CO ₂	$4 H_2 + CO_2$	\Rightarrow	$CH_4 + 2 H_2O$
Formiato	$4 HCO_2H$	\Rightarrow	$CH_4 + 3 CO_2 + 2 H_2O$
Metanol	$4 CH_3OH$	\Rightarrow	$3 CH_4 + CO_2 + 2 H_2O$

Por otro lado, las poblaciones microbianas se ven afectadas por las características del alimento, que determinan en gran medida los productos de fermentación que se generan en el rumen, por ejemplo, el CH₄ (Johnson y Johnson, 1995). Entre los principales determinantes de las emisiones de CH₄ se destaca el consumo de materia seca (en gran parte debido a la interacción animal-alimento). Sin embargo las características de los alimentos también influyen en forma significativa, especialmente a través de la proporción de fibra insoluble en detergente neutro (**FDN**), la composición de la pared celular y la digestibilidad de la materia seca (Blaxter and Clapperton, 1965; Jaurena et al., 2015; Moe and Tyrrell, 1979). Consecuentemente son esperables diferencias en el potencial metanogénico de distintas especies forrajeras en función de las características antes mencionadas (*e.g.* forrajeras templadas vs forrajeras tropicales; Archimède et al., 2011), no obstante lo cual persisten diferencias que podrían explicarse por la presencia de otros compuestos (*e.g.* taninos).

Existen descripciones cuali y cuantitativas de los productos de fermentación de diversos alimentos para rumiantes, y de cómo las características químico-nutricionales (*e.g.* concentración de fibra y de los componentes de pared celular, cantidad de N y energía disponible, proporción de componentes secundarios) afectan la fermentación y el aprovechamiento de los alimentos. Sin embargo, en muchos de estos trabajos estas evaluaciones no pasan de meras descripciones. Entre los aspectos nóveles de esta tesis se pretende lograr un mayor grado de integración de estas descripciones, con el propósito de comprender y mejorar la capacidad de predicción de la energía metabolizable de los alimentos, a partir de las características cuali-cuantitativas de la fermentación. Una alternativa menos ambiciosa sería mejorar la comprensión de la relación entre las características de los forrajes y la ineficiencia de digestión ruminal (definida aquí como la proporción de la EB perdida en forma sólida o gaseosa durante la digestión ruminal)¹.

Actualmente, tanto a nivel nacional como internacional existe un creciente interés en valorar los recursos nativos y las especies forrajeras capaces de desarrollarse con limitantes edáficas y climáticas (regiones tropicales y subtropicales), tales como las

¹ El concepto de “Ineficiencia de digestión” sería análogo al de indigestibilidad, pero permitiría elaborar un indicador de “Eficiencia de digestión” que tendría en cuenta las pérdidas gaseosas de digestión ruminal, además de las sólidas.

denominadas forrajeras megatérmicas. A nivel nacional, este fenómeno responde a la presión de la agricultura que ha promovido la reasignación del ganado bovino en la región pampeana, a potreros con suelos con limitaciones de humedad y salinidad, y a que en las zonas extra-pampeanas (fundamentalmente el centro del país, NOA y NEA) se ha producido una creciente retención de terneros (futuros novillos engordados con pasturas a campo, Rearte, 2011).

A escala mundial, la creciente preocupación por las consecuencias del calentamiento global han llevado a científicos y empresas especializadas a ocuparse de estudiar el desempeño de las forrajeras megatérmicas en los posibles escenarios futuros, por ejemplo: *Livestock Emissions Abatement Research Network, LEARN, Warm Season C4 Grasses for Adaptation to Climate Change, Gramina – grass for innovation, Victoria (Austr.) 2008* y los talleres sobre “*Molecular breeding of pasture plants for climate change adaptation and mitigation*” organizados en Victoria (Australia, 2008), en Buenos Aires (Argentina, 2010, 2015) y en San Pablo (Brasil, 2010).

Consecuentemente, los programas de fitomejoramiento están reorientándose a la identificación de caracteres mejorables por selección tradicional o por medios biotecnológicos para reducir el contenido de lignina, incorporar sustancias con efectos benéficos (Soliva et al., 2008) y reducir el potencial metanogénico (Goel et al., 2008).

Por otro lado es importante tener presente la amplia diversidad que existe entre las distintas especies megatérmicas y nativas (también de interés dentro del contexto antes explicado). Muchas de ellas presentan sustancias que modifican su valor nutritivo, y probablemente también su potencial metanogénico. Por ejemplo, la mayoría de los cultivares de *Brachiaria*, que presentan saponinas (Patra y Saxena, 2010). Aunque el uso de este tipo de forrajeras tropicales y subtropicales no es nuevo, la caracterización de su calidad nutricional, así como de la partición de la energía entre los diferentes productos de fermentación es relativamente escasa. Por lo cual, si bien el interés por manipular los procesos fermentativos ruminales, y de esta forma, los productos resultantes (*i.e.* metano, AGV y BM), no es nuevo, hoy en día, por las razones antes expuestas, existe un renovado empeño.

1.1.1. Utilización de los compuestos secundarios en la función ruminal

Los antibióticos promotores del crecimiento (*i.e.* Monensina, Lasalocid) han sido utilizados desde hace muchos años en todo el mundo, ya que además de maximizar el aprovechamiento de nutrientes, son depresores del gas producido en el rumen (Quinn et al., 2009; Odongo et al., 2007); sin embargo, la actual resistencia por parte de los consumidores al uso de antibióticos y sustancias sintéticas en los animales de granja ha limitado su uso en aquellos destinados para consumo en la Unión Europea (Diario Oficial de la Unión Europea, 2003). Consecuentemente, en los últimos años se ha empezado a estudiar la utilización de compuestos naturales para obtener resultados semejantes, que permitan salvaguardar la salud humana y el bienestar animal. Por estos motivos, es que los compuestos secundarios producidos por plantas han cobrado mayoritaria atención.

Muchos vegetales producen metabolitos secundarios, algunos con propiedades antinutricionales que protegen a las plantas de la depredación por parte de insectos y herbívoros (Bodas et al., 2008), entre los cuales se encuentran los aceites esenciales, los terpenos (*e.g.* saponinas) y los compuestos fenólicos (*e.g.* taninos).

Los aceites esenciales son componentes naturales de las plantas presentes en raíces, corteza, hojas, flores, tallos, pétalos y fructificaciones, de naturaleza diversa que les confieren esencia y color característicos (Hirasa, 1998). Las saponinas, presentes en varias especies vegetales, forman espuma por agitación en agua y tradicionalmente han sido estudiadas por sus efectos nocivos sobre los animales asociados a la disminución del consumo, ganancia de peso, y con el timpanismo espumoso en rumiantes pastoreando leguminosas (Patra y Saxena, 2010).

Si bien tanto los aceites esenciales como las saponinas han sido estudiados por los posibles efectos sobre la digestibilidad, la utilización del N y la producción de CH₄ (PCH₄) (Agarwal et al., 2009; Alexander et al., 2008; Beauchemin y Mcginn, 2006; Benchaar y Greathead, 2011), son los taninos (en especial los taninos condensados, TC) los compuestos secundarios que poseen mayor potencialidad de mitigación de metano, pudiendo provocar una disminución de hasta un 46 %, sin riesgo de toxicidad (Knapp et al., 2014), promoviendo además, una mejora en el aprovechamiento de la proteína (Carulla et al., 2005; Grainger et al., 2009a). Los taninos se encuentran en una amplia variedad de especies vegetales y son sustancias fenólicas que precipitan proteínas gracias a la presencia de grupos hidroxilo (Frutos et al., 2004), y es debido a esta capacidad de precipitar proteínas y modificar su degradabilidad ruminal, que han sido foco de estudios por numerosos grupos (Rodríguez et al., 2009; Salem et al., 2007), y también han sido señalados como los causantes de la diferencia en la PCH₄ entre leguminosas templadas y tropicales (Archimède et al., 2011).

1.1.2. Compuestos estructurales y no estructurales de los forrajes templados y tropicales y su rol en la fermentación ruminal

En rumiantes el consumo voluntario y la digestibilidad del alimento son altamente dependientes de la cantidad y características de la pared celular del forraje consumido (Van Soest, 1994), para lo cual comprender cómo y en que magnitud se digiere dicha fibra (*i.e.* fundamentalmente los carbohidratos estructurales) es tan importante para valorar la calidad nutricional de dichos alimentos. Las paredes celulares vegetales en gran parte están constituidas por compuestos insolubles en agua que son atacados enzimáticamente por poblaciones bacterianas que se encargan de romper los enlaces entre carbonos para obtener energía, y que por su naturaleza resultan retenidos en el rumen durante periodos variables (Van Soest, 1994).

El sistema de los lavados con detergentes de Van Soest (1991) es una excelente herramienta para fraccionar los componentes de pared celular, y proveer de información valiosa a los nutricionistas de rumiantes. Las características identificadas por este sistema son especialmente relevantes para evaluar forrajeras en general y particularmente para las tropicales que tienen altas concentraciones de fibra con

estructuras anatómicas especializadas, ligadas a su metabolismo fotosintético C₄, lo que las hace de difícil y lenta digestión (Preston y Leng, 1980).

Por otro lado, los compuestos no estructurales también afectan el proceso de digestión. Es bien conocido el efecto de los carbohidratos solubles en agua, en detergente neutro, o el mismo almidón sobre la digestibilidad del forraje, la cinética y los productos de fermentación (Wawrzkievicz, 2010). Adicionalmente se han identificado otras sustancias (algunas de ellas poco conocidas), tales como metabolitos secundarios o compuestos solubles no-carbohidratos que pueden modificar la eficiencia de digestión (Schofield y Pell, 1995b).

El efecto de los compuestos solubles (**CS**) de los forrajes sobre la digestibilidad y la fermentación se puede estudiar analizando las diferencias en estas características entre el sustrato original y la fracción insoluble (luego de eliminar los compuestos solubles en agua o detergente neutro; Schofield y Pell, 1995a; Stefanon et al., 1996).

1.1.3. Utilización del sistema de producción de gas *in vitro* para la evaluación de forrajes

Hasta el presente, los sistemas de evaluación de alimentos utilizados para determinar la densidad energética de los alimentos (expresada como energía metabolizable), se valen de la medición de la digestibilidad para estimar la pérdida fecal y luego predicen las pérdidas urinarias y gaseosas en forma conjunta (18%, para estimar la energía metabolizable del alimento; ARC, 1980). El empleo de las pérdidas fecales como única medición de las pérdidas de digestión no sólo se debe a su alta contribución a la pérdida total, sino a lo sencilla y objetiva que resulta medirla. Por el contrario, las pérdidas gaseosas (pese a producirse en el mismo sitio y etapa de digestión), al ser de difícil medición (exigen equipamiento especial y costoso), son estimadas junto con las pérdidas urinarias (Blaxter, 1989). Sin embargo, el potencial metanogénico entre dietas y forrajes de composición química y digestibilidad similares puede variar ampliamente (Getachew et al., 2005). Como las características fermentativas de los carbohidratos y proteínas dietarias influyen la eficiencia de síntesis de biomasa microbiana (**ESBM**), estos patrones fermentativos deberían ser considerados en la formulación de la dieta para rumiantes.

La producción de gas *in vitro* como técnica para la evaluación de alimentos se fundamenta en la asociación que existe entre la digestión ruminal de la MO y la producción de gas (**PG**, Mould, 2003; Mould et al., 2005a). Refuerza esta fundamentación la relación existente entre los productos de desecho y los productos de fermentación útiles para el metabolismo (*i.e.* AGV y BM, Blümmel et al., 1999, 1997a). En los sistemas *in vitro*, con el propósito de obtener una descripción completa del proceso de fermentación, los respectivos sustratos y productos deberían ajustarse a la siguiente ecuación:

Sustrato incubado– sustrato no digerido = BM + AGV + Gases

Donde,

Sustrato real degradado: residuo luego de remover los microorganismos adherentes y los productos de fermentación solubles y pequeños mediante el lavado con solución de detergente neutro (SDN; Goering y Van Soest, 1970),

BM: biomasa microbiana,

AGV: ácidos grasos volátiles,

Gases: CO₂ + CH₄.

Este modelo conceptual fue originalmente elaborado por Blümmel et al. (1997a), quienes definieron que la BM se podía estimar a partir de la determinación de la cantidad de sustrato desaparecido, la producción de AGV y gases. Como consecuencia de esto, y teniendo en cuenta la relación estequiométrica existente entre el gas de fermentación y el perfil de AGV, Blümmel et al. (1997c, 1994) encontraron una relación inversa entre gas de fermentación producido *in vitro* y la BM por unidad de sustrato verdaderamente degradado. Lo que implicaría que no necesariamente una mayor producción de gas traería aparejado una mayor aporte de proteína microbiana para el rumiante.

La relación entre la MO realmente desaparecida y la producción de gas fue definida como el factor de partición (FP) de los nutrientes que se correlaciona fuertemente con la proporción de sustrato verdaderamente degradado que se destina para producción de células microbianas (Blümmel et al., 1997c). Actualmente la mayor disponibilidad de medios técnicos (*e.g.* cromatografía de gases para la evaluación de CH₄ y AGV) facilitaría el desarrollo de un refinamiento sobre los modelos antes discutidos, tales como la eficiencia de digestión antes presentada que incluiría las pérdidas energéticas de digestión (*i.e.* sólidas y gaseosas, ver nota al pie N°1, página 7).

Por lo antes expuesto, se puede asumir que para mejorar la eficiencia de utilización de los alimentos, se deberían utilizar herramientas que estimulen la digestibilidad de la fibra, mejoren la ESBM y generen un descenso en la PCH₄, (Blümmel y Lebzien, 2001; Guo et al., 2009; Nagajara et al., 1997).

1.1.4. Importancia ambiental y nutricional de las emisiones de metano por parte de los rumiantes.

El creciente interés en las emisiones de gases con efecto invernadero obliga a evaluar en qué medida la alimentación animal puede contribuir a mitigar la emisión de CH₄. Los alimentos fibrosos producen mayores concentraciones de CH₄ por g MS digerida que los concentrados (Johnson y Johnson, 1995), y se han reportado en países con grandes sistemas ganaderos pastoriles como Australia (McCrabb y Hunter, 1999) y Nueva Zelanda (Ulyatt et al., 2002) importantes emisiones de CH₄ en animales consumiendo forrajes. De las herramientas exploradas como potenciales mitigadoras de CH₄, las más utilizadas se han centrado en el manejo de los animales (cría y manejo), manipulación del rumen (controles biológicos, vacunaciones específicas y defaunación)

y manejo de la dieta (calidad de forraje, mejoramiento genético vegetal, suplementación y utilización de aditivos, Figura 1.2, Eckard et al., 2010).

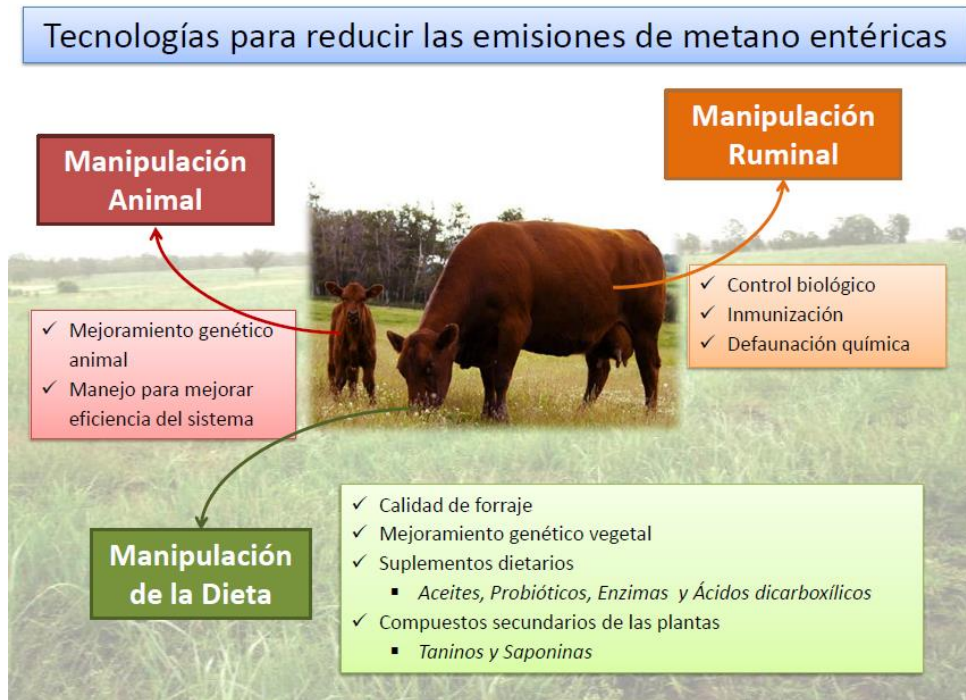


Figura 1.2. Estrategias más comunes utilizadas en la actualidad para reducir las emisiones de metano provenientes del rumen (adaptado de Eckard et al., 2010)

Además de las herramientas tradicionales (Czerkawski y Breckenridge, 1977; Menke y Steingass, 1988) actualmente, existe accesibilidad a nuevas facilidades instrumentales *in vitro* (Cone, 1998; Pell y Schofield, 1993; Theodorou et al., 1994; Wawrzkiwicz y Danelón, 2004) que permiten medir la producción de gases asociada a la digestión ruminal en forma sencilla y económica, dando la opción de caracterizar la composición de los gases (*i.e.* CO₂, CH₄ y H₂).

Aunque estas herramientas no reemplacen las observaciones *in vivo* (Soliva y Hess, 2007), son de gran utilidad para estudiar la bioquímica ruminal, la caracterización nutricional de los alimentos y aditivos con potencial efecto mitigador (cuyos resultados deberían ser corroborados posteriormente en ensayos *in vivo*, Colombatto et al., 2003; McGinn et al., 2004).

La adaptación de los frascos de fermentación, empleados para estudiar la digestión ruminal *in vitro*, para medir la cinética de digestión de los alimentos, la digestibilidad verdadera (Goering y Van Soest, 1970), la producción de AGV, el CH₄, y la utilización del N por parte de los microorganismos ruminales en forma simultánea permitiría estimar la distribución de la energía original del alimento entre los distintos destinos dentro del rumen (Blümmel et al., 1997a, 1994), análisis de muy difícil realización en otro medio que no sea *in vitro*.

1.2. Objetivos

El propósito general del trabajo fue contribuir al conocimiento sobre el potencial metanogénico y el valor nutricional de diversos forrajes tropicales de creciente importancia para la ganadería bovina.

Los objetivos específicos fueron los siguientes:

1.- *Estandarizar el sistema de producción de gas in vitro, contribuyendo con una herramienta de menor variabilidad y mayor repetibilidad.*

Este objetivo se abordó en el Capítulo 2; donde se evaluó el efecto de una pre-incubación del inóculo ruminal en la cinética de fermentación *in vitro* de las botellas blanco (*i.e.* correctores de la técnica), con el fin de generar una herramienta confiable.

2.- *Caracterizar el potencial metanogénico, digestibilidad verdadera y producción de AGV a distintos tiempos de digestión para los forrajes seleccionadas (templadas y megatérmicas a estados fenológicos comparables).*

3.- *Interpretar el rol de los compuestos solubles (en agua y en solución de detergente neutro) sobre la fuente de variación del potencial metanogénico y eficiencia de digestión de los forrajes analizados.*

En el capítulo 3 se describen 2 ensayos que pretenden contestar a los objetivos 2 y 3, en los cuales se evaluaron los efectos de los compuestos solubles en agua y en SDN de forrajes templadas y tropicales sobre la eficiencia de digestión por medio de la técnica de PG.

4.- *Analizar la respuesta ante el agregado de taninos condensados como inhibidores de la metanogénesis sobre sustratos de comportamiento conocido en digestibilidad verdadera y producción de AGV y CH₄.*

Este objetivo será respondido en el Capítulo 4, para lo cual se llevaron a cabo dos ensayos donde se evaluó el efecto del agregado de diferentes extractos de TC en la fermentación de forrajes templadas y tropicales sobre el comportamiento fermentativo y los productos derivados.

5.- *Estudiar la distribución de la energía del alimento entre los diferentes destinos (*i.e.* producción de CH₄, AGV, residuo indigestible y proteína microbiana) para distintos tiempos de digestión.*

En los Capítulos 3 y 4, se analizó la asociación entre la desaparición de sustrato y los productos de fermentación para todos los tratamientos descritos en el trabajo.

1.3. Hipótesis

Las especies megatérmicas presentan una amplia diversidad filogenética, anatómica y estructural que se asocia a diferencias en digestibilidad y valor nutricional. Esta diversidad hace preveer la existencia de diferencias análogas en el potencial metanogénico, la eficiencia de digestión ruminal y la composición de los productos de fermentación. En la primera parte del capítulo 3 de esta tesis se desarrolló un trabajo exploratorio sobre especies megatérmicas de interés económico con el propósito de caracterizar estas diferencias.

A lo largo de este trabajo, se especula que los compuestos solubles de las forrajeras megatérmicas, (*e.g.* metabolitos secundarios tales como taninos u otros no identificados hasta el presente), actúan modificando la fermentación, pudiendo, eventualmente, disminuir el potencial metanogénico. Independientemente de los compuestos solubles antes mencionados, las propiedades físico-químicas de los carbohidratos estructurales podrían contribuir a las variaciones en producción de CH₄.

La caracterización de forrajeras a través del potencial metanogénico y la descripción de las causas de las diferencias entre las especies no han sido exploradas hasta el momento, por lo que su identificación constituye un aporte, no solamente desde el punto de vista académico, sino con importantes implicancias prácticas (manejo de las forrajeras, planes de fitomejoramiento, identificación de compuestos bioactivos, etc.).

Además se prevé corroborar la hipótesis de que la energía realmente digerida de los forrajes se distribuye entre los AGV, la BM y el CH₄ en función de características del sustrato, en consecuencia se espera que al aumentar la proporción de ácido acético y ácido butírico debería aumentar la PG y de CH₄. Por otro lado, se espera encontrar una asociación entre la PG observada y la predicha por cálculos estequiométricos.

Capítulo 2.
Estandarización de la producción de *gas in vitro*

2.1. Resumen

Las técnicas de producción de gas *in vitro* representan una valiosa herramienta para describir la cinética de degradación ruminal de los alimentos. Sin embargo presentan, en el licor ruminal utilizado como inóculo microbiano, la mayor fuente de variación y error. Más allá de los procedimientos de estandarización que se realizan previo a la incubación, se sigue encontrando variabilidad entre las botellas blanco (*i.e.* sin sustrato) utilizadas como correctores de la fermentación. En este trabajo se hipotetizó que un tratamiento de pre-incubación controlado del licor ruminal podría contribuir a estabilizar y homogeneizar los residuos sin digerir de los blancos y como consecuencia, la producción de gas acumulada (**PGA**) residual. Los tratamientos se llevaron a cabo realizando una pre-incubación (*i.e.* previa incubación real) con un sustrato simple similar a la dieta ofrecida a los donantes al 1% p/v durante 0, 1, 2 y 4 h (respectivamente tratamientos Control, Prei-1, Prei-2 y Prei-4). Una vez cumplidas las horas de pre-incubación, se incubaron en botellas color caramelo de 100 ml, con cada licor + solución buffer, dos sustratos contrastantes y sin sustrato (*i.e.* blancos), para evaluar la PGA, digestibilidad *in vitro* de la MS y productos de fermentación. Se compararon los perfiles fermentativos entre blancos de los 4 tratamientos, y entre los sustratos a través de un modelo mixto en bloques completos aleatorizados (test de Dunnett), además se evaluó la distribución de la variabilidad y la homogeneidad de varianzas (test de Bartlett). Aunque la actividad fermentativa de los inóculos pre-incubados fue funcional al sistema *in vitro*, contrariamente a lo especulado, los residuos de la pre-incubación aumentaron la variación entre blancos. Consecuentemente se concluyó que las pre-incubaciones no sirvieron para generar un licor ruminal más homogéneo y menos variable para el sistema de producción de gas *in vitro*.

2.2. Introducción

Contribuir a mejorar la eficiencia de utilización de los nutrientes es uno de los propósitos más importantes de la evaluación de alimentos para animales, ya que el conocimiento preciso de la calidad de los ingredientes alimenticios permite formular raciones más equilibradas y rentables para la alimentación del ganado sin afectar la salud de los animales y minimizando la excreción de nutrientes en el ambiente. Las técnicas *in vitro* que evalúan la digestibilidad de los alimentos son utilizadas ampliamente en todo el mundo con propósitos comerciales y de investigación. Las técnicas *in vitro* de punto final como las propuestas por Tilley y Terry (1963) y Goering y Van Soest (1970) constituyen técnicas de laboratorio que resultan repetibles, económicas y fácilmente aplicables para predecir la digestibilidad de la materia seca. Sin embargo, las técnicas descritas en los procedimientos originales, no son apropiadas para describir la cinética de degradación de los alimentos.

Por otro lado, las técnicas de producción de gas *in vitro* como aquellas propuestas por Menke et al. (1979) o Theodorou et al. (1994) ofrecen una alternativa viable para describir la cinética de degradación ruminal de los alimentos, basado en la relación entre la digestibilidad de la MS *in vitro* (**ivDMS**) y la producción de gas acumulada (**PGA**, Mould et al., 2005a). Además son utilizadas para estudiar los aspectos bioquímicos de la fermentación ruminal, ya que pueden cuantificarse los perfiles de ácidos grasos volátiles (**AGV**), la síntesis de biomasa microbiana (**BM**) y la participación de los diferentes gases que componen el residuo gaseoso de fermentación (*i.e.* CO₂, CH₄ y H₂, Blümmel et al., 1997a). Si bien estas técnicas son utilizadas y aceptadas ampliamente por la comunidad científica en la actualidad, su aplicación implica algunos supuestos (Menke 1997, Mould 2005) que no siempre son debidamente tenidos en cuenta, *i.e.*:

- El sistema *in vitro* actúa como un modelo sencillo representativo de las fermentaciones microbianas en el rumen.
- La función del inóculo es generar un ambiente fermentativo representativo del rumen, con capacidad hidrolítica reproducible (a través de distintas incubaciones/períodos) y que idealmente debería incluir todas las poblaciones microbianas y enzimas que contribuyen a la digestión.
- El sistema es sustrato limitante, por lo tanto la capacidad hidrolítica del inóculo no debería serlo.
- La producción de gas es proporcional a la materia orgánica degradada y metabolizada por los microorganismos ruminales.

El sistema de fermentación *in vitro* presenta 3 componentes o “patas” que explican mayoritariamente las fuentes de variación de la PGA (*i.e.* sustrato, medio buffer e inóculo; Figura 2.1). Los sustratos (o en algunos casos aditivos de los sustratos) son los elementos bajo estudio, de los cuales se va a inferir las propiedades digestivas o fermentativas de interés. En forma ideal, el medio buffer y el inóculo deberían presentar nula variabilidad, de tal forma que las diferencias sean asociadas exclusivamente con las características de los sustratos (o aditivos) bajo estudio. Con el fin de garantizar la confiabilidad, repetibilidad y reproducibilidad de los resultados obtenidos, los otros

componentes del sistema de evaluación deberían generar un ambiente estable libre de variaciones inesperadas (químicas, físicas o biológicas).

Revisando la bibliografía, el medio buffer no ha sido muy cuestionado por la comunidad científica, inclusive Mould et al. (2005c) en una detallada revisión sobre la funcionalidad y relevancia de este componente en las PGA, concluyeron que no representaba una importante fuente de variación.

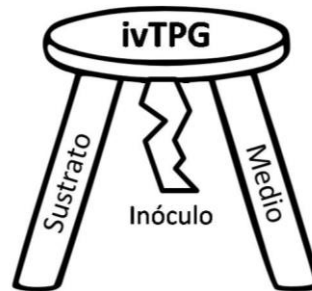


Figura 2.1 Representación esquemática de las 3 patas de la técnica de producción de gas *in vitro* (ivTPG). El sustrato es el elemento a evaluar, el medio actúa como una pata robusta, mientras que el inóculo supone el más variable y problemático de los componentes.

Por el contrario, el inóculo (la tercera pata) ha sido ampliamente criticado y considerado como la mayor fuente de variación y error de las técnicas de producción de gas (PG, Boguhn et al., 2013; Mould et al., 2005b; Rymer et al., 2005). Este punto está muy bien descrito por la editorial de la edición especial del journal “*Animal Feed Science and Technology*” (Krishnamoorthy et al., 2005), en el cual se afirma que aunque la técnica es ampliamente aceptada, todavía se encuentran lejos de convertirse en una técnica indiscutida. Entre los trabajos presentados en esta edición especial, más de la mitad corresponden a estudios metodológicos, sugiriendo que aún después de 20 años de evaluaciones, todavía se requieren ajustes técnicos.

El licor ruminal ideal debería proveer un inóculo microbiano diverso y saludable (*i.e.* capaz de contener diferentes grupos de microorganismos), que genere activamente una representación fidedigna del proceso de degradación y digestión ruminal. Tradicionalmente, y como fuera explicado antes, para estudios de evaluación de alimentos, el licor ruminal utilizado debería propender a la estandarización considerando la especie de ruminantes (*e.g.* bovinos, ovinos, búfalos, etc.), el régimen alimentario de dichos animales y el tiempo de ayuno previo a la colecta. Adicionalmente se esperaría que no contribuya a aumentar la variabilidad entre las botellas “blancos” (*i.e.* botellas de fermentación con licor de rumen y medio buffer, sin el agregado de sustrato).

Es bien conocido que las características intrínsecas del fluido ruminal varían ampliamente entre especies de ruminantes (Mould et al., 2005b). Sin embargo, las diferencias en las poblaciones microbianas de diferentes ruminantes, no se reflejan en los resultados de punto final (Bueno et al., 2005), pero sí pueden generar diferencias en la

cinética de PGA (Bueno et al., 2005; Boguhn et al., 2013). Las condiciones de manejo de los animales experimentales donantes de licor ruminal (Rymer et al., 2005) y la dieta que reciben (Boguhn et al., 2013; Nagadi et al., 2000) son aspectos que necesitan ser controlados para estandarizar las características mínimas del sistema. Está claro entonces que para tener un licor ruminal apto como inóculo, debemos utilizar la misma especie de animales donantes, y además se debe coleccionar licor ruminal de varios animales y mezclarlo, con el fin de reducir la variación individual (Mould et al., 2005b; Williams, 2000).

Consecuentemente, y con el objetivo de obtener resultados comparables, los protocolos generales requieren la evaluación de blancos en forma simultánea con la de los sustratos. Las botellas blanco son utilizadas de rutina en varias técnicas de PG (Pell y Schofield, 1993; Theodorou et al., 1994) para corregir la PGA, concentración de CH₄, fermentación residual de la MO (y productos de dicha fermentación) derivados del inóculo (Van Soest, 1994), ya que es el inóculo el encargado de proveer una población microbiana variada y activa. La media ajustada de la PGA de dichos blancos es utilizada para corregir la PGA de los sustratos, con el fin de discriminar el gas real producido por la fermentación del sustrato y el gas proveniente del inóculo y del medio buffer (*e.g.* el producido por carbohidratos no digeridos provenientes de licor o dióxido de carbono proveniente del intercambio entre el buffer bicarbonato y el espacio gaseoso de la botella; Menke y Steingass, 1988). Consecuentemente se puede distinguir la PGA bruta (**PGAB**) de la PGA neta (**PGAN**; Jaurena et al., 2012).

El procedimiento de corrección más comúnmente utilizado implica restar para cada horario de medición el promedio de PG de los blancos a la PG de las botellas conteniendo los sustratos ($PG_{\text{Sustr}} - PG_{\text{Blanco}} = PG_{\text{Corregida}}$). Alternativamente se podría optar por modelar las PGA de los blancos (*i.e. idem* al modelo no lineal utilizado para analizar la cinética de PGA de los sustratos) y restar los valores de PGA predichos por dicho modelo a la PGAB de los sustratos (Jaurena et al., 2011), para generar la PGAN que es la que se reporta en última instancia. Por el contrario, algunos autores como Williams (2000) no recomiendan restar los valores obtenidos de los blancos, pero igualmente sugieren que dichos valores sean reportados en cuadros por separado.

Idealmente, la corrección con blancos absorbería las variaciones derivadas de las diferencias entre laboratorios o períodos (en forma análoga a su empleo en muchas técnicas analíticas de laboratorio), permitiendo calcular la PGAN derivada del sustrato bajo análisis y habilitando la estimación de los parámetros de la cinética de digestión (*i.e.* A, B y c) “independientemente” de las características del inóculo empleado. Sin embargo, tratándose de material biológico, su desarrollo está condicionado por la disponibilidad de sustrato.

A diferencia de lo que ocurre en los blancos, donde los microorganismos metabolizan los residuos de digestión del licor ruminal (con la consecuente PG), en las incubaciones con sustrato, los microorganismos reciben sustrato nuevo, por lo cual es esperable una nueva fase de crecimiento microbiano (Mould et al., 2005b). En ambos escenarios, dado que el cultivo se desarrolla en un sistema cerrado, una vez agotadas las fuentes de nutrientes se produce la muerte de parte de estos microorganismos por lo que

se liberan nuevos nutrientes al medio que pueden ser aprovechados por bacterias supervivientes y así contribuir al reciclado interno. Este reciclado contribuye con pequeños picos de PG a tiempos intermedios y avanzados de la incubación (Hervás et al., 2005; Rymer et al., 1999).

Aún cuando se ha estudiado en el pasado el rol de los blancos como correctores de la PGA (Araujo et al., 2011; Carro et al., 2005), existe poca información acerca de las estrategias para el control de la variabilidad.

En el presente trabajo se asume que la variabilidad de los blancos está asociada principalmente con la fermentación de residuos de digestión al momento de la incubación y con la consecuente variación en el nivel de actividad fermentativa de las poblaciones microbianas presentes en el inóculo (las cuales varían entre animales más allá de las estandarizaciones de manejo y alimentación usualmente aplicadas). Por lo tanto, se hipotetiza que la pre-incubación del licor ruminal con un sustrato conocido homogeneizaría la fase de desarrollo de la población microbiana, contribuyendo a reducir la variación en las propiedades del inóculo empleado para los estudios *in vitro*, y concomitantemente estabilizando la PGA residual.

El objetivo perseguido en este capítulo fue obtener un inóculo ruminal apto para desarrollar incubaciones *in vitro* con menor variabilidad en la PGAB.

2.3. Materiales y Métodos

2.3.1. Consideraciones generales

Los tratamientos de los inóculos fueron realizados preincubando el licor ruminal con un único sustrato (heno de alfalfa: grano de maíz:: 70: 30, similar a la dieta ofrecida a los animales donadores) al 1% (p/v) durante 1, 2 y 4 h (respectivamente tratamientos Prei-1, Prei-2 y Prei-4, Figura 2.2). Estos inóculos experimentales fueron comparados con el licor ruminal original (*i.e.* sin preincubación, Control) a través de la PGAB, ivDMS y parámetros de fermentación. Los cuatro inóculos experimentales, fueron incubados por 24 h con dos sustratos contrastantes y sin sustrato (*i.e.* blancos de los inóculos). El ensayo fue repetido en tres diferentes semanas/períodos (respectivamente, PI, PII y PIII), que fueron incluidos en el modelo estadístico como bloques experimentales.

2.3.2. Preparación de los inóculos

En cada período, el fluido ruminal fue colectado de dos ovinos machos castrados adultos preparados con fístula permanente de rumen (entre seis disponibles, la pareja que se eligió fue diferente para cada período) y alimentados a mantenimiento con una dieta estándar (heno de alfalfa: grano de maíz:: 70: 30) con un suplemento mineral. El licor ruminal (relación aprox. 50: 50 en las fases líquida y sólida de contenido ruminal) fue colectado durante la mañana, asegurando 12 h de ayuno, con disponibilidad de agua *ad libitum*. Este licor se mantuvo en termos precalentados durante el traslado (menos de 5 minutos) desde el galpón de metabolismo donde están alojados los animales hasta el laboratorio donde se llevó a cabo el experimento, garantizando siempre la anaerobiosis y la temperatura, durante dicha manipulación. Una vez en el laboratorio el fluido ruminal fue homogeneizado después de “masajearlo” manualmente por 5-7 minutos en una bolsa plástica hermética con el fin de facilitar la separación (y colecta en el fluido) de los microorganismos adheridos a las fracciones fibrosas. Esta manipulación se realizó manteniendo la temperatura y anaerobiosis requerida para mantener viable el inóculo (*c.a.* 39°C y con flujo constante de CO₂). Una vez concluido el procedimiento, el fluido fue filtrado con doble gasa y mezclado con el medio buffer (*i.e.* licor ruminal: medio de incubación, relación 1:10).

Las pre-incubaciones fueron realizadas a 39°C, en baldes plásticos oscuros de 2 lt que poseían una tapa agujereada, para permitir el gaseo constante de CO₂. Los inóculos fueron pre-incubados durante 0, 1, 2 y 4 h generando los tratamientos Control, Prei-1, Prei-2 y Prei-4, respectivamente, de forma tal que cada inóculo representando uno de los cuatro tratamientos tuvo un horario de comienzo diferente para la verdadera incubación (Figura 2.2).

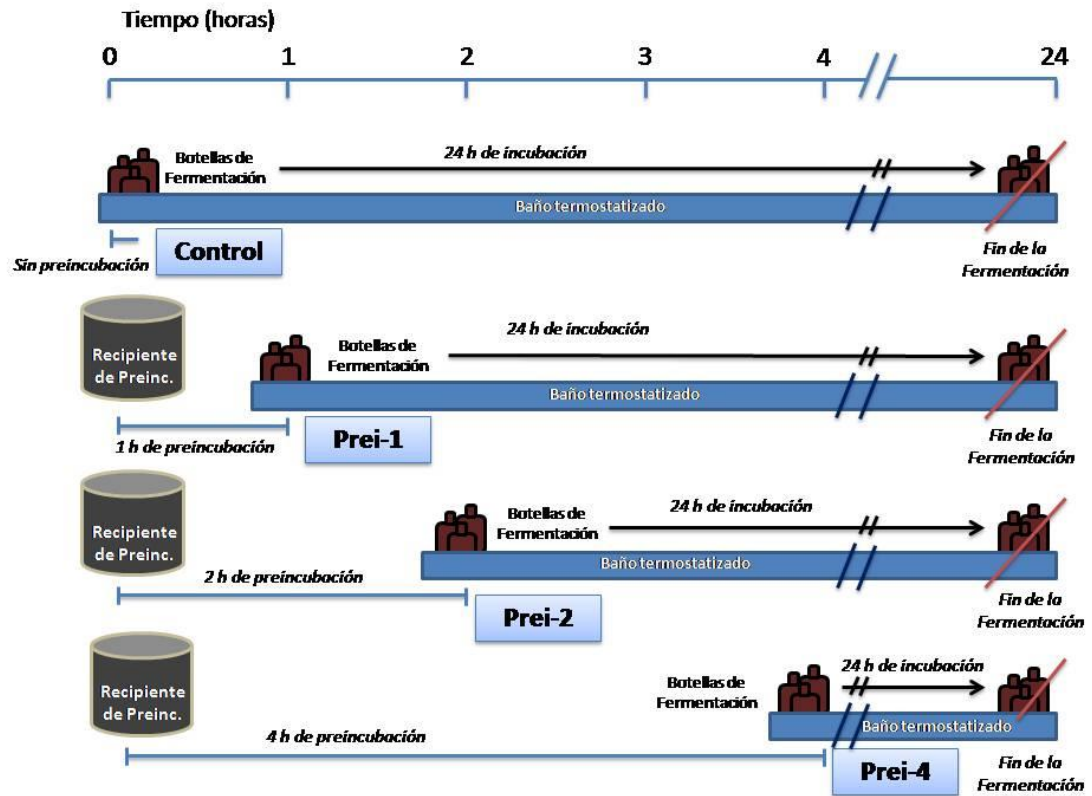


Figura 2.2 Arreglo metodológico utilizado para crear los tratamientos de pre-incubación (*i.e.* Control, Prei-1, Prei-2 y Prei-4; 0, 1, 2 y 4 horas de pre-incubación).

Cada tratamiento fue incubado por triplicado con dos sustratos contrastantes (heno de alfalfa [MS: 90%] y un suplemento comercial para vaca lechera, [MS: 89%] Cuadro 2.1), molidos hasta llegar a un tamaño de partícula de 1 mm, corriendo en simultáneo, además, cinco blancos (*i.e.* sin sustrato) por cada tratamiento. Inmediatamente antes de incubar las botellas, se tomaron muestras de los inóculos tratados (*i.e.* 0, 1, 2 y 4 h de pre-incubación) para evaluar pH y concentración de N amoniacal (N-NH_3).

Cuadro 2.1 Composición química de un suplemento comercial para vacas lecheras y de heno de alfalfa utilizados como sustratos (g/kg MS, excepto la materia seca, g/kg MH).

Fracción química ¹	Suplemento	Heno
Materia seca	889	900
Materia orgánica	925	872
aFDN _{MO}	340	596
FDA _{MO}	124	388
LDA _{MO}	32	113
Proteína bruta	185	193
Hemicelulosa	217	208
Celulosa	92	276

¹aFDN_{MO}, Fibra insoluble en detergente neutro (libre de cenizas) con alfa-amilasa; FDA_{MO}, Fibra insoluble en detergente ácido (libre de cenizas); LDA_{MO}, Lignina (libre de cenizas, lavados con ácido sulfúrico).

2.3.3. Incubación *in vitro*

Una vez completado los tiempos de pre-incubación correspondientes (*i.e.* 0, 1, 2 y 4 h), fueron adicionados 38 ml del medio buffer (correspondientes a soluciones macro y micro-minerales, peptona, agente reductor y solución buffer de Carbonato-Bicarbonato, para más detalle ver Theodorou et al., 1994) y 4 ml de inóculo ruminal (Control, volumen final: 42 ml) y para los inóculos ruminales pre-incubados (Prei-1, Prei-2 o Prei-4) se adicionaron 40 ml de licor ruminal pre-incubado a cada botella (*i.e.* 4 ml de inóculo ruminal +36 ml de medio buffer pre-incubado) junto con 2 ml de medio buffer nuevo para llevar a 42 ml a cada botella. Las botellas fueron mantenidas en un baño termostatzado a 39°C durante 24 h, garantizando que el nivel del agua siempre esté por encima del contenido de las botella. La producción de gas *in vitro* fue realizada de acuerdo a los procedimientos delineados por Theodorou et al. (1994) y modificados por Wawrzkieicz y Danelón (2004).

Los cambios de presión dentro de las botellas de incubación fueron medidos mediante un transductor de presión (modelo T443A, Bailey y Mackey Ltd., Birmingham, Inglaterra) conectado a una válvula de tres vías que contenía una aguja (tamaño 16×5-25G×5/8) para punzar la septa y a una jeringa graduada para medir el volumen de gas producido. El volumen fue corregido por la cantidad de MS incubada (*c.a.* 210 mg de MS en cada botella).

La PGAB fue medida tomando la presión (psi) y el volumen (ml) a las 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16 y 24 h (*i.e.* 8 tiempos) de incubación en todas las botellas. El volumen fue corregido según la presión de acuerdo a un modelo de regresión lineal (luego de chequear los datos de comportamiento anómalo *-outliers-* de la base de datos), para

generar una nueva observación de volumen más precisa para cada botella en cada tiempo. A esta PGAB producida por la fermentación del sustrato de las botellas fue corregida por la PGAB de los blancos para generar la PGA neta (**PGAN**), *i.e.*:

$$PGAN_{\text{Sustrato}}(\text{ml}) = PGAB_{\text{Sustrato}}(\text{ml}) - PGAB_{\text{Blanco}}(\text{ml})$$

Una vez cumplidas las 24 h de incubación, la fermentación fue interrumpida agregando 2-3 gotas de una solución saturada de timol en cada botella. Inmediatamente después los residuos de sustrato sin digerir fueron individualmente filtrados en bolsas filtrantes ANKOM[®] (#F57, ANKOM technology, NY, EE.UU.), para determinar con posterioridad el residuo de FDN.

La ivDMS fue calculada a partir de los residuos de las bolsas filtrantes después de ser tratados con solución de detergente neutro de acuerdo con Van Soest et al. (1966), y calculada de la siguiente forma:

$$ivDMS = (100 - \text{residuo de FDN}) \times \frac{100}{MS \text{ incubada}}$$

Por otro lado, al final de la incubación se midió el pH (peachímetro Hanna[®], modelo HI 9025), y se tomaron alícuotas del líquido residual post-filtrado, para evaluar ácidos grasos volátiles (**AGV**, estabilizados con ácido ortofosfórico al 25%; relación 1:5, ácido: muestra) a través de cromatografía gaseosa (columna capilar Nukol [30 mt × 0.32 mm de diámetro × 0.25 μm de finura]; Perkin Elmer - Elite FFAP; Part. N9316354. Se utilizó hidrógeno como carrier con un flujo de 2,4 ml/min. Para la curva de calibración se utilizó una mezcla estándar de AGV marca Supelco [Cat. N° 46975-U]). Otra alícuota fue preparada y estabilizada con ácido sulfúrico 0,02 N (relación 1:1, muestra: ácido) para medir la concentración de N-NH₃ utilizando un kit de uremia (Laboratorios Wiener[®]).

2.3.4. Análisis químicos

Todos los procedimientos fueron ajustados según los protocolos estandarizados del Programa para el Mejoramiento de la Evaluación de Forrajes y Alimentos (PROMEFA, Jaurena y Wawrzkiwicz, 2008). Para resumir, las muestras de Heno y Suplemento fueron secadas (65°C, 48 h) y molidas (1 mm; molino tipo Willey) antes de la caracterización. Todos los resultados fueron reportados en base MS (105°C durante 4 h, AOAC N°976.63). El contenido de cenizas fue determinado después de ignición completa a 500°C por 4 h (AOAC, 1995; N°942.05). El contenido de proteína bruta (PB= N total × 6,25) fue determinado por Kjeldahl (AOAC, 1995; N°984.13) con un aparato marca Pro-Nitro[®] (Selecta J.P., Barcelona, España) y el extracto etéreo fue determinado en un aparato Soxhlet con éter de petróleo (AOAC, 1990; N°930.39). La fibra insoluble en detergente neutro con el agregado de α-amilasa (**aFDN_{MO}**), la fibra insoluble en detergente ácido (**FDA_{MO}**) y los contenidos de lignina (**LDA_{MO}**, obtenidos mediante lavados con ácido sulfúrico) fueron reportadas libres de cenizas de acuerdo con Goering y Van Soest (1970) y Van Soest et al. (1991) y determinadas con equipamiento ANKOM[®] (Modelo 220).

2.3.5. Análisis estadístico

Los resultados correspondientes a los blancos (PGAB de Control, Prei-1, Prei-2 y Prei-4) sin incubación de sustrato alguno fueron analizados por ANVA de acuerdo a un diseño en bloques completos aleatorizados (bloque \equiv período). En forma análoga, fueron analizados los resultados de PGAN para los dos sustratos contrastantes (heno de alfalfa y un suplemento comercial).

Los resultados de PGAN (*i.e.* obtenido después de corregir con los blancos correspondientes), como la PGAB (*i.e.* sin corrección alguna) fueron ajustados al modelo no lineal propuesto por Ørskov y McDonald (1979) (*i.e.* $PGA = A + B \times (1 - e^{-c \times t})$), utilizando el Procedimiento NLIN de SAS (2002). Los parámetros de este modelo (Par A, Par B y Par c) para la PGAB y PGAN fueron analizados de acuerdo al modelo general del experimento. Los AGV también fueron analizados con y sin corrección por blancos, y junto con las medias de N-NH₃, pH y parámetros de ajuste de la PGA (de los blancos y de los sustratos corregidos y sin corrección) obtenidos de los diferentes tratamientos de pre-incubación (*i.e.* Prei-1, Prei-2 y Prei-4) fueron comparados contra el Control (licor ruminal con 0 horas de pre-incubación) mediante el test de Dunnett, utilizando el Proc Mixed del paquete estadístico SAS (2002), donde el período y la interacción entre tratamiento \times período fueron tomados como factores aleatorios, considerando la aproximación de Kenward-Roger para estimar los grados de libertad. Las diferencias entre medias fueron declaradas significativas cuando $p < 0,05$. Las diferencias entre las varianzas de los tratamientos en los blancos, fueron testeadas mediante el test de Bartlett (Snedecor y Cochran, 1989).

Además se realizaron análisis de regresión utilizando el Proc REG (SAS 2002) y correlaciones entre los datos corregidos y sin corregir por blancos mediante el Proc CORR de SAS (2002).

2.4. Resultados

2.4.1. Composición inicial de los inóculos

Las características de los inóculos fueron similares entre el Control y los licores ruminales pre-incubados, tanto para la acidificación del medio (pH= 7,0, EEM= 0,13; $p > 0,05$) como para la concentración de N amoniacal ($N-NH_3 = 38 \text{ mg/l}$; EEM= 3,1; $p > 0,05$).

2.4.2. Análisis de los blancos

Al evaluar la cinética de fermentación, se encontró que el Par A (representando a los compuestos rápidamente degradables) no difirió de cero para ningún tratamiento (EEM= 0,127; Cuadro 2.2) y que las réplicas contribuyeron con el 33% del total de la varianza.

La PGA durante la primer hora de incubación (PGA_{t1}) no mostró diferencias entre tratamientos ($p > 0,05$), siendo la variación total mayormente explicada por el período. En relación a esto, pudimos observar que la PGA_{t1} difirió de 0 (Control y Prei-1, $p < 0,09$; Prei-2 y Prei-4, $p < 0,05$). Por otro lado, los parámetros c (tasa del Par B) de los tratamientos pre-incubados no fueron diferentes del Control ($p > 0,05$) y la variabilidad entre réplicas dentro de un mismo período fue la responsable del 27% del total de variación.

Las PGA después de la primer hora (PGA_{t1-t24}) y durante toda la incubación (PGA_{t24}) fueron significativamente ($p < 0,05$) afectadas por una y dos horas de pre-incubación. Por otro lado, el Par B (gas producido por la porción de sustrato potencialmente degradable) aumentó solo cuando se pre-incubó el licor durante una hora, (c.a. el doble con respecto al Control). Asimismo se encontró una correspondencia lineal entre el Par B y la PGA_{t24} ($PGA_{t24} \text{ (ml)} = 0,98 \text{ (EEM= 0,018)} \times B + 0,27 \text{ (EEM= 0,243)}, r^2 = 0,98$). No se encontraron diferencias entre las varianzas de los tratamientos para ninguna de estas variables.

Los tratamientos de pre-incubación incrementaron la concentración de AGV en un c.a. 94% ($p < 0,05$; Cuadro 2.3), explicado principalmente por la concentraciones de los ácidos acético y propiónico (84% de los AGV totales en todos los tratamientos, $p > 0,05$). En general (excepto para el ácido butírico) las réplicas contribuyeron mínimamente a la variación total (i.e. 1 a 21% de la variabilidad). Para todos los AGV (excepto para el acético) las varianzas de los tratamientos fueron heterogéneas. No se hallaron diferencias en pH (media general= 7,3; EEM= 0,07; $p > 0,05$), concentración de $N-NH_3$ (media general= 51,3 mg/l; EEM= 8,02; $p > 0,05$), así como tampoco para la relación acético/propiónico o en las concentraciones de ácidos butírico y valérico ($p > 0,05$).

2.4.3. Análisis de los sustratos

El análisis de los parámetros derivados de la modelación de la PGAN y PGAB mostró diferencias asociadas a los tratamientos, para el caso del Par B (Prei-1 fue 99% y 36% mayor que el Control, para PGAN y PGAB, respectivamente; $p < 0,05$; Cuadro

2.4), aunque no hubo diferencias en los Par A y Par c ($p > 0,05$). Por otro lado, al analizar la variabilidad de los tratamientos, se encontró que las réplicas eran responsables de un mayor porcentaje de variabilidad en los parámetros de fermentación cuando los valores modelados eran corregidos por los blancos, sin embargo cuando no eran corregidos, la distribución (entre períodos y réplicas) fue más pareja. Por otro lado si bien hubo diferencias esperables en la ivDMS entre sustratos ($p < 0,05$, Cuadro 2.4), los tratamientos de pre-incubación no generaron un cambio en el aprovechamiento de los sustratos ($p > 0,05$), tampoco hubo cambios significativos en las concentraciones de N-NH₃ después de 24 h de fermentación ($p > 0,05$). Al evaluar los perfiles de AGV sin corrección por blancos, se observó que los tratamientos de pre-incubación incrementaron las concentraciones de ácido propiónico ($p < 0,05$; Cuadro 2.5) y la proporción de acético y propiónico en la concentración total de AGV (Control= 73%, Prei= 78%; $p < 0,05$). Asimismo, solo Prei-2 y Prei-4 aumentaron las concentraciones de acético y de AGV totales ($p < 0,05$). No hubo cambios en el ácido butírico, ni en los isómeros de butírico y valérico (media general isobutírico= 3,7, isovalérico= 3,0 mMol/l; $p > 0,05$). En cambio, cuando se corrigieron los AGV por su blanco correspondiente, no se encontraron diferencias entre tratamientos ($p > 0,05$) para ninguna de las variables evaluadas.

El estudio de la producción de AGV por parte de los sustratos estudiados mostró una marcada diferencia entre el Suplemento y el Heno, reflejada en las mayores concentraciones de AGV totales, acético, propiónico, butírico y valérico en el Suplemento. Por su parte, el Heno mostró una mayor relación acético/propiónico (heno= 2,8; supl= 2,1; $p < 0,05$), sin embargo, la proporción de estos ácidos en la concentración total de AGV fue la misma para ambos sustratos (media general= 78%, $p > 0,05$).

Cuadro 2.2 Producción de gas acumulada de las botellas blancas (*i.e.* licor + medio, sin sustrato) después de 24 h de fermentación, inoculadas con licores ruminales pre-incubados por 0, 1, 2 y 4 h (Control, Prei-1, Prei-2 y Prei-4, respectivamente)

Variable ¹	Tratamientos				EEM ²	Sign ³	Distribución de la variabilidad ⁴ (%)		Heterogeneidad de varianza ⁵
	Control n=3	Prei-1 n=3	Prei-2 n=3	Prei-4 n=3			Per	Res	
<i>Producción de gas acumulada bruta; PGAB = A+B*(1-e^(-c*tiempo))</i>									
A (ml)	0,19	0,05	0,02	0,33	0,127	ns	67	33	*
B (ml)	7,3a	16,2b	14,2a	11,9a	2,37	*	53	47	ns
c (h ⁻¹)	0,44	0,21	0,24	0,28	0,054	ns	73	27	*
<i>Producción de gas acumulada bruta (ml)</i>									
t1	2,9	2,7	3,4	3,7	0,88	ns	79	21	*
t1-t24	4,7a	12,7b	10,7b	8,6a	1,53	*	56	44	ns
t24	7,9a	15,9b	14,0b	12,3a	2,22	*	68	32	ns

¹Parámetros: A: Fracción soluble; B: Potencialmente degradable; y c: Tasa de B; t1, PGAB a la hora 1; t1-t24, PGAB desde la hora 1 a la hora 24; t24, PGAB en 24 h. ²Error estándar de la media. ³Sign, Significancia; ns, no significativo (p>0,05); *, p<0,05. ⁴Per, período (*i.e.* variación entre inóculos); Res, Residual del error (*i.e.* variación entre réplicas/botellas). Comparaciones según Dunnett (Control vs Prei-1, Prei-2 y Prei-4), letras diferentes en la misma línea indican p< 0,05. ⁵Evaluada por el test de Bartlett, ns, p> 0,05; *, p< 0,05.

Cuadro 2.3 Perfil de ácidos grasos volátiles de las botellas blancos (*i.e.* licor + medio, sin sustrato) después de 24 h de fermentación, inoculadas con licores ruminales pre-incubados por 0, 1, 2 y 4 h (Control, Prei-1, Prei-2 y Prei-4, respectivamente).

Variable ¹	Tratamientos				EEM ²	Sign ³	Distribuc de la variabilidad ⁴ (%)		Heterogeneidad de varianza ⁵
	Control n=3	Prei-1 n=3	Prei-2 n=3	Prei-4 n=3			Per	Res	
Ácidos grasos volátiles(AGV, mMol/litro)									
Totales	27,0a	43,6b	52,8b	52,2b	3,10	*	90	10	*
<i>Acético</i>	14,9a	30,0a	27,8a	30,3b	2,52	*	79	21	ns
<i>Propiónico</i>	5,3a	12,9b	13,3b	13,6b	1,67	*	98	2	*
<i>Butírico</i>	3,1	3,5	3,7	4,8	1,19	ns	57	43	*
<i>Valérico</i>	3,6	3,6	3,6	3,6	3,01	ns	99	1	*
Acético/Propiónico	3,2	2,4	2,5	2,3	0,54	ns	97	3	*
Ac+Pr/AGV tot (%)	78	87	85	84	8,9	ns	97	3	*

¹Acético/Propiónico, Tasa entre los ácidos acético y propiónico; Ac+Pr/AGV tot, Proporción de la sumatoria de los ácidos acético + propiónico en la concentración de AGV total. ²Error estandar de la media. ³Sign, Significancia; ns, no significativo ($p > 0,05$); *, $p < 0,05$. ⁴Per, período (*i.e.* variación entre inóculos); Res, Residual del error (*i.e.* variación entre réplicas/botellas). ⁵Evaluada por el test de Bartless, ns, $p > 0,05$; *, $p < 0,05$. Comparaciones según Dunnett (Control vs Prei-1, Prei-2 y Prei-4), letras diferentes en la misma línea indican $p < 0,05$.

*

Cuadro 2.4 Parámetros de la cinética de producción de gas acumulada ($PGA = A + B \cdot (1 - e^{-c \cdot \text{tiempo}})$) con y sin corrección con blancos (*i.e.* Neta (PGAN) y Bruta (PGAB) respectivamente), digestibilidad *in vitro* de la materia seca (ivDMS, g/kg MS), pH y N amoniacal (N-NH₃) de licores pre-incubados por 0, 1, 2 y 4 h (Control, Prei-1, Prei-2 y Prei-4, respectivamente) e incubados por 24 h con 2 sustratos.

Variables ¹	Tratamientos				EEM ²	Sign ³	Sustratos ⁴		EEM	Sign	Distrib. de la variabilidad ⁵ (%)	
	Control	Prei-1	Prei-2	Prei-4			Supl	Heno			Per	Res
	n=6	n=6	n=6	n=6			n=12	n=12				
<i>PGAN (con corrección por blancos, ml)</i>												
Par A	-4,7	-6,9	-4,7	-2,4	1,00	ns	-6,9	-2,4	0,66	***	38	62
Par B	205a	408b	286a	313a	27,5	*	347	259	17,8	**	5	95
Par c	0,03	0,02	0,03	0,02	0,006	ns	0,03	0,01	0,004	**	41	59
<i>PGAB (sin corrección por blancos, ml)</i>												
Par A	0,79	-1,9	0,8	2,7	2,38	ns	-1,4	2,6	1,95	***	76	24
Par B	176a	238b	215a	181a	18,7	*	271	134	14,9	***	59	41
Par c	0,05	0,07	0,08	0,09	0,010	ns	0,06	0,09	0,009	***	58	42
<i>Caracterización del licor ruminal</i>												
ivDMS	662	632	643	652	6,7	ns	758	536	4,9	***	36	64
pH	7,2a	7,1b	7,1b	7,1b	0,04	***	7,0	7,2	0,03	***	66	34
N-NH ₃ (mg/lit)	50,9	53,9	43,8	45,8	5,69	ns	46,7	50,5	3,56	ns	13	87

¹Parámetros: A: Fracción soluble; B: Potencialmente degradable; y c: Tasa de B; ²Error estándar de la media. ³Significancia; ns, no significativo ($p > 0,05$); *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$. ⁴Supl, Suplemento para vaca lechera; Heno, Heno de alfalfa; ⁵Distribución de la variabilidad; Per, período (*i.e.* var. entre inóculos); Res, Residual del error (*i.e.* var. entre réplicas/botellas). Comparaciones según Dunnett (Control vs Prei-1, Prei-2 y Prei-4), letras diferentes en la misma línea indican $p < 0,05$.

Cuadro 2.5 Perfil de ácidos grasos volátiles con y sin corrección de blancos de 2 sustratos; *i.e.* suplemento para vacas lecheras (Supl) y heno de alfalfa (Heno) después de 24 h de fermentación, inoculados con licores ruminales pre-incubados por 0, 1, 2 y 4 h (Control, Prei-1, Prei-2 y Prei-4, respectivamente).

Variable	Tratamientos				EEM ¹	Sign ²	Sustratos				Distrib. de la variabilidad ³ (%)	
	Control	Prei-1	Prei-2	Prei-4			Supl	Heno	EEM	Sign	Per	Res
	n=6	n=6	n=6	n=6			n=12	n=12				
Ácido grasos volátiles corregidos por blanco (AGV, mMol/litro)												
Totales	29,8	24,9	31,9	31,2	3,92	ns	39,7	19,2	2,41	***	41	59
Acético	17,7	14,4	17,9	18,9	3,84	ns	21,1	13,4	3,08	***	58	42
Propiónico	7,9	6,8	8,5	8,3	0,89	ns	11,6	4,1	0,62	***	30	70
Butírico	3,9	2,5	3,2	2,8	0,48	ns	4,9	1,2	0,33	***	59	41
Ácido grasos volátiles sin corrección por blanco (AGV, mMol/litro)												
Totales	62,6a	79,5a	93,4b	90,1b	3,63	**	91,6	71,4	2,41	***	10	90
Acético	32,7a	42,8a	47,6b	49,2b	2,44	**	47,1	39,1	1,41	***	28	72
Propiónico	13,2a	18,9b	21,1b	21,9b	1,20	***	22,6	14,9	0,85	***	47	53
Butírico	7,3	7,8	7,9	7,5	0,62	ns	9,5	5,7	0,53	***	69	31

¹Error estandar de la media. ²Sign, Significancia; ns, no significativo ($p > 0,05$); *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$. ³Distribución de la variabilidad; Per, período (*i.e.* variación entre inóculos); Res, Residual del error (*i.e.* variación entre réplicas/botellas). Comparaciones según Dunnett (Control vs Prei-1, Prei-2 y Prei-4), letras diferentes en la misma línea indican $p < 0,05$.

2.4.4. Correlaciones entre los parámetros A, B y c de los modelos de PGA con o sin corrección por blancos.

Las correlaciones entre los parámetros obtenidos a partir de la modelación de cinética de PGA corregida (*i.e.* 72 datos) y sin corregir por blancos de la base de datos completa (*i.e.* 72 datos, 4 tratamientos \times 3 réplicas \times 3 períodos \times 2 sustratos) mostró que para el Par C la correlación no fue significativa (Cuadro 2.6, $p > 0,05$). Por el contrario, la correspondencia entre los Par A y B derivados de los modelos PGAB y PGAN resultó significativa ($p < 0,05$).

En el análisis de correlación de estos parámetros para cada tratamiento por separado mostró una relación significativa entre los Par A de todos los tratamientos de los modelos corregidos y sin corregir (R^2 , 0,42-0,86; $p < 0,05$). Para el caso del Par B no hubo buena correlación, salvo los datos obtenidos del inóculo Control ($p < 0,05$). Un análisis similar del par C diferenciando por tratamiento tampoco mostró correspondencia entre los parámetros derivados de PGAB y PGAN.

Cuadro 2.6 Correlaciones entre valores después corregidos (PGAN) y sin corregir por blancos (PGAB) de los parámetros de producción de gas acumulada ($PGA = A + B * (1 - e^{-c * tiempo})$), obtenidos después de 24 h de fermentación, incubados con licores ruminales pre-incubados por 0, 1, 2 y 4 h (Control, Prei-1, Prei-2 y Prei-4, respectivamente).

Variable ¹	Par A	Par B	Par c
Correlaciones de la base de datos completa			
r	0.83	0.52	-0.06
Significancia	***	***	ns
Correlaciones por tratamiento			
Control			
r	0.71	0.64	0.22
Significancia	**	*	ns
Prei-1			
r	0.68	-0.30	-0.36
Significancia	*	ns	ns
Prei-2			
r	0.64	0.46	-0.18
Significancia	*	ns	ns
Prei-4			
r	0.93	0.47	-0.15
Significancia	***	ns	ns

¹r, coeficiente de correlación; ns, $p > 0,05$; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

2.5. Discusión

Un licor ruminal estable y homogéneo es considerado un pre-requisito fundamental para obtener resultados de producción de gas robustos, sin embargo muchos autores coinciden en señalar que el inóculo es el componente peor descrito y más variable de los sistemas *in vitro* (Cone et al., 2002; Craig et al., 1987; Dijkstra et al., 2005; Mould et al., 2005b; Williams, 2000). Una estandarización de este factor contribuiría a asegurar la independencia de los parámetros de fermentación de los alimentos de esos mismos inóculos (asociados al lugar, especie de los animales donantes, las condiciones de estos mismos donantes, etc).

2.5.1. Objetivos y criterios de verificación

El objetivo del experimento descrito en este capítulo fue obtener un inóculo ruminal con una menor variabilidad en la PGA y una coherente funcionalidad para los estudios de digestión *in vitro*. Estas características deberían verificarse a través de la observación de mayor repetibilidad entre blancos (menor variación entre réplicas y entre repeticiones), y consecuentemente entre los parámetros ajustados para los sustratos a partir de las PGAN (parámetros A, B y c de un modelo no lineal). La funcionalidad del medio se verificaría a partir de la falta de efecto de los tratamientos con respecto al Control, fundamentalmente en la ivDMS y en la PG y, en forma ideal, también en la producción y composición de AGV.

Idealmente el impacto de los blancos sobre la estimación de los parámetros de modelación de PGA (*i.e.* A, B, c) debería ser nulo, ya que se espera que el blanco ideal sea cercano a cero y poco variable, por lo cual la PGAB tendería a la PGAN. Como consecuencia de esto la correlación entre los parámetros de modelación de PGAB y PGAN sería mayor cuanto menor sea el impacto de los blancos en la corrección de la PGAN.

2.5.2. Producción de gas acumulada por los blancos

En función de los objetivos recién señalados, es deseable que la PGA de los blancos (*i.e.* sin sustrato) constituya una baja proporción del total de gas producido por las incubaciones con sustrato, que tengan baja variabilidad total, y que dicha variabilidad esté explicada en mayor medida por los períodos (fuente de variación que puede ser controlada por bloqueo en el diseño estadístico, o por la corrección por los blancos al calcular la PGAN).

Con el fin de asegurar una mejor estimación de los parámetros de PGAN de los sustratos estudiados, el blanco ideal, además de ser poco variable, no debería producir gas, *i.e.* los Par A y Par B del modelo no lineal deberían ser cercanos a cero, y el Par c debería ser cercano a uno; de este modo la PGA lograría su máximo potencial (B-A) inmediatamente, sin embargo esta condición se contrapone a la necesidad de proveer un inóculo activo.

Según el protocolo original de Menke y Steingass (1988) la colecta del inóculo ruminal previo a la alimentación de los animales (alimentados 2 veces por día,

suponiendo un ayuno de 12 h) reduce la variación en la composición (y por ende, actividad) del inóculo. Pero, Payne et al. (2002) encontraron que la colecta de licor ruminal 4 u 8 h post-ingesta reducía la variabilidad de la PGA entre períodos (semanas de experimentación), en comparación con un inóculo extraído con 12 h de ayuno, generando una mayor reproducibilidad y asegurando la mínima actividad microbiana requerida. En nuestro trabajo, el inóculo Control puede considerarse análogo al del protocolo de Menke y Steingass (1988, *i.e.* 12 h de ayuno), mientras que los inóculos pre-incubados fueron incubados 1, 2 y 4 h después de ofrecer sustrato a la población bacteriana, análogo a los inóculos obtenidos post-ingesta, pero en un ambiente más controlado que el propio del rumen.

El principal efecto de la pre-incubación fue el aumento en la PGA de los blancos que pasó de 7,9 ml en el Control a casi el doble para los tratamientos de pre-incubación (15,9, 14,0 y 12,3 ml respectivamente para Prei-1, Prei-2 y Prei-4), valores reflejados en forma idéntica en los modelos ajustados como la suma de A+B (*i.e.* respectivamente 7,5; 16,2; 14,2 y 12,2 ml para Control, Prei-1, Prei-2 y Prei-4).

El Par A (intercepta del modelo) de la modelación de la PGA, en ningún caso difirió de cero (0,02 – 0,33 ml; EEM= 0,127 ml), y no se detectaron diferencias entre tratamientos (Cuadro 2.2): en todos los casos la PG “inmediata” (*i.e.* “A”) de los blancos aportó menos del 3% al total del gas producido (A+B). Esta fracción reflejaría el gas residual disuelto en el líquido y material particulado del inóculo. Considerando la pequeña magnitud de dichas contribuciones no resulta sorprendente la heterogeneidad de varianzas observada entre tratamientos. Adicionalmente, es interesante resaltar que para el Par A la contribución del período a la varianza total (67%) fue superior a la contribución de las réplicas (*i.e.* efecto de las botellas, 33%).

En concordancia con estas observaciones, Gierus et al. (2008) compararon cómo afectaba la corrección por blancos en varios alimentos para dos sistemas de producción de gas diferentes, y encontraron que el efecto de los períodos incrementaba la variabilidad de la PGA, utilizando la técnica de *Hohenheim*. Estos resultados indican que, contrariamente a lo buscado, la pre-incubación de los inóculos no contribuyó a uniformizar la PGA de los blancos de la primera hora (asociada con la fracción soluble), ni al Par A.

Por otro lado, el análisis de la PG asociada con la fracción del sustrato potencialmente fermentable (*i.e.* Par B), mostró que las pre-incubaciones incrementaron dicho valor, pero que disminuyó en correspondencia con la duración de la Pre-incubación, análogo a lo que se observó para PGA_{t1-t24} de los blancos. En forma concomitante se observó que el parámetro “c” aumentó en la medida que se redujo el valor del parámetro “B” ($c = 2,75 \times B^{-0,922}$; $R^2 = 0,9998$). Estas diferencias en la PGA de los blancos podrían ser explicadas por el incremento en la actividad microbiana en los tratamientos pre-incubados debido a la oferta de sustrato extra que tenían con respecto al Control. Concomitantemente, estos inóculos mantuvieron sus características fermentativas y su capacidad buffer normal para el tipo de animal, dieta consumida y momento de toma de muestra tal como lo pone en evidencia Araujo et al. (2011).

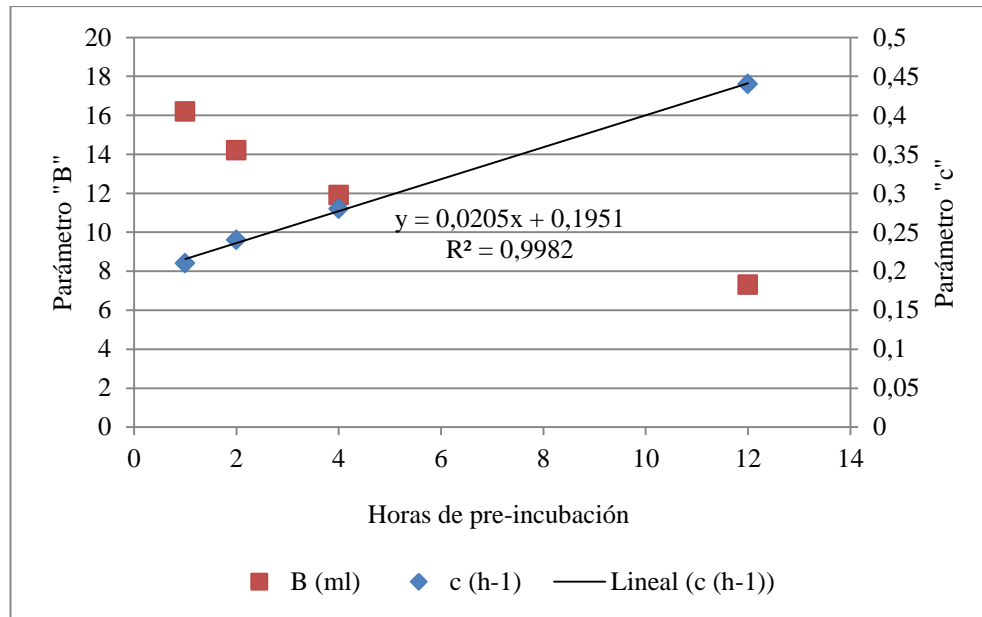


Figura 2.3 Comportamiento de los parámetros B y c del modelo no lineal de $PGA = A + B \cdot (1 - e^{-c \cdot \text{tiempo}})$ de los blancos en función del tiempo de pre-incubación.

Los tratamientos de pre-incubación, lejos de mejorar las características de los blancos, las empeoraron, dado que produjeron casi el doble de gas (*i.e.* los blancos representarían una proporción mayor de la PGA de las botellas con sustratos) y redujeron la tasa de producción de gas ("c") a partir de "B".

Aunque especulativo, fue notable el comportamiento de los parámetros B y c en función de las horas de incubación cuando se asignó al Control un equivalente a 12 h de pre-incubación (*i.e.* considerando que las 12 h fueron aproximadamente el tiempo de ayuno de los animales; Figura 2.3). La PGA de los blancos estaría en relación directa con la actividad microbiana de cada inóculo, de lo que se desprende que cuanto mayor fue el tiempo de incubación menor fue el residuo de la fracción "B", como probable consecuencia de su consumo durante la pre-incubación, pero concomitantemente aumentó la capacidad fermentativa del inóculo, probablemente derivado de la mayor actividad microbiana y concentración de enzimas.

Es claro que debe haber un equilibrio entre la estabilidad del inóculo y la actividad microbiana constante presente en el mismo, ya que es fundamental para generar datos que puedan ser replicados en diferentes laboratorios, en diferentes momentos (Jessop y Herrero, 1998). Menke y Steingass (1988) recomendaron un mínimo de actividad microbiana en los blancos correspondiente a generar 7 ml en 24 h de fermentación (cuando el volumen de incubación fuese de 30 ml, y restringida al gasto del empuje del gas en el embolo en el sistema de *Hohenheim*), mientras que Nagadi et al. (1999), en un estudio sobre como afectaba la frecuencia de colecta de licor a la actividad microbiana, recomendaron un mínimo de PGA por los blancos de 15,5 ml en 24 h de fermentación para asegurar una actividad microbiana homóloga a la que provendría del rumen. En el presente estudio, los blancos del inóculo Control

produjeron 7,9 ml de gas en 24 h y casi el doble en Prei-1 y Prei-2, lo que sugiere una actividad suficiente para garantizar la funcionalidad del medio.

La PGA por los blancos a las 24 h, en comparación con la PGAB de las botellas incubadas con Heno (tratamiento que produjo menos gas, por lo tanto resulta la comparación más crítica), representó *c.a.* el 50% para el Control, Prei-2 y Prei-4 (Figura 2.4), valores que son significativamente superiores que lo reportado en los pocos trabajos encontrados sobre este tema (Carro et al., 2005; Gierus et al., 2008).

La proporción de la PGA de los blancos sobre la PGAB de los sustratos, presentó un impacto alto, que no se ajusta al modelo de “blanco ideal” planteado anteriormente. Las pre-incubaciones si bien no modificaron ni el Par A, ni la PGA_{t1} de los blancos (siendo ambos relativamente bajos), si aumentaron la PG explicada por el Par B, tanto mayor cuanto menor el tiempo de pre-incubación, sugiriendo que fueron los sustratos residuales de la Prei los responsables de este incremento.

2.5.3. Perfiles de los ácidos grasos volátiles de los blancos

El incremento en la concentración de los AGV totales de los blancos (en los tratamientos pre-incubados) se debió a un incremento en las producciones de los ácidos acético y propiónico y esto fue por la incorporación de sustrato adicional en dichos tratamientos.

Como consecuencia de los tratamientos de pre-incubación, la proporción relativa de los ácidos acético + propiónico en el total se incrementó pero no se detectaron diferencias significativas. Estos cambios producidos por las pre-incubaciones en las concentraciones de AGV podrían inducir un cambio en las concentraciones de $N-NH_3$, sin embargo, la dependencia de este parámetro al nivel proteico de la dieta es mucho más fuerte, por lo cual es razonable la falta de diferencias entre tratamientos. El pH observado en todos los tratamientos (cercano a 7,0), garantizó que el medio mantuviera la viabilidad de la población microbiana durante la incubación.

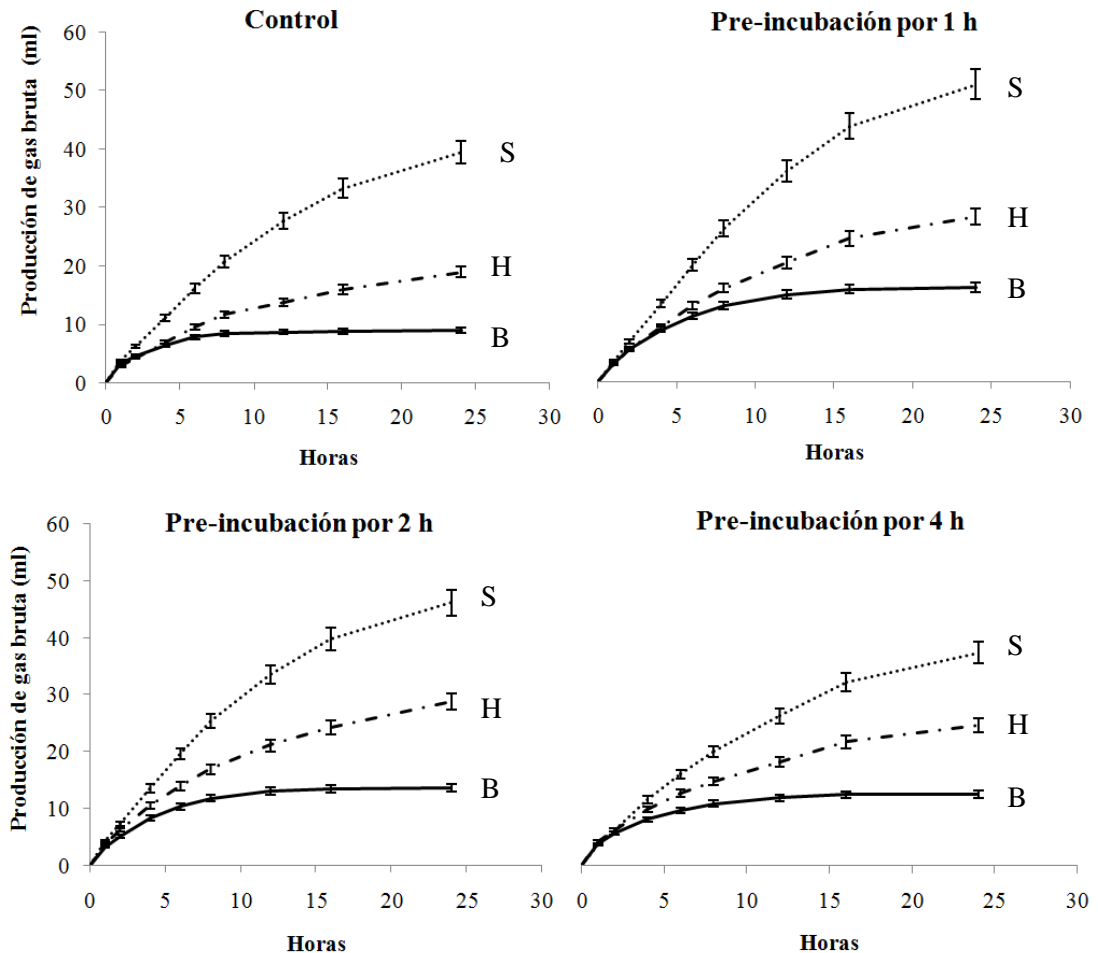


Figura 2.4 Cinética de producción de gas bruta *in vitro* para cuatro inóculos tratados (Control [0 h de pre-incubación] y 1, 2 y 4 h de pre-incubación) para blancos (**B**, licor ruminal + medio buffer, sin sustrato, línea llena) y para botellas con un suplemento comercial para vaca lechera (**S**, línea punteada) y heno de alfalfa (**H**, línea con punto y raya) como sustratos.

2.5.4. Características de la fermentación de los sustratos incubados con los inóculos pre-incubados

Como se indicara anteriormente (Sección 2.5.1, Objetivos y criterios de verificación), la funcionalidad del medio se verificaría con el adecuado desempeño de los inóculos medidos a través de la ivDMS y en la PG e idealmente también a través de la producción y composición de AGV.

El comportamiento similar en la cinética de fermentación, ivDMS y el licor ruminal (pH y N-NH₃) de los tratamientos pre-incubados y el Control (*i.e.* licor ruminal normalmente utilizado en los protocolos de las técnicas de PG) son coherentes con las características de un inóculo normal (Van Soest, 1994). De hecho, las diferencias encontradas en el pH ($p < 0,05$, Cuadro 2.4), tanto para los tratamientos, como para los

sustratos, no suponen un cambio que repercuta en la población microbiana de los inóculos.

Teniendo esto en cuenta, al analizar los parámetros de PGAN no se encontraron diferencias entre tratamientos, sin embargo, para el Par A la variabilidad fue ampliamente explicada por la variabilidad interna entre réplicas (62% del total). Para el Par B, a pesar de las grandes diferencias de Prei-2 y Prei-4 con respecto al Control (40 y 53% mayores que el Control), se encontraron diferencias significativas solo para Prei-1, quizá debido a la gran variabilidad entre botellas. Es interesante tener en cuenta que solo el 5 % provino de la variación entre períodos (Cuadro 2.4). Esta baja gravitación de los períodos seguramente está asociada a que los animales donantes provienen de un mismo laboratorio y bajo las mismas condiciones de manejo, alimentación, etc. En situaciones donde se han comparado distintos laboratorios se ha reportado que la mayor fuente de variabilidad en la PGA *in vitro* proviene de la variaciones entre laboratorios con un nivel de variación intra-laboratorios aceptablemente bajo (Getachew et al., 2002).

Una vez finalizada la incubación por 24 h, el pH (media general= 7,1, EEM= 0,03, $p > 0,05$) y la concentración de N-NH₃ (media general= 48,6 mg/l, EEM= 3,56, $p > 0,05$) de los tratamientos con Suplemento no difirieron entre si y resultaron similares a las encontradas en la bibliografía (Lorenz et al., 2011), indicando que se mantuvieron las condiciones apropiadas para el funcionamiento del inóculo ruminal (Van Soest, 1994). La ivDMS (758 g/kg MS) y PGAN (347 ml/g MS incubada) del Suplemento fueron similares a la fermentación de un concentrado evaluado por Gierus et al. (2008; *i.e.* una mezcla de grano de cereales, pulpa de remolacha y cascarilla de soja; ivDMS= 720 g/kg MS y PGAN= 328 ml/g MS incubada, evaluada con la técnica de gas de *Hohenheim*). A su vez, Getachew et al. (2005) analizaron ocho diferentes raciones comerciales para vaca lechera y aunque la relación acético/propiónico fue similar a la encontrada en este estudio para todos los inóculos (*i.e.* 2,4 y 2,1, para el promedio de las 8 raciones y el Suplemento de este ensayo, respectivamente), las concentraciones los AGV fueron menores que las encontradas aquí.

Por otro lado, para el heno de alfalfa la producción de gas potencial (Par B) y la tasa de B (Par c) fueron similares a los reportados para un heno de alfalfa por Getachew et al. (2004), sin embargo ellos encontraron menores concentraciones de todos los AGV, aunque con similares proporciones relativas. No obstante, la concentración de ácido acético, propiónico y de AGV totales encontradas en el heno de alfalfa estudiado por Stefanon et al. (1996, acético= 37,0; propiónico= 18,3 y AGV totales= 58,2 mMol/l) fueron equivalentes a los producidos por la fermentación del inóculo Control de este experimento (acético= 36,3; propiónico= 16,5 y AGV totales= 68,1 mmol/l), pero menores que los producidos por la fermentación de heno de alfalfa con los inóculos pre-incubados.

En síntesis, los descriptores del perfil fermentativo analizados, permitieron corroborar que todos los inóculos desarrollaron fermentaciones razonables.

2.5.5. Correlación de parámetros de la modelación de PGA corregidos y sin corregir por blancos

Con fuera indicado con anterioridad el blanco no debería influir sobre la estimación de los parámetros (*i.e.* A, B y c) de la modelación de la PGAN. La correlación del Par A para PGAB (*i.e.* sin corrección alguna) y PGAN (*i.e.* corregida por blancos) mostró una buena asociación tanto para la base de datos completa como para los tratamientos por separado (Cuadro 2.6). Por el contrario los Par B y Par c no mostraron un comportamiento similar, lo cual indica que los blancos tuvieron un efecto significativo sobre la estimación de los parámetros del modelo (Cuadro 2.6; Figura 2.5).

Para el Par A, se puede decir que su baja magnitud en los blancos permitió que existiera una alta correspondencia entre los Par A correspondientes al de los valores corregidos y sin corregir. Por el contrario, la magnitud de los Par B y Par c contribuyeron a una mala asociación (Cuadro 2.6). Las pre-incubaciones, por su lado, generaron una mayor variabilidad, visible en una mala correlación entre las PGA corregidas y sin corregir. Si bien el objetivo del trabajo era generar un inóculo más estable y robusto, controlando el ambiente, sustrato y condiciones de fermentación previo a la incubación *in vitro*, las pre-incubaciones generaron alteraciones en la producción y velocidad de fermentación, posiblemente debidas a que el sustrato extra de la pre-incubación (análogo al alimento ofrecido a los animales horas antes de colectar el licor ruminal) pudo haber generado una mayor actividad microbiana y menos controlada (Payne et al., 2002).

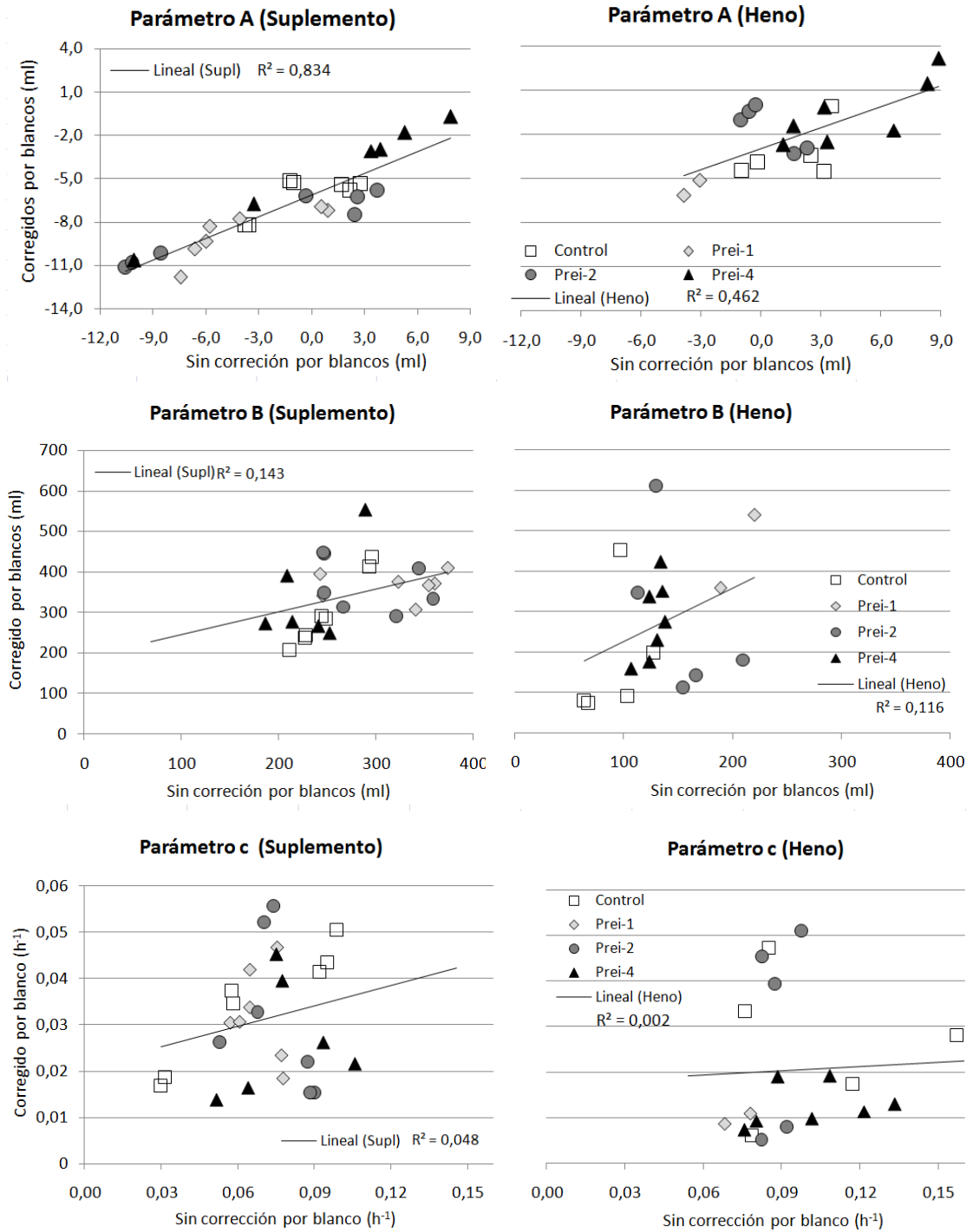


Figura 2.5 Correlación entre valores corregidos y sin corregir por blancos de los parámetros de producción de gas acumulada ($PGA = A + B \cdot (1 - e^{-(c \cdot \text{tiempo})})$), obtenidos después de 24 h de fermentación de 2 sustratos; *i.e.* suplemento para vacas lecheras y heno de alfalfa, incubados con licores ruminales pre-incubados por 0, 1, 2 y 4 h (Control, Prei-1, Prei-2 y Prei-4, respectivamente).

2.6. Conclusiones

En este trabajo se especuló que el control de la cantidad de sustrato y tiempo de pre-incubación iba a contribuir a homogeneizar la PGA de los inóculos. Sin embargo, los resultados no permitieron validar este supuesto, dado que la variación aumentó debido a que los residuos del sustrato de la pre-incubación aumentaron la variación de la PGA entre blancos. Esto se verificó por la reducción del Par B y de PGA_{t1-t24} de los blancos conforme se incrementaron las horas de pre-incubación. Asimismo, también se pudo observar que la PGA de los blancos representó una proporción muy significativa de la PGAB de los sustratos, fundamentalmente asociado al aumento de la fracción del sustrato potencialmente fermentable (*i.e.* Par B y PGA_{t1-t24} ; que disminuyó con la duración de las pre-incubaciones).

Con respecto a la funcionalidad del inóculo, los resultados permitieron poner en evidencia que tanto para el Control como para los tratamientos de pre-incubación, no se vió afectada la actividad. Esta conclusión esta fundamentada en que no se alteraron los valores de ivDMS y que tampoco se alteraron en forma biológicamente significativa los parámetros pH y N-NH₃. Asimismo, en las pre-incubaciones los perfiles de AGV fueron razonables para todos los tratamientos y la PGA de los blancos reflejó una población microbiana activa.

Capítulo 3.
**Efecto de los residuos insolubles en agua y en detergente
neutro sobre la digestión ruminal y producción de metano
de forrajeras tropicales y templadas**

3.1. Resumen

Debido al creciente interés práctico y económico de las forrajeras tropicales (*i.e.* .metabolismo fotosintético C4) en la producción de rumiantes de zonas marginales, se pretendió analizar las características químicas-nutricionales y el perfil fermentativo de estas forrajeras, y el rol que cumplen los compuestos solubles en agua (**CSA**) y las paredes celulares purificadas (**PCP**, *i.e.* forraje después de eliminar los compuestos solubles en detergente neutro, **CSDN**) en la eficiencia de digestión y cinética de fermentación. Se realizaron dos ensayos (exp. 1 y exp. 2) mediante la técnica de producción de gas (**PG**) *in vitro*, donde se analizaron ocho forrajeras, templadas y tropicales, evaluadas tal cual (**Or**) y comparadas con los residuos luego del lavado de los CSA y los CSDN, evaluando la cinética de PG, digestibilidad verdadera y la relación entre los productos de fermentación (*i.e.* ácidos grasos volátiles, biomasa microbiana (**BM**) y gases de fermentación, *i.e.* CO₂ y CH₄), Además se evaluó el efecto del secado previo a la incubación en las PCP. Aún teniendo perfiles químicos similares, el comportamiento fermentativo variable de las forrajeras C4 nos indica que estos sustratos deberían ser analizados en forma particular. El lavado (*i.e.* sin CSA) aumentó la digestibilidad de la fibra en *Paspalum dilatatum* (**PD**, 197, 16 y 20 % para 24, 48 y 72 h) y en *Milium coloratum* (7 y 8 % para 48 y 72 h, exp. 1) y aumentó la producción de BM (PD, 41 y 39 % después de 48 y 72 h). Asimismo, la eliminación de los CSA generó perfiles más acetogénicos, lo cual indica que algún CSA (o el mismo lavado) podría afectar la fermentación. Además de los CS, características particulares de las PCP de las gramíneas C4 del exp. 2 afectan la producción de CH₄ (**PCH₄**) por unidad de MS y MO digerida. El secado de las PCP disminuyó la digestibilidad solo en *Chloris gayana*, aunque la PCH₄ no se vió alterada, lo que sugiere que el tratamiento de secado altera la fermentación en forma diferencial para los sustratos analizados.

3.2. Introducción

En regiones tropicales y subtropicales, los sistemas de producción de rumiantes con base pastoril obtienen de los forrajes la fuente de alimentos más abundante y económica a la que pueden acceder (Van Soest, 1994), sin embargo, los forrajes que crecen normalmente bajo estas condiciones climáticas, presentan características particulares en calidad y cantidad de fibra, que actúan como limitantes en el aporte de energía y nutrientes para los rumiantes (Dominguez Bello y Escobar, 1997). Una de las principales características de estos materiales es su alto contenido de pared celular, sin embargo y pese a la creciente importancia económica de este tipo de forrajes, son escasas y limitadas las descripciones de sus características físico-químicas.

Una consecuencia de la composición química de estos forrajes es la característica baja digestibilidad de la MS (menor al 60%, Arroquy et al., 2014) y MO (menor a 50%, Krueger et al., 2008; Kurihara et al., 1999), que a su vez se asocia a una alta relación entre los ácidos acético y propiónico (Dominguez Bello y Escobar, 1997; Leng, 1990) y mayor pérdida de energía como CH₄ durante el proceso de fermentación ruminal, comparadas con las especies templadas (Archimède et al., 2011; Kurihara et al., 1999).

Los rumiantes tienen la capacidad de aprovechar parte de la pared celular de forrajes como fuente de energía, aunque también utilizan los compuestos solubles (**CS**, ácidos orgánicos, mono y oligosacáridos y proteínas solubles; Hall et al., 1999). Desde hace muchos años se estudia el rol de las fracciones fibrosas en la alimentación de rumiantes (Van Soest, 1967), y más actual es el estudio del rol en la cinética de fermentación de los compuestos solubles en agua (**CSA**, Calabrò et al., 2006; Stefanon et al., 1996) y solubles en detergente neutro (**CSDN**, Schofield y Pell, 1995) de diversos forrajes. Gran parte de los compuestos constituyentes de la fracción soluble acuosa son azúcares simples y sus polímeros de cadena corta, así como proteínas, minerales y ácidos orgánicos solubles (Smith, 1981), mientras que en los CSDN, se le suman pectinas, β-glucanos de la pared celular, lípidos y almidón (Van Soest et al., 1991); que son, en general, rápidamente fermentados (salvo el almidón) por la flora ruminal produciendo ácidos grasos volátiles (**AGV**) y biomasa microbiana (**BM**).

Si bien los AGV y la masa microbiana representan la principal fuente de energía y proteína disponible para los rumiantes que consumen forrajes (Van Soest, 1994), esta fermentación anaerobia también genera gases (*i.e.* CH₄ y CO₂) como productos de desecho, que además de tener un efecto invernadero cuando son eliminados al ambiente, representan una pérdida de energía; aproximadamente de 2 a 12% de la energía bruta consumida es perdida en forma de CH₄ (Lasey et al., 1997; Watson et al., 1992). La emisión de CH₄ esta explicada en gran medida por el consumo voluntario de la materia seca y por la digestibilidad (Moss et al., 1995; Johnson y Johnson, 1995), aunque además está influida por la producción de AGV (principalmente ácido acético, propiónico y butírico; Blümmel y Orskov, 1993) y sus respectivas proporciones (Wolin, 1960). Se ha establecido que mientras que la producción de acético y butírico aportan H⁺, la producción de propiónico actúa como una forma de capturar H⁺ y

consecuentemente restringe la provisión de insumos para la síntesis de CH_4 (Wolin, 1960).

Las técnicas de producción de gas *in vitro* han sido ampliamente utilizadas para evaluar la cinética y los productos derivados de la fermentación de los alimentos (Dijkstra et al., 2005; Getachew et al., 1998; Rymer et al., 2005), aunque también para estudiar la partición de los nutrientes fermentados entre los distintos productos (*i.e.* AGV, BM y CH_4). De hecho el uso de la técnica de gas *in vitro* se justifica por la estrecha vinculación que existe entre los productos de desecho y los productos de fermentación útiles para el metabolismo (*i.e.* AGV y BM, Blümmel et al., 1999).

Teniendo en cuenta la relación estequiométrica existente entre el gas de fermentación y el perfil de AGV, Blümmel et al. (1997c, 1994) describieron una relación inversa entre gas de fermentación producido *in vitro* y la BM por unidad de sustrato verdaderamente degradado. Esta relación es explicada por el denominado factor de partición (**FP**) de los nutrientes, que indica la proporción de sustrato verdaderamente degradado que se destina para producción de células microbianas (Blümmel et al., 1997c). Por lo antes expuesto, se puede asumir que para mejorar la eficiencia de utilización de los alimentos, se deberían utilizar herramientas que estimulen la digestibilidad de la fibra, mejoren la eficiencia en la síntesis de BM (**ESBM**) y generen un descenso en la producción de CH_4 (**PCH₄**, Blümmel y Lebzien, 2001; Guo et al., 2009; Nagajara et al., 1997).

Numerosas estrategias han sido estudiadas para mitigar las emisiones de CH_4 ruminal (Buddle et al., 2011; Knapp et al., 2014; Waghorn y Clark, 2006), aunque pocas son las aproximaciones que describan el papel de los CS en el potencial metanogénico y en la partición de nutrientes. En referencia a esto, si bien se ha demostrado que forrajes con mayor proporción de carbohidratos estructurales producen más gases entéricos (Van Soest, 1994), fue estudiada además la influencia de la composición de la fibra en la generación de gases (Buddle et al., 2011; Nagajara et al., 1997).

Aunque estudios anteriores contrastaron dietas fibrosas y no fibrosas sobre el desempeño productivo, parámetros ruminales (Feng et al., 1993) y sobre la PCH_4 *in vivo* (Hindrichsen et al., 2005) e *in vitro* (Hindrichsen et al., 2004), estos trabajos no evaluaron las características composicionales de los alimentos. Por otro lado, la fracción soluble de los forrajes no solo está compuesta por productos rápidamente fermentecibles, sino que en muchos casos también por compuestos que podrían tener un potencial de mitigación de CH_4 . Entre muchos otros compuestos, suele destacarse a los taninos y las saponinas (Animut et al., 2008; Soliva et al., 2008). Y en numerosos trabajos se hace mención de las amplias posibilidades que ofrecen en este sentido los forrajes tropicales (Barahona et al., 2003; Tiemann et al., 2008) y especies poco descriptas presentes en los pastizales naturales (Cantet et al., 2016).

El presente capítulo tiene como objetivo analizar el papel de los CSA y los CSDN de forrajeras templadas y tropicales de creciente interés en la ganadería de zonas marginales, en la partición de nutrientes, la cinética de fermentación y la composición de los productos derivados de la fermentación ruminal.

3.3. Materiales y Métodos

Con el fin de evaluar la contribución de las fracciones solubles e insolubles en agua sobre el potencial metanogénico y utilización de la energía se realizó un experimento (**exp. 1**) analizando la fermentación *in vitro* de ocho forrajeras (templadas y tropicales). En una segunda etapa (**exp. 2**), se realizaron lavados con solución de detergente neutro (**SDN**) en tres forrajeras para generar, con el residuo insoluble, un complejo de paredes celulares purificadas (**PCP**, Wawrzkievicz, 2010) lo que permitió estudiar el efecto de las características de la pared celular y de los CSDN sobre la fermentación ruminal (Schofield y Pell, 1995b).

3.3.1. Colección y procesamiento de las muestras de forrajes

En el exp. 1 se estudiaron ocho especies forrajeras (Raigrás [**RG**, *Lolium perenne*], Alfalfa [**ALF**, *Medicago sativa*], *Bread grass* [**UB**, *Urochloa brizanta*, cv. Toledo], Pasto Guinea [**MM**, *Megathyrsus maximus*; ex *Panicum maximus*, cv. Tanzania], Pasto miel [**PD**, *Paspalum dilatatum*, cv. Primo], *Cenchrus ciliaris* [**CC**, cv. Texas], *Milium coloratum* [**MC**, cv. Klein] y *Chloris gayana* [**CG**, cv. Pionner]), obtenidas de la cosecha de pequeñas parcelas sembradas en el campo experimental de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires (FAUBA, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina). Las gramíneas C4 y la alfalfa fueron cosechadas durante el mes de enero del año 2012; en cambio el raigrás se cosechó a fines de junio del mismo año; todas las especies se cosecharon a 5 cm del suelo, a similar estado fenológico (*i.e.* estado vegetativo previa floración).

En el exp. 2 se testearon tres forrajeras utilizadas en el primer experimento, dos tropicales (*i.e.* CG y MC) y 1 templada como contraste, (*i.e.* RG). A todos los forrajes, una vez cosechados, se los conservó en frío (*i.e.* a -20°C) y se separaron las vainas, fluorescencias y material senescente de las láminas. Sólo las partes verdes de las láminas fueron utilizadas como sustrato, por lo cual se molieron en fresco y se mantuvieron a -20°C hasta su utilización. El molido en fresco se realizó colocando las láminas de los forrajes en capas dentro de una caja de telgopor interponiendo hielo seco (CO₂ presurizado) en pedazos de 3-5 cm de diámetro, de tal forma que todas las hojas tuvieran contacto con el hielo. Las hojas fueron mantenidas en contacto con hielo seco durante aproximadamente 5 minutos, hasta que estuvieran congeladas y quebradizas, momento en el cual fueron molidas con un molino industrial de acero inoxidable “Foss Tecator 2096 Homogeneizer” adicionando pequeños trozos de hielo seco dentro del molino, para mantener las propiedades quebradizas del forraje. El material se molió hasta un tamaño de partícula de *c.a.* 1 mm fue conservado a -20°C hasta su utilización (en un recipiente abierto para que el hielo seco se evapore).

El procedimiento original de producción de gas *in vitro* según Theodorou et al. (1994), indica secar el material utilizado como sustrato (65°C por 4 h) para facilitar su molienda, sin embargo estudios previos han indicado que el secado en estufa afecta la fermentación *in vitro* y la PCH₄ de algunas forrajeras templadas y tropicales (Cantet et al., 2011a, 2011b; Wawrzkievicz, 2010), por lo cual el sustrato se adicionó fresco (*i.e.*

sin secado) a las botellas de fermentación, manteniendo hasta la incubación (pesada y almacenaje) la temperatura por debajo de 0°C.

3.3.2. Tratamientos

En el exp. 1, cada uno de los sustratos fue evaluado tal cual (**Or**) y una alícuota de cada forraje fue lavada con una cantidad conocida de agua destilada en una cubeta individual por 3 minutos con agitación constante (teniendo en cuenta que los sustratos fueron evaluados en fresco, se controló que la temperatura del agua fuese de $5 \pm 2^\circ\text{C}$). Posteriormente, los contenidos de las cubetas (cada una con un forraje diferente), fueron filtrados a través de 4 capas de gasa de algodón, recuperando individualmente el sustrato lavado, eliminando de esta manera los CSA y generando el 2^{do} tratamiento con el residuo insoluble en agua (**Lav**).

Así como en el exp. 1, en el exp. 2 también se reservó una alícuota “tal cual” que fue utilizada como control (*i.e.* 1^{er} tratamiento, [**Or**]). En este ensayo, se evaluaron los componentes solubles en SDN, para lo cual se purificaron las paredes celulares de los tres forrajes en estudio, esto se llevó a cabo lavando los forrajes con SDN, (Goering and Van Soest, 1970; 1 lt SDN a 90°C + 7 gr de materia seca [**MS**] sustrato + 4 ml alfa-amilasa termoestable). Posteriormente se enjuagaron con agua destilada (*i.e.* 4 enjuagues de 5 min a 90°C) para retirar el detergente y generar el 2^{do} tratamiento (*i.e.* FDN Fresco [**FDNFr**]). Teniendo en cuenta los resultados encontrados por Cantet et al (2011a, 2011b) donde el secado en estufa afectaba los parámetros de fermentación *in vitro* de este tipo de forrajeras, se decidió llevar una alícuota del FDNFr a estufa (65°C durante 48 horas), generando el 3^{er} tratamiento (*i.e.* FDN Seco [**FDNSe**]), para evaluar este efecto térmico en las PCP.

3.3.3. Producción de gas in vitro

Las incubaciones *in vitro* de ambos experimentos fueron realizadas de acuerdo con los procedimientos sugeridos por Theodorou et al. (1994) y modificados por Wawrzkiwicz y Danelón (2004), según lo descrito en la sección 2.3.2 del Capítulo 2, en lo referido a las características de los animales donadores y las condiciones en las que se obtuvo el licor ruminal preparado como inóculo.

Cada sustrato fue pesado en fresco (ver punto 3.3.1 de este capítulo; media general= 210 mg, base seca) de cada tratamiento en duplicado. En el exp. 1 se evaluaron 3 tiempos de sacrificio (*i.e.* 24, 48 y 72 h de fermentación). Por lo tanto la cantidad de botellas por corrida fueron un total de 96 (*i.e.* 8 forrajes \times 2 tratamientos \times 2 réplicas \times 3 sacrificios). En cambio, en el exp. 2, la mitad de las botellas fueron incubadas por 24 h y la otra mitad por 48 h, utilizándose 36 botellas por corrida (*i.e.* 3 forrajes \times 3 tratamientos \times 2 réplicas \times 2 sacrificios). En ambos ensayos, las corridas fueron realizadas en 3 semanas diferentes, correspondientes a 3 períodos (período \equiv repetición).

A cada botella con su respectivo sustrato se le agregaron 38 ml de medio buffer (Menke y Steingass, 1988) y 4 ml de licor ruminal (relación licor: medio, 1: 10) y fueron mantenidos a 39°C en un baño termostatzado durante las horas de fermentación

correspondientes. Además, en cada ensayo se corrieron cuatro botellas (para cada sacrificio) con licor + medio, sin el agregado de sustrato, utilizados como blancos. Las botellas fueron agitadas cada hora durante las primeras 12 horas y desde ahí en adelante, en cada medición.

Se evaluaron las diferencias entre tratamientos y entre sustratos de cada experimento y sus efectos en la digestibilidad de la MS y MO *in vitro*, digestibilidad de la fibra, cinética de producción de gas acumulada (**PGA**), concentración de gases de fermentación (producción de CH₄, **PCH₄**) y licor ruminal, determinado por el perfil de AGV, pH y concentración ruminal de N amoniacal (**N-NH₃**). Además se evaluó el FP de sustrato a gas (mg MS degradada/ ml gas producido; que refleja la eficiencia de producción de proteína microbiana) y se estimó la BM según Blümmel et al. (1997a).

3.3.4. Cinética de fermentación y medición del metano *in vitro*

En ambos experimentos, inmediatamente después de la inoculación, se realizó una punción en el tapón de butilo de las botellas con una jeringa adicionada con una aguja 16×5-25G×5/8, de modo de equiparar la presión dentro del *headspace* de cada botella con la presión atmosférica (*i.e.* presión al tiempo 0 en el *headspace*= 0 psi). Las mediciones en los cambios de presión dentro de las botellas fueron explicadas en el Capítulo 2, sección 2.3.3. La PGA neta (**PGAN**, [*i.e.* después de descontar los blancos]) fue calculadas para las horas 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 48 y 72 de incubación (*i.e.* 10 tiempos) para el exp. 1, llegando a 48 h en el exp. 2 (*i.e.* 9 tiempos). Adicionalmente se evaluaron las tasas horarias de PGAN (ml/g MS h⁻¹) en la hora 1, 10 y 60 (exp. 1) y hora 10 y 42 (exp. 2), que se calcularon dividiendo el gas acumulado entre dos horarios sucesivos por el número de horas de fermentación transcurrido, tomando el gas de botellas independientes para cada tiempo, *i.e.*:

$$(\text{PGAN}_h - \text{PGAN}_{h-1}) / (t_h - t_{h-1})$$

Para evaluar la cinética de fermentación, las PGAN se ajustaron al modelo no lineal de Ørskov y McDonald (1979) (*i.e.* $\text{PGA} = A + B \times (1 - e^{-c \times t})$), utilizando el Procedimiento NLIN de SAS (2002). Además se analizó el tiempo de retardo (Lag) desde la incubación (tiempo 0 de PG) hasta el comienzo de la PG, despejando la mencionada ecuación no lineal, *i.e.*:

$$\text{Fase Lag} = \ln \frac{(1 - (\frac{-a}{b}))}{-c}$$

El análisis de la PCH₄ a las 24 h (exp. 1) y a las 24 y 48 h (exp. 2), se realizó acumulando el gas producido (de las botellas que se sacrificaban en el horario correspondiente) en un vial saturado con N a presión atmosférica. Durante cada toma de muestra de presión y volumen, el total de gas producido fue extraído de cada botella e insertado a presión en un vial (*i.e.* 50 ml). La concentración de CH₄ se analizó tomando una alícuota (0,5 ml) del vial de almacenaje de gases en un cromatógrafo de gases HP 4890 series (Hewlett Packard® Labs, Palo Alto, CA, EE.UU.) equipado con una columna de acero inoxidable de 2 mts de largo con N Porapak (malla de 80-100) y un detector de ionización de llama (detector FID). Como gas carrier se utilizó Nitrógeno

con una temperatura del horno de 90°C, del inyector de 110°C y del FID de 250°C. La calibración fue completada utilizando concentraciones crecientes de CH₄ y CO₂. La PCH₄ fue también analizada en las botellas blanco (con idénticas horas de fermentación de las botellas tratamiento), para corregir la PCH₄ proveniente del inóculo. A partir de la proporción de CH₄ en el gas producido, fue estimada la PCH₄ según los procedimientos explicados por Lopez y Newbold (2007). En breve, el volumen de CH₄ producido se calculó a partir del volumen de gas producido al final de la fermentación y por la composición del gas, según la siguiente fórmula:

$$\text{CH}_4 \text{ (ml)} = (\text{PGA} + \text{HS}) \times \text{Conc}$$

donde: PGA, es el volumen (ml) del gas total producido; HS, es el volumen (ml) del *headspace* en la botella (si bien éste no es gas producido, tiene la misma concentración de CH₄ que el gas producido al final de la incubación, ya que al principio, se garantiza la exclusión de metano del *headspace*, saturando dicha atmosfera con N₂, durante la inoculación del licor ruminal, previo sellado, Lopez y Newbold, 2007) y por último, *Conc*, es la proporción de CH₄ en la muestra analizada por cromatografía.

Una vez conocido el volumen, la cantidad de CH₄ (en mMol) se puede calcular aplicando y despejando de la fórmula de la ley de los gases ideales:

$$P \times V = n \times R \times T \approx \left(n = \frac{P \times V}{R \times T} \right)$$

Donde *n*, es la cantidad de CH₄ (en mMol); P, es la presión atmosférica (en atmósferas); V, el volumen del gas (en ml); R, es la constante de los gases (0,082 lt × atm / [mol × °K]) y T, es la temperatura a la que se midió el gas (°K). Teniendo en cuenta que P es 1 Atmósfera y T es 312°K (39°C + 273), entonces un mol de cualquier gas (inclusive el CH₄) ocupa 22,415 lt. Luego se convierte el CH₄ en g (CH₄, 1 mol = 16 g), y se lo afecta por kg de MS incubada (**CH₄-MSi**), por kg de MS desaparecida (**CH₄-MSd**), por kg de MO desaparecida (**CH₄-MOd**) y como la proporción de la EB convertida en CH₄ (**Ym**).

3.3.5. Análisis químicos de los forrajes utilizados como sustratos

Las muestras utilizadas en ambos experimentos fueron analizadas de acuerdo a los protocolos del PROMEFA, según métodos de la AOAC (1995), tal como se describió en la sección 2.3.4 del Capítulo 2. En breve, se analizó la MS (AOAC N° 976.63) y la MO, que fue calculada como el peso perdido de la MS en ignición a 600°C (AOAC N°942.05). Se analizó Proteína bruta (PB= N total × 6,25; AOAC, 1995 N° 984.13), Fibra insoluble en detergente neutro (aFDN_{MO}), en detergente ácido (FDA_{MO}) y lignina con ácido sulfúrico (LDA_{MO}), se informaron libres de cenizas, según Van Soest et al. (1991). Las diferencias entre aFDN_{MO} y FDA_{MO} y entre FDA_{MO} y LDA_{MO} en el análisis secuencial, se utilizaron para estimar los contenidos de hemicelulosa y celulosa, respectivamente. La energía bruta de los forrajes fue determinada en una bomba calorimétrica (AOAC, 1995). La composición química de los materiales utilizados es presentada en el Cuadro 3.1 y en el Cuadro 3.2.

3.3.6. Caracterización del licor ruminal y los residuos de la fermentación *in vitro*

El licor ruminal utilizado como inóculo fue caracterizado previo a la inoculación en cada período (3 períodos) por pH (peachímetro HI-9025, Hanna[®]), N amoniacal (**N-NH₃**, estabilizado con ácido sulfúrico 0,02 N, *i.e.* 0,5 ml de muestra + 0,5 ml de ácido) determinado con un kit de uremia (laboratorios Wiener[®], NY, EE.UU.). Los medios resultantes al finalizar las incubaciones se caracterizaron de igual forma. Luego de pasadas 24, 48 y/o 72 h de incubación (según ensayo), la fermentación fue interrumpida adicionando 2-3 gotas de una solución saturada de timol en cada botella, para luego ser filtrada en bolsas de filtración marca ANKOM[®] (#F57, ANKOM technology, Macedon, NY, EE.UU.). La digestibilidad verdadera *in vitro* de la MS y de la MO (**ivDMS** y **ivDMO**, % MS) fueron calculadas de después de tratar los residuos de las bolsas filtrantes con solución de detergente neutro según Van Soest et al. (1966). Además, se analizó la digestibilidad de la FDN (**DFDN**, % FDN) y la FDN digestible (**FDNd**, % MS) de acuerdo con los procedimientos recomendados por Goering y Van Soest (1970). El cociente entre el sustrato verdaderamente digerido *in vitro* (mg) y el volumen del gas producido *in vitro* (ml) fue expresado como FP.

Tomando alícuotas del residuo de incubación *in vitro*, se determinó N-NH₃, pH y la concentración de AGV en el residuo de incubación *in vitro* por cromatografía gaseosa. Se utilizó ácido ortofosfórico para la estabilización y purificación de las muestras para AGV (ácido al 25%; relación 1:5, ácido: muestra), y luego fueron centrifugadas por 10 minutos a 6000 × *g* (Friggens y otros, 1998). El cromatógrafo utilizado (Konik modelo HRGC 5000b) fue equipado con un detector ionizante de llama (FID) y una columna capilar Nukol (30 mt × 0,32 mm × 0,25 μm de espesor de capa, Perkin Elmer - Elite FFAP; Part. N°931-635-4). Se utilizó hidrógeno como gas carrier (2,4 ml H₂/min). Para generar las curvas de calibración se utilizó una mezcla estándar de AGV (Supelco, Cat. N°46975-U).

3.3.7. Análisis estadísticos

Los resultados de las variables *in vitro* fueron analizados según un diseño en bloques completos aleatorizados con un arreglo factorial (*i.e.* dos factores, tratamiento y sustrato), según los siguientes modelos:

Experimento 1:

$$Y_{ijkl} = \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha \times \gamma)_{ik} + \varepsilon_{ijkl}$$

donde, Y_{ijk} = variable en estudio; α_i = sustratos ($i=8$); β_j = bloque ($j=3$); γ_k = tratamiento ($k=2$); $(\alpha \times \gamma)_{ik}$ = interacción entre sustrato y tratamiento; ε_{ijkl} = error experimental ($l=3$).

Experimento 2:

$$Y_{ijkl} = \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha \times \gamma)_{ik} + \varepsilon_{ijkl}$$

donde, Y_{ijk} = variable en estudio; α_i = sustratos ($i=3$); β_j = bloque ($j=3$); γ_k = tratamiento ($k=3$); $(\alpha \times \gamma)_{ik}$ = interacción entre sustrato y tratamiento; ε_{ijkl} = error experimental ($l=3$). En los casos en que la interacción fue significativa se efectuó un

análisis mediante la opción “*Slice*” (SAS, 2002) por tratamiento, para evaluar el efecto del tratamiento en cada sustrato.

Los ensayos de ambos experimentos fueron repetidos en 3 semanas/períodos diferentes (respectivamente PI, PII y PIII) y asumidos como bloques experimentales dentro de cada modelo estadístico. La PGAN fue ajustada con el procedimiento NLIN de SAS (2002) al modelo no lineal propuesto por Ørskov y McDonald (1979). Una vez obtenidos los parámetros del modelo (Par A, Par B y Par c), éstos fueron analizados junto con la Fase Lag y las tasas de PG (1, 10 y 60 h en exp. 1 y 10 y 42 h en exp. 2), mediante ANVA.

Las medias de los tratamientos y sustratos fueron comparadas mediante el test de Tukey, utilizando el procedimiento GLM de SAS (2002) y las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando el nivel de probabilidad del error de Tipo I fuese menor al 5%, sin embargo se discutieron los resultados siempre y cuando el valor de $p < 0,10$.

Cuadro 3.1 Composición química (g/kg, salvo para EB, Mcal/kg) de los ocho forrajes recuperados después de lavarlos con agua destilada (Lav) o sin lavar (Or).

Sustrato	ID ¹	Trat	MS	MO	PB	aFDN _{MO}	FDA _{MO}	LDA _{MO}	Hem	Cel	EB
Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>)	ALF	Or	202	873	316	296	185	78	110	101	4,64
		Lav	209	943	342	380	239	68	141	171	-
Raigrás (<i>Lolium perenne</i>)	RG	Or	159	813	191	338	171	9	167	162	4,73
		Lav	131	903	283	651	275	53	376	222	-
<i>Urochloa brizanta</i>	UB	Or	217	880	116	574	286	25	288	261	4,48
		Lav	123	934	189	830	390	46	439	344	-
<i>Megathyrus maximus</i>	MM	Or	185	856	203	622	322	20	301	301	4,20
		Lav	165	901	185	786	402	60	384	343	-
<i>Paspalum dilatatum</i>	PD	Or	308	870	98	553	306	33	246	273	4,28
		Lav	143	896	171	692	370	122	323	248	-
<i>Cenchrus ciliaris</i>	CC	Or	215	852	193	553	262	26	291	236	4,33
		Lav	160	918	186	945	449	70	496	379	-
<i>Chloris gayana</i>	CG	Or	213	878	267	664	322	29	341	293	4,40
		Lav	173	929	238	781	363	56	418	307	-
<i>Milium coloratum</i>	MC	Or	223	872	218	580	257	26	323	231	4,59
		Lav	187	911	142	845	361	58	484	303	-

¹ID, identificación; Trat, Tratamiento; MS, Materia seca; MO, Materia orgánica; PB, Proteína bruta; aFDN_{MO}, Fibra insoluble en detergente neutro tratado con alfa-amilasa (libre de cenizas); FDA_{MO}, Fibra insoluble en detergente ácido (libre de cenizas), ADL_{MO}, Lignina tratada con ácido sulfúrico (libre de cenizas); Hem, Hemicelulosa; Cel, Celulosa; EB, Energía bruta.

Cuadro 3.2 Composición química (g/kg, salvo para EB, Mcal/kg) de los tres forrajes tal cual (Or) o recuperados después de lavarlos con solución de detergente neutro y molidos en fresco (FDNfr) o después lavarlos con SDN y secarlos en estufa (60°C, 4h, FDNse).

Sustrato	ID ¹	Tr	MS	MO	PB	EE	aFDN _{MO}	FDA _{MO}	LDA _{MO}	Hem	Cel	EB
<i>Lolium perenne</i>	RG	Or	150	825	191	23	338	171	9	167	162	4,73
		FDNfr	98	978	91	18	958	433	28	525	405	-
		FDNse	914	983	87	18	985	435	26	548	409	-
<i>Chloris gayana</i>	CG	Or	236	887	267	28	664	322	29	341	293	4,40
		FDNfr	177	964	157	3	873	386	33	487	353	-
		FDNse	936	967	148	2	895	396	32	499	364	-
<i>Milium coloratum</i>	MC	Or	276	877	218	53	580	257	26	323	231	4,59
		FDNfr	194	951	101	21	942	416	43	526	373	-
		FDNse	931	953	85	22	958	431	47	527	384	-

¹ID, identificación; Trat, Tratamiento; MS, Materia seca; MO, Materia orgánica; PB, Proteína bruta; aFDN_{MO}, Fibra insoluble en detergente neutro tratado con alfa-amilasa (libre de cenizas); FDA_{MO}, Fibra insoluble en detergente ácido (libre de cenizas), ADL_{MO}, Lignina tratada con ácido sulfúrico (libre de cenizas); Hem, Hemicelulosa; Cel, Celulosa; EB, Energía bruta.

3.4. Resultados

3.4.1. Experimento 1

3.4.1.1. *Compuestos solubles en agua*

Todos los materiales, en sus dos tratamientos (*i.e.* Or y Lav) fueron evaluados en fresco (123-308 g MS/kg MH, Cuadro 3.1). El lavado de los materiales, como era de esperar, concentraron las cantidades de aFDN_{MO} (296-664 y 380-945 g/kg); FDA_{MO} (171-322 y 239-449 g/kg) y LDA_{MO} (9-78 y 46-122 g/kg; Or y Lav respectivamente). Sin embargo, las concentraciones de proteína no presentaron un patrón definido; en MM, CC, MC y CG, por ejemplo, la PB disminuyó en los materiales lavados.

3.4.1.2. *Producción de metano*

Se encontraron diferencias entre los forrajes, al evaluar la PCH₄ en todas sus formas (*i.e.* afectada por la MS incubada (CH₄-MSi), MS digerida (CH₄-MSd), MO digerida (CH₄-MOd) y como la proporción de EB incubada, Ym). En general, ALF junto con MC y CG, fueron los que más CH₄ produjeron, mientras que PD y la UB resultaron los menos metanogénicos (Cuadro 3.3). Para el caso de la CH₄-MSi y el Ym, ALF, MC y CG fueron superiores a UB y PD ($p < 0,05$). En el caso de CH₄-MSd y CH₄-MOd, MC y CG se diferenciaron de UB y PD ($p < 0,05$), mientras que en los demás sustratos presentaron valores intermedios ($p > 0,05$). La eliminación de los compuestos solubles de los forrajes no generó ninguna modificación en la PCH₄ ($p > 0,05$, Cuadro 3.3).

Cuadro 3.3 Producción de metano (g/kg) afectado por MS incubada (CH₄-MSi) o digerida (CH₄-MSd), MO digerida (CH₄-MOd) o como la proporción de energía perdida como metano (Ym, mcal/mcal) de 8 forrajes lavados con agua o sin lavar (Original).

	CH ₄ -MSi	CH ₄ -MSd	CH ₄ -MOd	Ym
Sustratos¹				
ALF	10,3 _a	11,8 _{ab}	11,5 _{ab}	3,0 _a
MC	8,3 _{abc}	12,7 _a	12,5 _a	2,3 _{abc}
CG	9,3 _{ab}	12,4 _a	12,2 _a	2,6 _{ab}
PD	3,5 _e	7,7 _b	6,8 _c	1,1 _e
RG	7,6 _{abcd}	9,0 _{ab}	8,7 _{abc}	2,2 _{abcd}
UB	4,9 _{de}	7,6 _b	7,7 _{bc}	1,4 _{de}
CC	6,0 _{cde}	8,6 _{ab}	8,6 _{abc}	1,7 _{cde}
MM	6,8 _{bcd}	9,2 _{ab}	9,2 _{abc}	2,0 _{bcd}
EEM ²	1,42	2,33	2,17	0,41
Tratamientos				
Original	9,8	9,8	9,6	2,1
Lavado	9,9	9,9	9,7	2,0
EEM	1,26	2,07	1,93	0,37
Estadístico (valor F)³				
Sust (n=6)	12,7	3,8	4,5	12,4
Trat (n=24)	0,1	0,0	0,1	0,2
Sust×Trat (n=3)	0,8	2,0	1,4	0,7
Significancia⁴				
Sust	***	**	**	***
Trat	ns	ns	ns	ns
Sust×Trat	ns	ns	ns	ns

¹ALF, Alfalfa (*Medicago sativa*); MC, *Milium coloratum*; CG, *Chloris gayana*; PD, *Paspalum dilatatum*; RG, Raigrás (*Lolium perenne*); UB, *Urochloa brizanta*; CC, *Cenchrus ciliaris*; MM, *Megathyrus maximus*; ²EEM, error estándar de la media; ³Sust, Sustrato; Trat, Tratamiento; Sust×Trat, interacción entre sustrato y tratamiento; ⁴ns, no significativo (p > 0,10); **, p < 0,01; ***, p < 0,001; Comparaciones según Tukey, letras diferentes en cada columna para los sustratos indican p < 0,05.

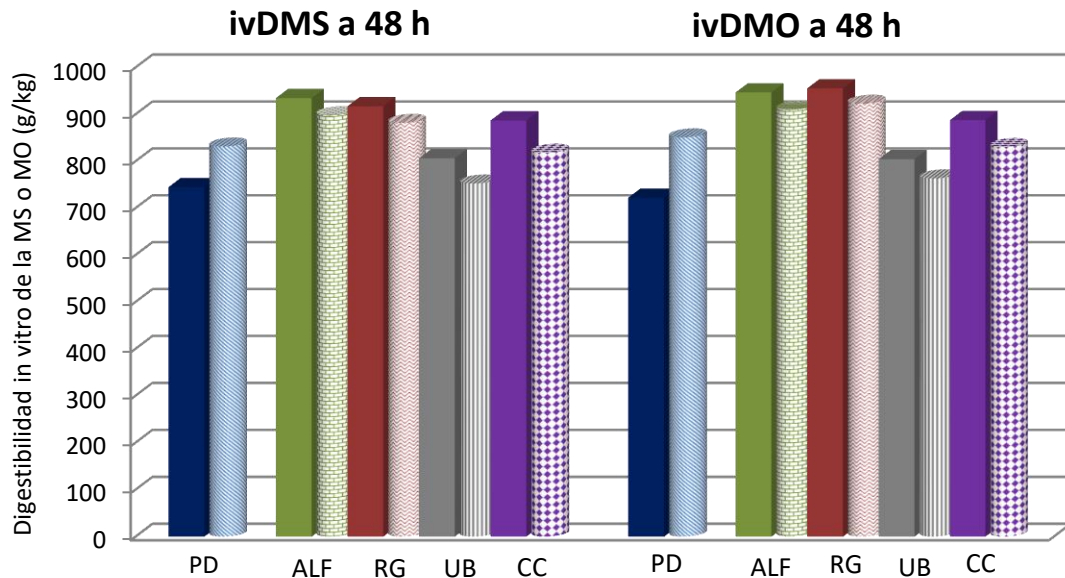


Figura 3.1 Digestibilidad *in vitro* de la materia seca (ivDMS, n=3) y materia orgánica (ivDMO, n=3) después de 48 h de fermentación para 5 sustratos (PD, *Paspalum dilatatum*, azul; ALF, Alfalfa (*Medicago sativa*, verde); RG, Raigrás (*Lolium perenne*, bordó); UB, *Urochloa brizanta*, gris; CC, *Cenchrus ciliaris*, violeta) evaluados tal cual (barras con colores enteros) y después de lavarlos con agua destilada (cilindros con trama). Interacción sustrato \times tratamiento, las diferencias entre los tratamientos para cada sustrato fueron significativas; $p < 0,05$.

3.4.1.3. *Digestibilidad in vitro de los forrajes*

Se evaluaron la ivDMS (g/kg MS), ivDMO (g/kg MS), así como también la DFND (g/kg FDN) y la FDNd (g FDN/kg MS); en base a los residuos de fermentación de botellas independientes para las 24, 48 y 72 h de incubación. Los mayores valores de ivDMS y ivDMO fueron para ALF y RG y los forrajes que peor se aprovecharon fueron PD y UB para todos los horarios analizados ($p < 0,05$, Cuadro 3.4). Por otro lado, se pudo detectar que la eliminación de los CSA generó una caída en la ivDMS a las 24 hs, situación que se mantuvo a las 48 h ($p < 0,05$). A las 72 h no se detectaron diferencias entre tratamientos, al igual que ocurrió con la ivDMO en los 3 horarios estudiados ($p > 0,05$). De todas formas a las 48 y 72 h se detectaron interacciones (Sustr \times Trat) para ivDMS y ivDMO, donde el lavado con agua generó una mejora en la digestibilidad de PD, a diferencia de ALF, RG, UB y CC donde Or siempre fueron mayores que los Lav ($p < 0,05$, Figura 3.1 y Figura 3.2).

Cuadro 3.4 Digestibilidad *in vitro* de la materia seca y materia orgánica (ivDMS y ivDMO, respectivamente) de ocho forrajes templados y tropicales lavados con agua destilada o sin lavar (Original) después de 24, 48 y 72 h de fermentación.

	ivDMS			ivDMO		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Sustratos						
ALF	887 _a	916 _a	931 _a	900 _a	928 _a	945 _a
MC	659 _{cd}	827 _b	851 _{cd}	662 _{cde}	842 _b	866 _{cd}
CG	749 _{bc}	838 _b	872 _{bc}	753 _{bc}	854 _b	891 _c
PD	591 _d	831 _b	821 _d	579 _e	840 _{bc}	845 _d
RG	851 _{ab}	899 _a	901 _{ab}	873 _{ab}	939 _a	940 _{ab}
UB	632 _{cd}	779 _c	811 _d	623 _{de}	800 _c	833 _d
CC	704 _{cd}	852 _b	892 _b	692 _{cde}	859 _b	902 _{bc}
MM	737 _{bc}	851 _b	875 _{bc}	732 _{cd}	861 _b	890 _c
EEM ²	57,3	15,8	18,9	59,3	22,3	19,5
Tratamientos						
Original	752	858	874	747	868	891
Lavado	701	841	864	707	862	887
EEM	51,0	14,1	16,8	52,7	19,7	17,0
Estadístico (valor F)³						
Sust (n=6)	15,46	28,99	21,38	17,60	30,68	22,87
Trat (n=24)	7,70	10,24	2,83	2,45	1,32	0,47
Sust×Trat (n=3)	2,20	8,25	3,31	2,37	6,28	3,96
Significancia⁴						
Sust	***	***	***	***	***	***
Trat	**	**	ns	†	ns	ns
Sust×Trat	†	***	*	†	**	**

¹ALF, Alfalfa (*Medicago sativa*); MC, *Milium coloratum*; CG, *Chloris gayana*; PD, *Paspalum dilatatum*; RG, Raigrás (*Lolium perenne*); UB, *Urochloa brizanta*; CC, *Cenchrus ciliaris*; MM, *Megathyrsus maximus*; ²EEM, error estándar de la media; ³Sust, Sustrato; Trat, Tratamiento; Sust×Trat, interacción entre sustrato y tratamiento; ⁴ns, no significativo ($p>0,10$); †, $p<0,10$, *, $p<0,05$; **, $p<0,01$; ***, $p<0,001$; Comparaciones según Tukey, letras diferentes en cada columna para los sustratos indican $p<0,05$.

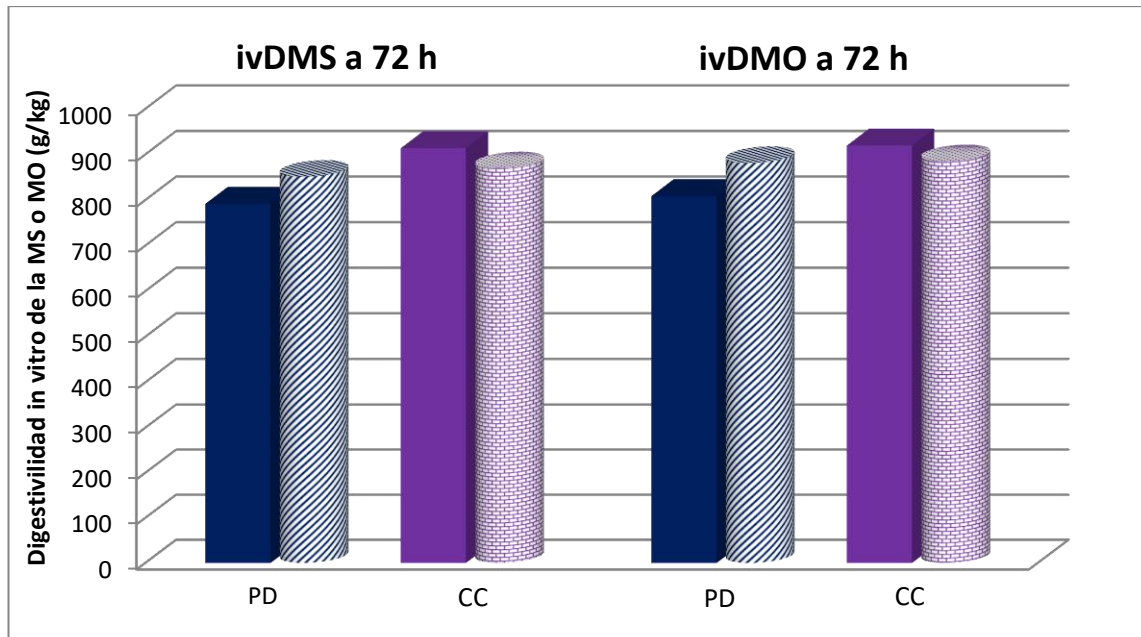


Figura 3.2 Digestibilidad *in vitro* de la materia seca (ivDMS, n=3) y de la materia orgánica (ivDMO, n=3) después de 72 h de fermentación para 2 sustratos (PD, *Paspalum dilatatum*, azul y CC, *Cenchrus ciliaris*, violeta) evaluados tal cual (barras con colores enteros) y después de lavarlos con agua destilada (cilindros con trama). Interacción sustrato \times tratamiento, las diferencias entre los tratamientos para cada sustrato fueron significativas; $p < 0,05$.

El análisis de la DFDN a las 24 h mostró que ALF y RG presentaron valores más altos que PD y UB ($p < 0,05$, Cuadro 3.5), mientras que a las 48 h, RG siguió entre los que presentaron mayores valores de DFDN y UB fue el que menor valor presentó ($p < 0,05$). A las 72 h, los forrajes con mayor DFDN (ALF, RG y CC) presentaron valores promedio de $88,5 \pm 2,83$ % FDN, en tanto que el PD y UB mostraron los peores valores del grupo (76,0 % FDN). Por otro lado, el lavado de los materiales influyó positivamente en la DFDN, comportamiento asociado a una interacción Sustr \times Trat en los 3 horarios de sacrificios evaluados (*i.e.* 24, 48 y 72 h). A las 24 h en PD, Lav presentó mayor valor que el Or (61,8 vs 20,8 % FDN, EEM= 9,21, $p < 0,05$), mientras que en los demás Sustr, no hubo diferencias entre Trat. A las 48 y 72 h, los tratamientos lavados de PD y MC presentaron mayores DFDN que los Or, en contraste con ALF (Figura 3.3; EEM= 4,00 y 3,56, para 48 y 72 h respectivamente, $p < 0,05$), mientras que en los demás Sustr no hubo diferencias entre Trat ($p > 0,05$).

El análisis de la FDNd mostró que CG y CC eran significativamente mayores que ALF y PD a las 24 h ($p < 0,05$; Cuadro 3.5) y más altas que ALF y RG después de 48 y 72 h de fermentación. Por otro lado, el lavado indujo aumentos de 59, 50 y 48 % en la FDNd para las 24, 48 y 72 h respectivamente. Esto se vio reflejado, en forma similar a como ocurrió con la DFDN de PD y MC, en la interacción significativa en los 3 horarios, donde la ausencia de los CSA generó un aumento en los valores de FDNd de todos los Sustr (EEM= 7,13, 2,12 y 1,89 para 24, 48 y 72 h, respectivamente, $p < 0,05$).

Cuadro 3.5 Digestibilidad de la fibra en detergente neutro (DFDN) y FDN digestible (FDNd) de ocho forrajes templados y tropicales lavados con agua destilada o sin lavar (Original) después de 24, 48 y 72 h de fermentación.

	DFDN (g/kg FDN)			FDNd (g FDN/kg MS)		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Sustratos¹						
ALF	728 _a	802 _b	879 _a	243 _c	269 _e	296 _g
MC	549 _{bc}	787 _b	816 _{bc}	395 _{ab}	565 _b	587 _c
CG	676 _{ab}	808 _b	858 _{ab}	490 _a	585 _{ab}	620 _b
PD	413 _c	755 _{bc}	735 _d	237 _c	477 _c	488 _e
RG	757 _a	883 _a	901 _a	378 _{ab}	437 _d	439 _f
UB	487 _c	705 _c	785 _{cd}	344 _{bc}	481 _c	540 _d
CC	616 _{ab}	823 _{ab}	876 _a	461 _a	617 _a	658 _a
MM	645 _{ab}	817 _b	855 _{ab}	455 _{ab}	576 _b	602 _{bc}
EEM ²	72,2	31,8	28,3	50,4	16,8	15,0
Tratamientos						
Original	576	778	821	290	402	426
Lavado	641	817	855	460	600	631
EEM	65,1	28,3	25,1	48,5	14,9	13,4
Estadístico (valor F)³						
Sust (n=6)	11,45	13,03	16,66	13,64	226,56	312,69
Trat (n=24)	7,48	14,16	13,41	87,98	1270,87	1769,77
Sust×Trat (n=3)	3,84	4,94	8,15	2,52	38,83	58,17
Significancia⁴						
Sust	***	***	***	***	***	***
Trat	*	***	**	***	***	***
Sust×Trat	** ⁵	**	***	*	***	***

¹ALF, Alfalfa (*Medicago sativa*); MC, *Milium coloratum*; CG, *Chloris gayana*; PD, *Paspalum dilatatum*; RG, Raigrás (*Lolium perenne*); UB, *Urochloa brizanta*; CC, *Cenchrus ciliaris*; MM, *Megathyrus maximus*; ²EEM, error estándar de la media; ³Sust, Sustrato; Trat, Tratamiento; Sust×Trat, interacción entre sustrato y tratamiento; ⁴*, p< 0,05; **, p< 0,01; ***, p< 0,001. ⁵DFDN, 24 h, PD Or= 208, Lav= 618 g/kg FDN, EEM=92,1, p< 0,05, los demás sustratos sin diferencias significativas. Comparaciones según Tukey, letras diferentes en cada columna para los sustratos indican p< 0,05.

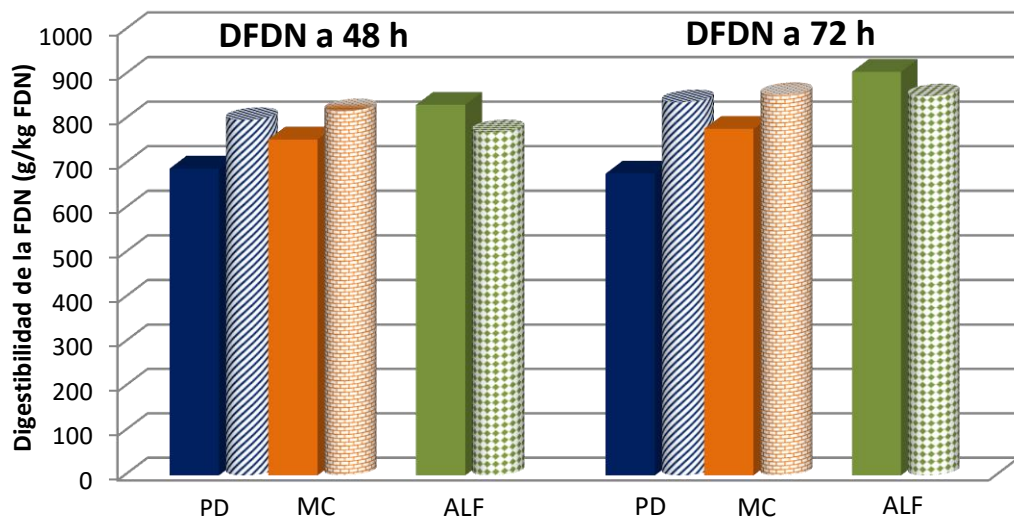


Figura 3.3 Digestibilidad de la fibra en detergente neutro (DFDN, % FDN, n=3) después de 48 y 72 h de fermentación para 3 sustratos (PD, *Paspalum dilatatum*, azul; MC, *Milium coloratum*, naranja y ALF, Alfalfa (*Medicago sativa*, verde)) evaluados tal cual (barras con colores enteros) y después de lavarlos con agua destilada (cilindros con trama). Interacción sustrato \times tratamiento, las diferencias entre los tratamientos para cada sustrato fueron significativas; $p < 0,05$.

3.4.1.4. *Producción de gas in vitro*

A las 24 h la PGAN (post corrección con blancos) fue mayor para ALF con respecto a PD, UB, CC y MM ($p < 0,05$ mientras que las demás gramíneas presentaron valores intermedios, $p > 0,05$, Figura 3.4). Sin embargo, a las 48 y 72 h se observó una interacción Sustr \times Trat explicada por los comportamientos disímiles en la PGAN de PD y CC debido a la presencia de CSA de estos sustratos (EEM= 30,2 y 30,6, para 48 y 72 h, respectivamente; $p < 0,05$, Figura 3.5).

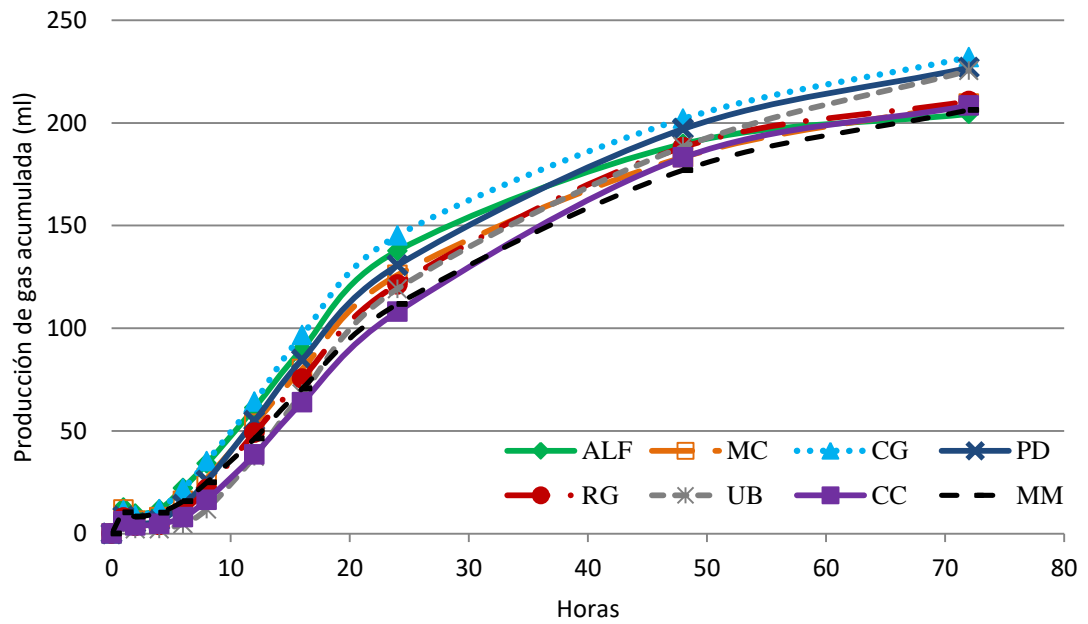


Figura 3.4 Producción de gas acumulada *in vitro* en función del tiempo de incubación para ocho forrajeras (ALF, Alfalfa (*Medicago sativa*); MC, *Milium coloratum*; CG, *Chloris gayana*; PD, *Paspalum dilatatum*; RG, Raigrás (*Lolium perenne*); UB, *Urochloa brizanta*; CC, *Cenchrus ciliaris*; MM, *Megathyrsus maximus*, n=6).

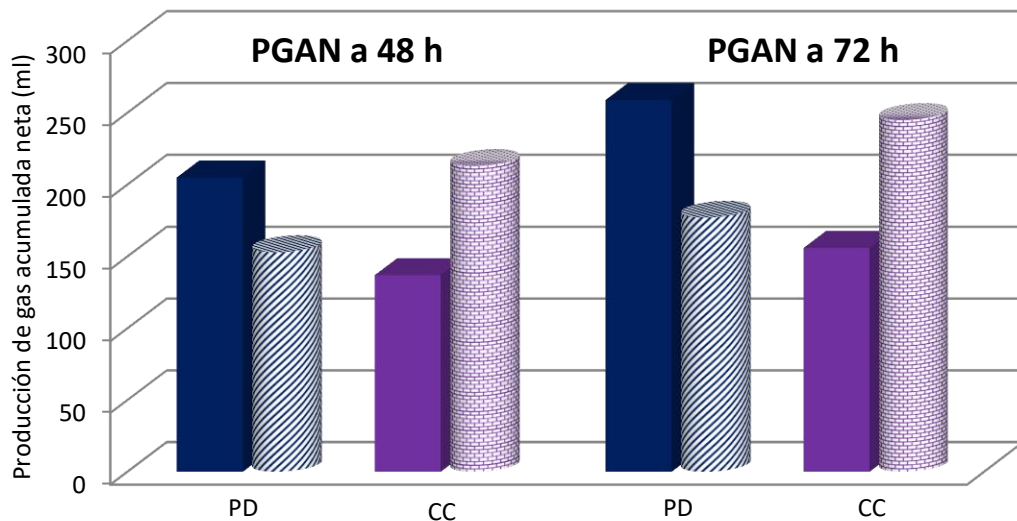


Figura 3.5 Producción de gas acumulada neta (post-corrección con blancos, PGAN, ml) después de 48 y 72 h de fermentación para 2 sustratos (PD, *Paspalum dilatatum*, azul y CC, *Cenchrus ciliaris*, violeta, n=3) evaluados tal cual (barras con colores enteros) y después de lavarlos con agua destilada (cilindros con trama). Interacción sustrato \times tratamiento, las diferencias entre los tratamientos para cada sustrato fueron significativas; $p < 0,05$.

El análisis de la Fase Lag (período inicial de la incubación durante el cual no hay fermentación detectable) mostró que ALF y RG fueron los que más rápido empezaron a fermentar (Cuadro 3.6), sin embargo una interacción Sutr \times Trat evidenció que mientras que RG y MC lavados (*i.e.* sin CSA) presentaron una fase lag mayor que el Or, el PD se comportó en forma contraria (Figura 3.6, EEM= 0,25, $p < 0,05$).

El análisis de las tasas horarias de PGAN, mostró una fuerte reducción en la variación entre réplicas y entre períodos a medida que transcurrió el tiempo de incubación (pasando desde más de 100 en la hora 1 a menos de 1 [ml de gas/h/g MS]² a la hora 60 de incubación), lo cual imposibilitó realizar un análisis de varianza convencional a la hora 1. En todos los casos se observó una notable reducción en la tasa horaria para la hora 3.

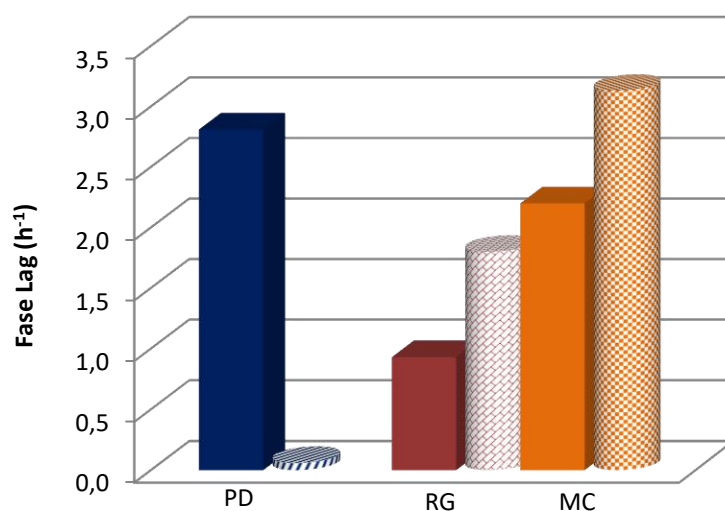


Figura 3.6 Fase Lag de fermentación (período inicial sin fermentación detectable, h⁻¹) para 3 sustratos (PD, *Paspalum dilatatum*, azul, RG, Raigrás (*Lolium perenne*, bordó) y MC, *Milium coloratum*, naranja, n=3) evaluados tal cual (barras con colores enteros) y después de lavarlos con agua destilada (cilindros con colores degradados). Interacción sustrato \times tratamiento, las diferencias entre los tratamientos para cada sustrato fueron significativas; $p < 0,05$.

En las primeras 14 horas al comparar los tratamientos se puso de manifiesto una menor PG en los materiales lavados para ALF, RG y MC (Figura 3.7), adicionalmente como ilustra el Cuadro 3.6, ALF, RG y CG mostraron mayores tasas de PGAN a la hora 10 ($p < 0,05$).

Las tasas horarias se redujeron en todas las especies entre de las 20 y las 60 h en forma consistente, tanto para los materiales Originales como Lavados. No obstante esto, en el Cuadro 3.6, se observa que MC, PD y UB fueron las especies que más gas produjeron a la hora 60 ($p < 0,05$) y que la exclusión de los CSA determinó una suba en la PG.

Cuadro 3.6 Fase Lag (h^{-1}) y tasas de producción de gas acumulada neta (post corrección con blancos) a la 10 y 60 h de ocho forrajes templados y tropicales lavados con agua destilada (Lav) o sin lavar (Original).

	Lag (h^{-1})	Tasas ($ml/g MS h^{-1}$)	
		T10	T60
Sustratos¹			
ALF	0,72 _b	13,3 _a	0,7 _d
MC	2,67 _a	7,4 _{bc}	1,5 _{ab}
CG	2,75 _a	11,0 _{ab}	1,2 _{bc}
PD	1,44 _b	5,0 _c	1,7 _a
RG	1,37 _b	13,8 _a	0,9 _{cd}
UB	2,87 _a	6,8 _{bc}	1,5 _{ab}
CC	2,70 _a	6,5 _c	1,2 _{abc}
MM	2,82 _a	8,2 _{bc}	1,3 _{abc}
EEM ²	0,48	2,12	0,20
Tratamientos			
Original	2,08	8,9	1,1
Lavado	2,25	9,1	1,3
EEM	0,42	1,90	0,18
Estadístico (valor F)³			
Sust (n=6)	15,61	11,93	12,36
Trat (n=24)	1,33	0,04	9,34
Sust×Trat (n=3)	6,03	1,17	1,25
Significancia⁴			
Sust	***	***	***
Trat	ns	ns	**
Sust×Trat	***	ns	ns

¹ALF, Alfalfa (*Medicago sativa*); MC, *Milium coloratum*; CG, *Chloris gayana*; PD, *Paspalum dilatatum*; RG, Raigrás (*Lolium perenne*); UB, *Urochloa brizanta*; CC, *Cenchrus ciliaris*; MM, *Megathyrus maximus*; ²EEM, error estándar de la media; ³ns[†], no significativo ($p > 0,05$); ³Sust, Sustrato; Trat, Tratamiento; Sust×Trat, interacción entre sustrato y tratamiento; ⁴**, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; Comparaciones según Tukey, letras diferentes en cada columna para los sustratos indican $p < 0,05$.

3.4.1.5. Caracterización del licor ruminal

El licor ruminal en los sistemas *in vitro* se caracterizó fundamentalmente para evaluar el mantenimiento de las condiciones ambiente del medio de cultivo (*e.g.* pH) y analizar la relación entre los sustratos experimentales y los productos de la fermentación (N-NH₃, AGV, BM, entre otros).

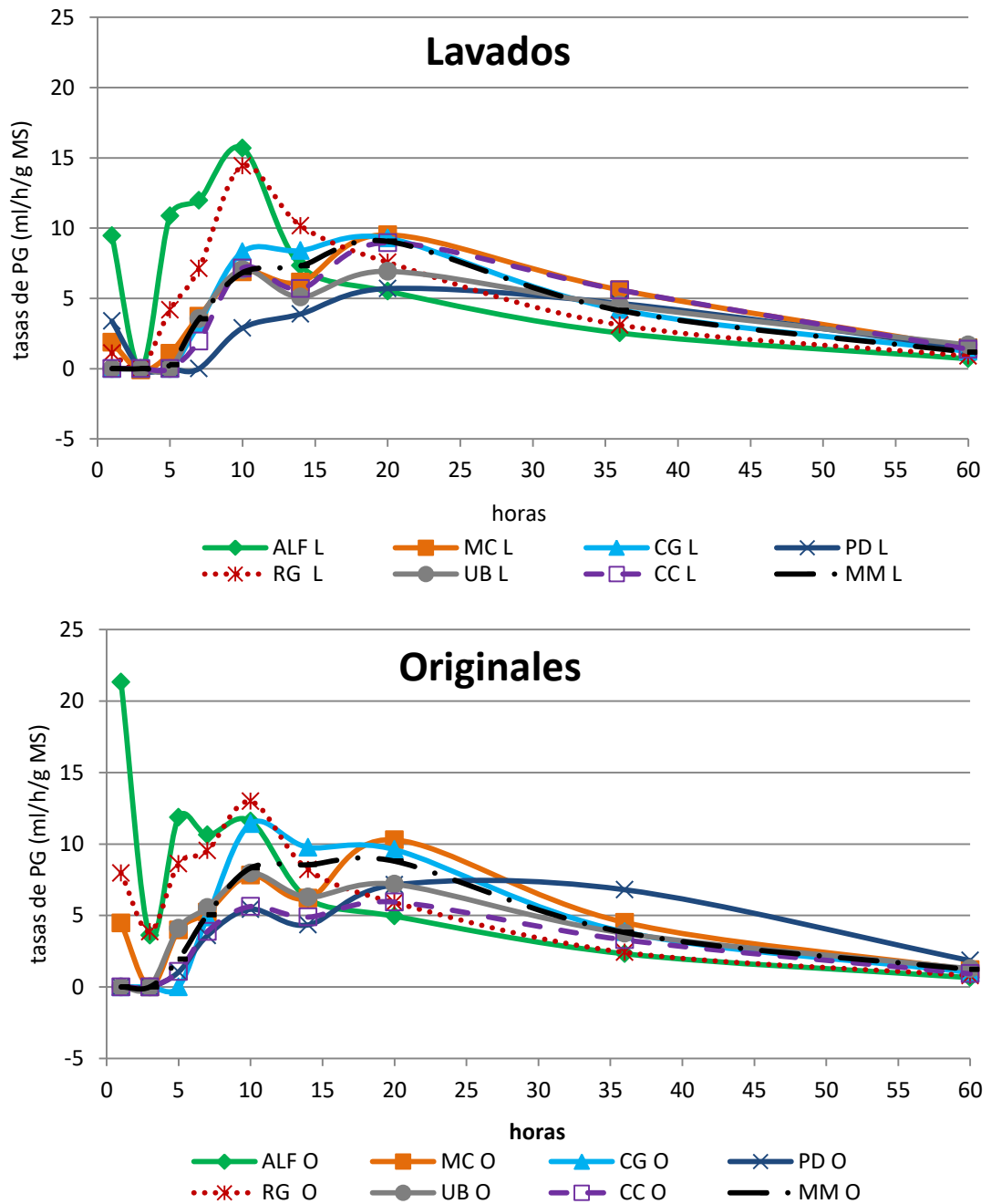


Figura 3.7 Tasas horarias de producción de gas acumulada neta (medianas) para distintas horas de incubación para ocho forrajeras (ALF, Alfalfa (*Medicago sativa*); MC, *Milium coloratum*; CG, *Chloris gayana*; PD, *Paspalum dilatatum*; RG, Raigrás (*Lolium perenne*); UB, *Urochloa brizanta*; CC, *Cenchrus ciliaris*; MM, *Megathyrsus maximus*) evaluadas tal cual (Originales, n=3) y después de lavarlas con agua (Lavados, n=3).

A las 24 h de incubación, la concentración de AGV totales (**AGVt**) de los materiales Or fue superior que la de los mismos materiales Lavados ($p < 0,05$, Cuadro 3.7), explicado por la diferencia observada en la concentración de ácido propiónico. ALF y RG produjeron mayores concentraciones de ácido butírico, valérico y las formas iso de ambos AGV, y PD fue el que menos produjo ($p < 0,05$). Asimismo, el PD presentó una relación entre ácido acético y propiónico (**Ac: Prop**) 34% superior al RG ($p < 0,05$).

A las 48 h de fermentación, en cambio, se observaron diferencias entre sustratos para todos los AGV, básicamente por las menores concentraciones encontradas en PD, aunque para las variables propiónico, valérico y AGVt, también estuvo entre los más bajos CG ($p < 0,05$, Cuadro 3.8). Por otro lado, CC fue el más alto en acético y propiónico ($p < 0,05$) y junto con MM fueron los que mayores concentraciones de AGVt presentaron. Por otro lado los materiales Or presentaron mayores concentraciones de acético, propiónico, valérico y AGVt ($p < 0,05$) con respecto a los Lavados.

Por último, cumplidas las 72 h de fermentación la tendencia se mantuvo en cuanto a los sustratos que menos AGV produjeron (PD y CG; Cuadro 3.9). Además presentaron los valores más bajos, ALF y MC (para propiónico) y CC (para iso-butírico y AGVt, $p < 0,05$). El RG, por su parte, fue el que mayores concentraciones presentó en el perfil completo ($p < 0,05$). En forma similar a lo ocurrido a las 24 y 48 h, los materiales Or presentaron mayores concentraciones de acético, propiónico y AGVt ($p < 0,05$) que los Lavados.

Cuadro 3.7 Producción de ácidos grasos volátiles (AGV, mMol/lit) después de 24 h de fermentación en de ocho forrajes templados y tropicales lavados con agua destilada o sin lavar (Original).

Perfil de AGV a las 24 h de fermentación ¹								
	Ac	Pr	isoBut	But	isoVal	Val	AGVt	Ac:Pr
Sustratos²								
ALF	28,7	8,8	0,5 _a	5,4 _{ab}	1,4 _a	1,0 _a	45,2	3,4 _{ab}
MC	24,9	10,3	0,3 _{ab}	5,5 _{ab}	1,3 _a	0,8 _{ab}	43,1	3,0 _{ab}
CG	33,3	9,2	0,2 _{ab}	5,2 _{ab}	1,2 _{ab}	1,0 _a	47,8	3,5 _{ab}
PD	20,8	5,3	0,1 _b	4,4 _b	0,5 _b	0,4 _b	38,2	4,1 _a
RG	35,8	12,6	0,4 _{ab}	7,2 _a	0,6 _{ab}	1,3 _a	59,1	2,7 _b
UB	24,4	8,8	0,2 _{ab}	6,0 _{ab}	0,8 _{ab}	0,8 _{ab}	51,3	3,4 _{ab}
CC	29,0	9,4	0,4 _{ab}	5,3 _{ab}	1,1 _{ab}	1,0 _a	47,0	3,2 _{ab}
MM	28,3	8,4	0,3 _{ab}	5,4 _{ab}	0,9 _{ab}	0,7 _{ab}	48,2	3,3 _{ab}
EEM ³	7,52	3,11	0,13	1,01	0,37	0,29	9,22	0,50
Tratamientos								
Original	30,1	10,2	0,3	5,7	0,9	0,9	52,6	3,2
Lavado	26,2	8,0	0,3	5,4	0,9	0,8	42,3	3,4
EEM	6,68	2,76	0,12	0,93	0,33	0,26	8,61	0,45
Estadístico (valor F)⁴								
Sust (n=6)	1,8	1,8	2,5	2,4	3,2	3,8	1,25	2,46
Trat (n=24)	2,4	4,5	0,7	1,3	0,04	0,2	8,85	1,27
Sust×Trat (n=3)	0,7	1,2	1,7	0,4	0,9	0,9	0,26	1,09
Significancia⁵								
Sust	ns	ns	*	*	*	**	ns	*
Trat	ns	*	ns	ns	ns	ns	*	ns
Sust×Trat	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

¹ Ac, ácido acético; Pr, propiónico; But, butírico; Val, valérico; isoBut e isoVal, formas iso; AGVt, AGV totales, Ac:Pr, relación molar entre acético y propiónico. ²ALF, Alfalfa (*Medicago sativa*); MC, *Milium coloratum*; CG, *Chloris gayana*; PD, *Paspalum dilatatum*; RG, Raigrás (*Lolium perenne*); UB, *Urochloa brizanta*; CC, *Cenchrus ciliaris*; MM, *Megathyrus maximus*; ³EEM, error estándar de la media; ³ns, no significativo ($p > 0,05$); ⁴Sust, Sustrato; Trat, Tratamiento; Sust×Trat, interacción entre sustrato y tratamiento; ⁵ *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; Comparaciones según Tukey, letras diferentes en cada columna para los sustratos indican $p < 0,05$.

Cuadro 3.8 Producción de ácidos grasos volátiles (AGV, mMol/l) después de 48 h de fermentación en de ocho forrajes templados y tropicales lavados con agua destilada o sin lavar (Original).

Perfil de AGV a las 48 h de fermentación ¹								
	Ac	Pr	isoBut	But	isoVal	Val	AGVt	Ac:Pr
Sustratos²								
ALF	38,0 _{ab}	12,6 _{abc}	0,9 _a	6,0 _{ab}	2,3 _a	1,5 _a	61,3 _{abc}	3,0
MC	44,9 _{ab}	16,3 _{ab}	0,5 _{ab}	7,8 _a	2,1 _a	1,2 _{abc}	70,9 _{ab}	2,9
CG	33,2 _{ab}	8,1 _c	0,6 _{ab}	4,4 _{ab}	1,4 _{ab}	0,7 _{bc}	40,6 _c	3,2
PD	30,4 _b	10,0 _b	0,3 _b	3,9 _b	1,1 _b	0,6 _c	46,4 _{bc}	3,0
RG	44,6 _{ab}	13,1 _{abc}	0,8 _a	4,7 _{ab}	1,7 _{ab}	1,0 _{abc}	63,4 _{abc}	3,0
UB	36,6 _{ab}	12,1 _{abc}	0,7 _{ab}	5,5 _{ab}	1,6 _{ab}	1,0 _{abc}	57,4 _{abc}	3,1
CC	47,4 _a	17,7 _a	0,5 _{ab}	7,4 _a	2,0 _{ab}	1,1 _{abc}	73,7 _a	2,7
MM	45,1 _{ab}	15,6 _{ab}	0,8 _a	7,1 _a	2,0 _{ab}	1,3 _{ab}	74,6 _a	2,9
EEM ³	8,64	3,12	0,24	1,59	0,47	0,28	12,50	0,45
Tratamientos								
Original	44,1	14,8	0,7	6,4	1,9	1,2	68,5	2,9
Lavado	35,9	11,6	0,6	5,3	1,6	0,9	53,6	3,0
EEM	7,68	2,77	0,22	1,41	0,41	0,25	11,28	0,39
Estadístico (valor F)⁴								
Sust (n=6)	2,68	4,95	3,48	3,93	3,81	4,30	4,66	0,42
Trat (n=24)	8,71	9,95	0,37	3,86	2,74	6,63	14,46	0,38
Sust×Trat (n=3)	1,01	1,78	1,77	1,22	1,39	2,53	1,12	0,74
Significancia⁵								
Sust	*	***	**	**	**	**	**	ns
Trat	**	**	ns	†	ns	*	***	ns
Sust×Trat	ns	ns	ns	ns	ns	†	ns	ns

¹Ac, ácido acético; Pr, propiónico; But, butírico; Val, valérico; isoBut e isoVal, formas iso; AGVt, AGV totales, Ac:Pr, relación molar entre acético y propiónico. ²ALF, Alfalfa (*Medicago sativa*); MC, *Milium coloratum*; CG, *Chloris gayana*; PD, *Paspalum dilatatum*; RG, Raigrás (*Lolium perenne*); UB, *Urochloa brizanta*; CC, *Cenchrus ciliaris*; MM, *Megathyrus maximus*; ³EEM, error estándar de la media; ⁴Sust, Sustrato; Trat, Tratamiento; Sust×Trat, interacción entre sustrato y tratamiento; ⁵ns, no significativo (p > 0,05), †, p < 0,10; *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001; Comparaciones según Tukey, letras diferentes en cada columna para los sustratos indican p < 0,05.

Cuadro 3.9 Producción de ácidos grasos volátiles (AGV, mMol/l) después de 72 h de fermentación en de ocho forrajes templados y tropicales lavados con agua destilada o sin lavar (Original).

Perfil de AGV a las 72 h de fermentación ¹								
	Ac	Pr	isoBut	But	isoVal	Val	AGVt	Ac:Pr
Sustratos²								
ALF	38,8 _{ab}	14,2 _b	1,0 _{ab}	5,5 _{abc}	2,9 _a	1,7 _a	62,6 _{bc}	3,0 _{ab}
MC	39,2 _{ab}	15,1 _b	1,1 _{ab}	5,6 _{abc}	2,2 _{ab}	1,2 _{ab}	60,1 _{bc}	2,6 _b
CG	35,7 _b	11,5 _b	0,5 _b	3,5 _c	1,8 _{ab}	0,8 _b	47,8 _c	3,4 _a
PD	37,9 _b	17,9 _{ab}	0,6 _b	4,9 _{bc}	1,4 _b	0,8 _b	66,4 _{bc}	2,4 _b
RG	53,3 _a	22,1 _a	1,3 _a	7,4 _a	2,8 _a	1,6 _a	89,4 _a	2,5 _b
UB	42,6 _{ab}	15,4 _{ab}	0,9 _{ab}	6,0 _{abc}	1,8 _{ab}	1,1 _{ab}	69,7 _{abc}	2,7 _{ab}
CC	41,7 _{ab}	17,7 _{ab}	0,6 _b	5,4 _{abc}	2,4 _{ab}	1,2 _{ab}	64,7 _{bc}	2,6 _b
MM	48,2 _{ab}	16,8 _{ab}	1,1 _{ab}	6,9 _{ab}	2,1 _{ab}	1,1 _{ab}	75,6 _{ab}	2,9 _{ab}
EEM ³	7,11	3,15	0,32	1,18	0,72	0,35	11,46	0,31
Tratamientos								
Original	45,7	17,6	0,9	5,7	2,1	1,2	71,1	2,7
Lavado	38,7	15,0	0,9	5,6	2,2	1,2	62,9	2,8
EEM	6,55	2,91	0,29	1,09	0,66	0,31	9,26	0,29
Estadístico (valor F)⁴								
Sust (n=6)	3,14	4,55	4,23	4,60	2,77	4,35	5,98	3,75
Trat (n=24)	9,54	6,84	0,26	0,01	0,07	0,17	5,97	0,23
Sust×Trat (n=3)	1,53	1,83	1,00	0,86	0,24	0,44	1,74	2,41
Significancia⁵								
Sust	*	**	**	**	*	**	**	*
Trat	**	*	ns	ns	ns	ns	*	ns
Sust×Trat	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	†

¹Ac, ácido acético; Pr, propiónico; But, butírico; Val, valérico; isoBut e isoVal, formas iso; AGVt, AGV totales, Ac:Pr, relación molar entre acético y propiónico. ²ALF, Alfalfa (*Medicago sativa*); MC, *Milium coloratum*; CG, *Chloris gayana*; PD, *Paspalum dilatatum*; RG, Raigrás (*Lolium perenne*); UB, *Urochloa brizanta*; CC, *Cenchrus ciliaris*; MM, *Megathyrus maximus*; ³EEM, error estándar de la media; ⁴Sust, Sustrato; Trat, Tratamiento; Sust×Trat, interacción entre sustrato y tratamiento; ⁵ns, no significativo (p > 0,05), †, p < 0,10; *, p < 0,05; **, p < 0,01; Comparaciones según Tukey, letras diferentes en cada columna para los sustratos indican p < 0,05.

Al evaluar el pH dentro de las botellas de fermentación, se vieron diferencias entre Sust, sin embargo todos los pH estuvieron por encima del valor neutro, y el rango de pH (en los tres horarios de sacrificio) fue muy pequeño (*i.e.* 7,21 a 7,40, EEM= 0,045, Cuadro 3.10). En referencia a los Trat, los Lav presentaron menores valores de

pH ($p < 0,05$) que los Originales, pero siempre con una diferencia mínima entre materiales (*i.e.* 0,8, 0,3 y 0,6 puntos porcentuales a las 24, 48 y 72 h, respectivamente).

Cuadro 3.10 pH y concentraciones de N proveniente del amoníaco (N-NH₃, mg/lit) en el licor ruminal después de 24, 48 o 72 h de fermentación de ocho forrajes templados y tropicales lavados con agua destilada o sin lavar (Original).

	pH			N-NH ₃		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Sustratos¹						
ALF	7,32 _{ab}	7,40 _a	7,39 _a	1,87 _{ab}	2,29	2,26
MC	7,29 _{bc}	7,36 _{ab}	7,32 _{ab}	1,50 _{bc}	1,99	1,96
CG	7,24 _{cd}	7,30 _{abc}	7,27 _{bc}	1,15 _c	1,72	1,88
PD	7,37 _a	7,34 _{ab}	7,28 _{bc}	1,28 _c	1,94	1,84
RG	7,22 _d	7,23 _c	7,21 _c	2,00 _a	2,31	2,42
UB	7,32 _{ab}	7,28 _{bc}	7,26 _{bc}	1,38 _c	1,89	2,10
CC	7,28 _{bcd}	7,30 _{bc}	7,26 _{bc}	1,45 _{bc}	1,88	1,92
MM	7,22 _d	7,28 _{bc}	7,26 _{bc}	1,53 _{bc}	1,87	2,12
EEM ²	0,030	0,045	0,043	0,186	0,314	0,345
Tratamientos						
Original	7,25	7,30	7,26	1,59	2,01	2,17
Lavado	7,31	7,32	7,30	1,45	1,97	1,95
EEM	0,027	0,041	0,042	0,175	0,296	0,329
Estadístico (valor F)³						
Sust (n= 6)	15,30	6,79	7,86	10,50	2,00	1,51
Trat (n= 24)	35,95	3,48	12,27	4,69	0,15	3,60
Sust×Trat (n=3)	4,14	1,13	2,05	0,20	0,70	0,59
Significancia⁴						
Sust	***	***	***	***	ns	ns
Trat	***	*	**	*	ns	†
Sust×Trat	**	ns	†	ns	ns	ns

¹ALF, Alfalfa (*Medicago sativa*); MC, *Milium coloratum*; CG, *Chloris gayana*; PD, *Paspalum dilatatum*; RG, Raigrás (*Lolium perenne*); UB, *Urochloa brizanta*; CC, *Cenchrus ciliaris*; MM, *Megathyrsus maximus*; ²EEM, error estándar de la media; ³Sust, Sustrato; Trat, Tratamiento; Sust×Trat, interacción entre sustrato y tratamiento; ⁴ns, no significativo ($p > 0,05$); †, $p < 0,10$; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; Comparaciones según Tukey, letras diferentes en cada columna para los sustratos indican $p < 0,05$.

Por su parte, a las 24 h RG tuvo mayores concentraciones de N-NH₃ que el resto ($p < 0,05$, Cuadro 3.10), salvo para ALF que tuvo valores intermedios. Además, los materiales Originales presentaron mayores valores de N-NH₃ que los Lavados ($p < 0,05$). A las 48 y 72 h sin embargo, no se encontraron diferencias en los factores analizados ($p > 0,05$).

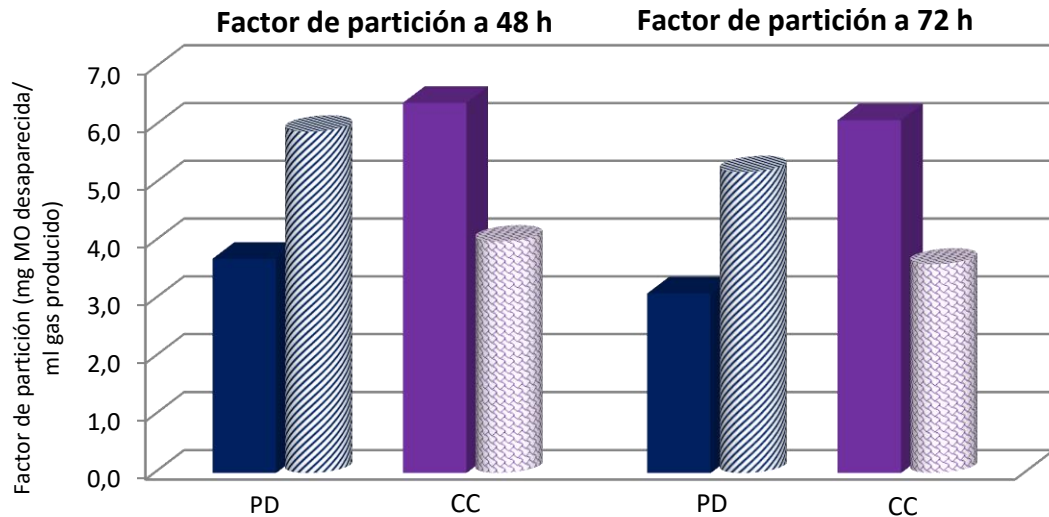


Figura 3.8 Factor de partición (mg de MO desaparecida/ ml de gas producido) después de 48 y 72 h de fermentación para 2 sustratos (PD, *Paspalum dilatatum*, azul y CC, *Cenchrus ciliaris*, violeta, $n=3$) evaluados tal cual (barras con colores enteros) y después de lavarlos con agua destilada (cilindros con trama). Interacción sustrato \times tratamiento, las diferencias entre los tratamientos para cada sustrato fueron significativas; $p < 0,05$.

Además se evaluó el factor de partición (FP, mg de MO desaparecida/ ml de gas total producido; Blümmel et al., 1997b) que manifiesta cuanta energía fermentada es destinada a producir proteína microbiana, esto quiere decir que cuanto más alto el FP más eficientemente se utilizó esa energía para la producción de biomasa microbiana (BM, mg/100 mg de MO fermentada). A las 24 h, el CC fue el que más BM produjo, mientras que MC y CG los que menos produjeron ($p < 0,05$, Cuadro 3.11), sin embargo solo hubo una tendencia en el FP ($p < 0,10$). Por otro lado, la exclusión de CSA significó una mejora en la producción de BM con respecto a los materiales originales.

A las 48 y 72 h se observó interacción Sust \times Trat (Cuadro 3.11), explicada por los comportamientos de PD y CC, tanto para BM como para el FP (Figura 3.8), ya que en PD la exclusión de CSA significó una mejora en la eficiencia de síntesis de BM, mientras que en CC pasó lo contrario.

Cuadro 3.11 Producción de biomasa microbiana (BM, mg/100 mg de MO desaparecida) y eficiencia de síntesis de BM expresado como factor de partición (FP, mg de MO real digerida/ml de gas producido) de ocho forrajes templados y tropicales lavados con agua destilada o sin lavar (Original).

	BM (mg/100 mg MOd)			FP (mg/ml)		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Sustratos¹						
ALF	55,2 _{ab}	44,8	44,8	5,5	4,4	4,1 _b
MC	52,1 _b	35,5	36,5	5,4	3,9	3,9 _b
CG	49,1 _b	46,1	41,4	4,9	3,9	4,2 _b
PD	53,0 _{ab}	44,8	37,8	5,1	4,8	3,9 _b
RG	56,2 _{ab}	41,9	38,7	5,9	4,3	4,1 _b
UB	61,2 _{ab}	46,7	43,5	6,5	4,7	3,9 _b
CC	68,9 _a	51,0	44,4	6,8	5,2	5,1 _a
MM	61,1 _{ab}	49,0	38,1	6,4	4,8	4,0 _b
EEM ²	6,36	7,50	7,23	0,92	0,61	0,38
Tratamientos						
Original	53,8	41,2	40,5	5,7	4,5	4,3
Lavado	60,3	48,7	40,8	5,9	4,5	3,9
EEM	5,65	6,66	6,81	0,82	0,64	0,34
Estadístico (valor F)³						
Sust(n=6)	4,02	2,03	0,93	2,31	2,02	5,94
Trat(n=24)	8,37	9,68	0,02	0,49	0,00	8,28
Sust×Trat(n=3)	1,37	6,43	4,28	1,85	3,14	12,01
Significancia⁴						
Sust	**	†	ns	†	†	**
Trat	**	**	ns	ns	ns	**
Sust×Trat	ns	***	**	ns	*	***

¹ALF, Alfalfa (*Medicago sativa*); MC, *Milium coloratum*; CG, *Chloris gayana*; PD, *Paspalum dilatatum*; RG, Raigrás (*Lolium perenne*); UB, *Urochloa brizanta*; CC, *Cenchrus ciliaris*; MM, *Megathyrus maximus*; ²EEM, error estándar de la media; ³Sust, Sustrato; Trat, Tratamiento; Sust×Trat, interacción entre sustrato y tratamiento; ⁴ns, no significativo ($p > 0,05$); †, $p < 0,10$; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; Comparaciones según Tukey, letras diferentes en cada columna para los sustratos indican $p < 0,05$.

3.4.2. Experimento 2

3.4.2.1. *Compuestos solubles en detergente neutro*

Los 3 sustratos, como en el exp. 1, fueron molidos en fresco con hielo seco, una alícuota del material original (*i.e.* Or) fue lavado para generar las PCP, de las cuales una alícuota fue evaluada en fresco y otra secada en estufa a 60°C, generando los tratamientos FDNfr y FDNse, respectivamente. El lavado con SDN provocó una disminución en la PB tanto en las gramíneas C4, como en el RG aunque en menor proporción (Cuadro 3.2). Como era de esperar, las PCP concentraron la MO, aFDN_{MO}, la FDA_{MO} (aunque muy poco en CG) a expensas de la PB y el EE.

3.4.2.2. *Producción de metano*

En el caso de las emisiones de CH₄ producidas en 24 h, se encontraron interacciones Sustr × Trat, explicadas en el caso de CH₄-MSi y Ym por las diferencias en MC entre el Or y FDNfr ($p < 0,05$, Cuadro 3.12), mientras que en RG y CG todos los tratamientos se comportaron igual, dentro de cada sustrato. En cambio, cuando se afectó la PCH₄ por la digestibilidad de la MS y MO, el efecto de los lavados resultó significativo sólo para CG, donde las PCP (*i.e.* FDNfr y FDNse) produjeron más del doble de CH₄ que el material Original ($p < 0,05$), mientras que en MC y RG, para estas variables, los tratamientos se comportaron de forma similar. Al analizar las emisiones después de 48 h de fermentación CG produjo más CH₄ que RG cuando la producción fue afectada por la digestibilidad (Figura 3.9).

Cuadro 3.12 Producción de metano (g/kg) afectado por MS incubada (CH₄-MSi) o digerida (CH₄-MSd), MO digerida (CH₄-MOd) o como la proporción de energía perdida como metano (Ym, mcal/mcal) de 3 forrajes sin lavar (Original) o lavados con solución de detergente neutro analizados en fresco (FDNfr) o después de secados (FDNse).

	CH ₄ -MSi		CH ₄ -MSd		CH ₄ -MOd		Ym	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
Sustratos × Tratamiento¹								
<i>Chloris gayana</i>								
Original	5,6 _{ab}	13,8	6,9 _b	15,5	7,0 _b	15,4	2,1 _{ab}	4,2
FDNfr	8,5 _a	12,4	15,6 _a	15,3	13,3 _a	15,1	2,5 _a	3,7
FDNse	5,8 _{ab}	12,7	10,7 _{ab}	17,3	10,6 _{ab}	17,1	1,7 _{ab}	3,8
<i>Milium coloratum</i>								
Original	8,0 _a	12,1	10,2 _{ab}	14,0	10,3 _{ab}	14,0	2,3 _a	3,5
FDNfr	3,2 _b	11,6	5,4 _b	14,8	5,4 _b	14,5	0,9 _b	3,4
FDNse	5,5 _{ab}	8,6	8,9 _{ab}	10,7	8,7 _{ab}	10,6	1,6 _{ab}	2,5
<i>Raigrás</i>								
Original	6,4 _{ab}	11,0	7,3 _b	11,9	7,1 _{ab}	11,5	1,8 _{ab}	3,1
FDNfr	6,7 _{ab}	11,1	9,6 _{ab}	12,3	9,3 _{ab}	11,9	1,8 _{ab}	3,1
FDNse	5,3 _{ab}	11,0	8,1 _{ab}	12,2	7,9 _{ab}	11,7	1,8 _{ab}	3,1
EEM ²	1,86	2,62	2,96	3,34	2,51	3,25	0,50	0,77
Estadístico (valor F)³								
Sust (n=6)	1,04	2,45	3,56	4,43	3,06	5,32	2,81	4,37
Trat (n=6)	1,22	0,96	1,51	0,15	0,80	0,16	1,44	0,97
Sust×Trat (n=3)	5,18	0,67	5,22	0,93	5,19	0,95	4,20	0,66
Significancia⁴								
Sust	ns	ns	†	* ⁴	†	*	†	*
Trat	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Sust×Trat ⁵	**	ns	**	ns	**	ns	*	ns

¹*Chloris gayana* (CG); *Milium coloratum* (MC); Raigrás (RG, *Lolium perenne*). ²EEM, error estándar de la media. ³Sust, Sustrato; Trat, Tratamiento; Sust×Trat, interacción entre sustrato y tratamiento; ⁴ns, no significativo (p>0,05); †, p< 0,10; *, p< 0,05; **, p< 0,01; Comparaciones según Tukey, letras diferentes en cada columna para los sustratos indican p<0,05. ⁵CH₄-MSd 48 h, RG= 12,1, CG= 16,0 g/kg MS, EEM= 2,50 y CH₄-MOd 48 h, RG= 11,7, CG= 15,9 g/kg MO, EEM= 2,44; p< 0,05.

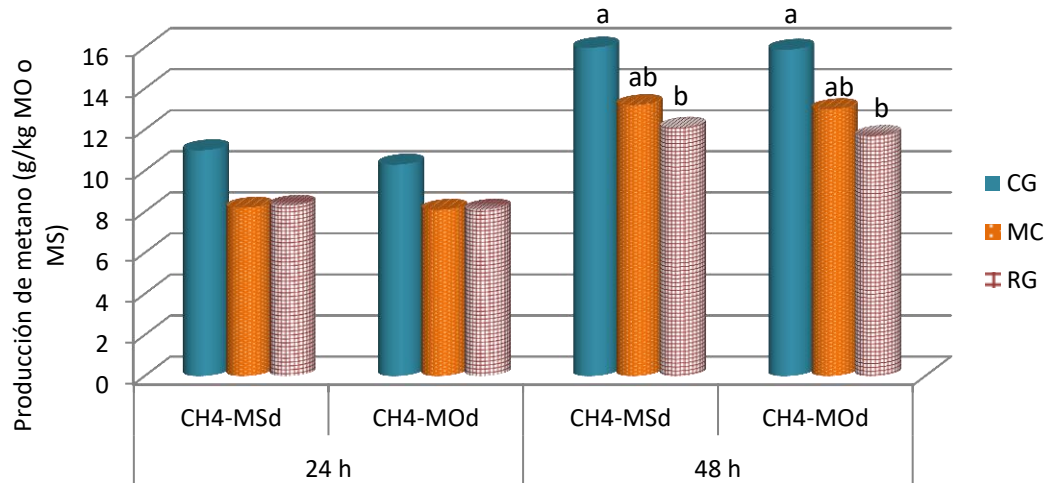


Figura 3.9 Producción de metano (g/kg) afectado por MS digerida (CH4-MSd, n=6) y MO digerida (CH4-MOd, n=6) de 3 forrajes (CG, *Chloris gayana*, celeste entero; MC, *Milium coloratum*, naranja, puntillado y RG, Raigrás (*Lolium perenne*, bordó con cuadrículas) después de 24 o 48 h de incubación. Letras diferentes en cada grupo de barras indican $p < 0,05$.

3.4.2.3. Digestibilidad *in vitro* de los forrajes

Al evaluar el efecto de los CSDN sobre el aprovechamiento de los forrajes en estudio, se observó una interacción Sust \times Trat en todas las variables analizadas para las 24 y 48 h, salvo para la ivDMO a las 48 h, donde RG presentó mayores valores que los C4 (931 y 830 g/kg MS, respectivamente, EEM= 17,0, $p < 0,05$) mientras que el Or fue superior a los Lavados (898 y 846 g/kg MS, respectivamente, EEM= 17,0, $p < 0,05$). La ivDMS y ivDMO se comportaron de forma similar, la interacción fue debida a que en el caso del RG no hubo diferencias entre Trat, mientras que para CG y para MC, los Or presentaron mayores valores que los FDN ($p < 0,05$, Cuadro 3.13); sin embargo no hubo diferencias entre PCP (FDNfr y FDNSE, $p > 0,05$).

Con respecto a la digestibilidad de la fibra, también hubo interacción en los dos horarios de fermentación estudiados (*i.e.* 24 y 48 h), dado que no hubo diferencias entre tratamientos de lavado para CG ni para MC ($p > 0,05$, Cuadro 3.13), mientras que en RG a las 48 h se evidenció un aumento en la DFDN en FDNfr comparado con el material original ($p < 0,05$).

Cuadro 3.13 Digestibilidad in vitro de la materia seca y materia orgánica (ivDMS y ivDMO, respectivamente) y digestibilidad de la fibra en detergente neutro (DFDN, % FDN) de 3 forrajes sin lavar (Original) o lavados con solución de detergente neutro analizados en fresco (FDNfr) o después de secados (FDNse).

	ivDMS		ivDMO		DFDN	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
Sustratos × Tratamiento¹						
<i>Chloris gayana</i>						
Original	80,7 _a	88,1 _a	79,8 _{ab}	87,9	69,4 _{bcd}	81,8 _{cd}
FDNfr	63,8 _b	80,7 _{bc}	64,6 _c	81,9	57,9 _{de}	78,6 _{de}
FDNse	53,3 _b	78,1 _c	53,9 _c	79,3	45,3 _e	73,9 _e
<i>Milium coloratum</i>						
Original	78,2 _a	86,1 _{ab}	77,3 _b	86,3	60,8 _{cd}	76,4 _{de}
FDNfr	58,3 _b	78,5 _c	58,8 _c	80,1	56,3 _{de}	78,9 _{cde}
FDNse	61,9 _b	80,4 _{bc}	63,2 _c	82,4	60,9 _{cd}	81,3 _{cd}
<i>Raigrás</i>						
Original	88,3 _a	91,4 _a	91,2 _a	95,1	73,9 _{abc}	85,7 _{bc}
FDNfr	82,6 _a	90,6 _a	85,8 _{ab}	92,8	85,2 _a	92,5 _a
FDNse	80,1 _a	89,5 _a	82,9 _{ab}	91,3	82,2 _{ab}	90,9 _{ab}
EEM ²	4,61	2,85	4,81	2,57	5,91	2,71
Estadístico (valor F)³						
Sust (n=6)	58,62	39,69	71,81	68,16	55,56	68,71
Trat (n=6)	47,93	16,83	37,87	17,74	2,51	1,76
Sust×Trat (n=3)	6,20	3,18	5,30	1,95	9,48	8,64
Significancia⁴						
Sust	***	***	***	*** ⁵	***	***
Trat	***	***	***	*** ⁶	ns	ns
Sust×Trat	**	*	**	ns	**	***

¹*Chloris gayana* (CG); *Milium coloratum* (MC); Raigrás (RG, *Lolium perenne*). ²EEM, error estándar de la media. ³Sust, Sustrato; Trat, Tratamiento; Sust×Trat, interacción entre sustrato y tratamiento; ⁴ns, no significativo (p> 0,05); *, p< 0,05; **, p< 0,01; ***, p< 0,001. ⁵ivDMO 48 h, RG= 931, promedio CG+MC= 830 g/kg MS; EEM= 17,0; p< 0,05. ⁶ivDMO 48 h, Or= 898, promedio FDNfr+FDNse= 846 g/kg MS; EEM= 17,0; p< 0,05. Comparaciones según Tukey, letras diferentes en cada columna para los sustratos indican p<0,05.

3.4.2.4. *Producción de gas in vitro*

A las 24 h de fermentación, RG produjo un 47 % más gas que CG ($p < 0,05$, Cuadro 3.14), y el tratamiento de secado disminuyó casi un 40 % la PGAN, comparándolo con FDNfr y Or ($p < 0,05$). Empero, a las 48 h de fermentación, los tres Sust, así como los tres Trat, no presentaron diferencias ($p > 0,05$).

Los Sust no presentaron diferencias en la fase Lag ($p > 0,05$), mientras que la fracción FDNse tardó más del doble de tiempo en comenzar la fermentación, con respecto a los tratamientos en fresco, y esta tendencia siguió hasta por lo menos la hora 10, aunque aquí también se encontraron diferencias entre Sust (RG duplicó la PG, comparado con CG y MC). Sin embargo, tal como se visualizó en el exp. 1, la exclusión de los CSDN, aumentó la fermentación tardía (tasa de PG a la hora 42, $p > 0,05$).

3.4.2.5. *Caracterización del licor ruminal*

El análisis del licor ruminal luego de 24 y 48 h de fermentación mostró que el pH de las botellas con RG fue superior al registrado para el resto de los forrajes C4 ($p < 0,05$, Cuadro 3.15), y también se observó que los materiales originales generaron ambientes más ácidos que los de las PCP ($p < 0,05$). Con respecto al N-NH₃, si bien a las 24 h no hubo diferencias entre sustratos, después de 48 h de fermentación, CG y RG presentaron mayores valores que MC ($p < 0,05$). Además, Or presentó mayores valores de N-NH₃ que las PCP ($p < 0,05$).

El análisis del FP (mg MO digerida/ ml gas producido) sólo mostro diferencias entre Trat a las 24 h. En este caso, el secado de las PCP aumentó el FP comparando con Or y FDNfr ($p < 0,05$). El FP a las 48 h y la BM a las 24 y 48 h no presentaron diferencias entre Sust, ni entre Trat ($p > 0,05$).

Cuadro 3.14 Producción de gas acumulada neta (PGAN, post corrección de blancos, ml), fase Lag (h^{-1}) y tasas de PGAN a las 10 y 42 h (T10 y T42, ml/h), de 3 forrajes sin lavar (Original) o lavados con solución de detergente neutro analizados en fresco (FDNfr) o después de secados (FDNse).

	PGAN		Lag	T10	T42
	24 h	48 h			
Sustratos¹					
<i>C. gayana</i>	95,4 _b	168,1	2,8	4,8 _b	2,5
<i>M. Coloratum</i>	104,7 _{ab}	185,8	3,0	3,6 _b	2,4
Raigrás	139,9 _a	211,4	1,8	8,5 _a	1,7
EEM ²	27,55	37,25	0,92	1,91	0,61
Tratamientos					
Original	129,8 _a	175,5	1,2 _b	7,8 _a	1,4 _b
FDNfr	131,9 _a	207,9	2,1 _b	6,8 _a	2,3 _a
FDNse	78,2 _b	181,9	4,4 _a	2,3 _b	2,9 _a
EEM	27,55	34,48	0,92	1,91	0,61
Estadístico (valor F)³					
Sust (n=6)	4,35	2,79	3,08	10,68	3,14
Trat (n=6)	7,31	1,86	19,19	14,10	8,61
Sust×Trat (n=3)	0,99	0,44	0,35	2,47	0,43
Significancia⁴					
Sust	*	†	†	**	†
Trat	**	ns	***	***	**
Sust×Trat	ns	ns	ns	†	ns

¹*Chloris gayana* (CG); *Milium coloratum* (MC.); Raigrás (RG, *Lolium perenne*). ²EEM, error estándar de la media. ³Sust, Sustrato; Trat, Tratamiento; Sust×Trat, interacción entre sustrato y tratamiento; ⁴ns, no significativo ($p > 0,05$); †, $p < 0,1$; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; Comparaciones según Tukey, letras diferentes en cada columna para los sustratos indican $p < 0,05$.

Cuadro 3.15 Caracterización del licor ruminal por medio del pH, N proveniente del amoníaco (N-NH₃, mg/lit), producción de biomasa microbiana (BM, mg MO real desaparecida) y eficiencia de síntesis de BM, expresada como factor de partición (FP, mg MO real desaparecida/ml de gas producido) en un sistema *in vitro* de 3 forrajes sin lavar (Original) o lavados con solución de detergente neutro analizados en fresco (FDNfr) o después de secados (FDNse).

	pH		N-NH ₃		FP		BM	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
Sustratos¹								
<i>C. gayana</i>	7,20 _b	7,18 _b	63,5	86,3 _a	7,21	4,69	63,8	51,6
<i>M. Coloratum</i>	7,18 _b	7,22 _{ab}	63,6	74,2 _b	6,56	4,27	63,2	50,5
Raigrás	7,27 _a	7,23 _a	67,1	85,1 _a	5,93	4,26	58,0	44,7
EEM ²	0,042	0,033	3,58	5,50	2,09	0,67	8,45	10,86
Tratamientos								
Original	7,12 _b	7,13 _b	72,2 _a	99,4 _a	5,63 _b	4,38	60,1	49,3
FDNfr	7,24 _a	7,25 _a	61,8 _b	73,8 _b	5,48 _b	4,34	57,1	43,4
FDNse	7,30 _a	7,28 _a	60,2 _b	72,4 _b	8,58 _a	4,49	67,7	54,1
EEM	0,042	0,033	3,58	5,50	1,94	0,62	7,82	10,86
Estadístico (valor F)³								
Sust (n=6)	6,45	5,79	1,95	8,87	0,72	0,96	1,12	0,79
Trat (n=6)	28,60	34,15	20,00	45,89	4,84	0,08	3,03	1,72
Sust×Trat (n=3)	0,12	2,59	1,15	2,39	0,14	0,93	0,21	0,21
Significancia⁴								
Sust	**	*	ns	**	ns	ns	ns	ns
Trat	***	***	***	***	*	ns	†	ns
Sust×Trat	ns	†	ns	†	ns	ns	ns	ns

¹*Chloris gayana* (CG); *Milium coloratum* (MC); Raigrás (RG, *Lolium perenne*). ²EEM, error estándar de la media; ³Sust, Sustrato; Trat, Tratamiento; Sust×Trat, interacción entre sustrato y tratamiento; ⁴ns, no significativo (p > 0,05); †, p < 0,1; *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001; Comparaciones según Tukey, letras diferentes en cada columna para los sustratos indican p < 0,05.

En el caso del perfil de AGV no se observaron interacciones Sust \times Trat para ninguno de los horarios y tampoco diferencias entre los forrajes a las 24 h de fermentación ($p < 0,05$, Cuadro 3.16). Sin embargo, los materiales Or presentaron mayores concentraciones de ácido acético, propiónico, butírico, valérico y de AGVt (entre 30 y 40 % más, $p < 0,05$) en comparación con las de PCP, sin hallarse diferencias entre FDNfr y FDNse. En cambio, al analizar la relación Ac: Prop, CG presentó mayores valores ($p < 0,05$) que lo otros dos Sust y la fracción FDNse presentó mayores valores que la fracción Or ($p < 0,05$), mientras que FDNfr presentó valores intermedios.

Cuadro 3.16 Perfil de ácidos grasos volátiles (AGV) después de 24 h de fermentación *in vitro* de 3 forrajes sin lavar (Original) o lavados con solución de detergente neutro analizados en fresco (FDNfr) o después de secados (FDNse).

Perfil de AGV a las 24 h de fermentación ¹						
	Ac	Pr	But	Val	AGV t	Ac:Pr
Sustratos²						
<i>C. gayana</i>	48,3	14,6	6,0	1,09	70,0	3,6 _a
<i>M. Coloratum</i>	46,5	16,1	6,3	0,98	69,9	3,0 _b
Raigrás	44,9	14,8	6,9	1,19	67,8	3,1 _b
EEM ³	4,53	1,37	0,68	0,24	6,46	0,27
Tratamientos						
Original	60,6 _a	21,1 _a	8,0 _a	1,5 _a	91,2 _a	2,9 _b
FDNfr	39,6 _b	12,7 _b	5,5 _b	0,9 _b	58,8 _b	3,2 _{ab}
FDNse	36,5 _b	11,8 _b	5,8 _b	0,8 _b	57,9 _b	3,6 _a
EEM	4,53	1,37	0,68	0,24	6,46	0,27
Estadístico (valor F)⁴						
Sust (n=6)	0,85	2,08	2,75	1,16	0,22	6,97
Trat (n=6)	42,99	83,77	23,96	16,09	51,78	8,95
Sust \times Trat (n=3)	0,57	0,52	0,05	1,09	0,48	0,80
Significancia⁵						
Sust	ns	ns	†	ns	ns	**
Trat	***	***	***	***	***	**
Sust \times Trat	ns	ns	ns	ns	ns	ns

¹Ac, ácido acético; Pr, propiónico; But, butírico; Val, valérico; AGVt, AGV totales, Ac:Pr, relación molar entre acético y propiónico; ²*Chloris gayana* (CG); *Milium coloratum* (MC); Raigrás (RG, *Lolium perenne*). ³EEM, error estándar de la media; ⁴Sust, Sustrato; Trat, Tratamiento; Sust \times Trat, interacción entre sustrato y tratamiento; ⁵ns, no significativo ($p > 0,05$); †, $p < 0,1$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; Comparaciones según Tukey, letras diferentes en cada columna para los sustratos indican $p < 0,05$.

Cuadro 3.17 Perfil de ácidos grasos volátiles (AGV) después de 48 h de fermentación *in vitro* de 3 forrajes sin lavar (Original) o lavados con solución de detergente neutro analizados en fresco (FDNfr) o después de secados (FDNse).

Perfil de AGV a las 48 h de fermentación¹						
	Ac	Pr	But	Val	AGV t	Ac:Pr
Sustratos²						
<i>C. gayana</i>	66,1 _a	19,8 _{ab}	8,7	1,8 _a	96,4 _a	3,5 _a
<i>M. Coloratum</i>	57,0 _b	20,9 _a	7,3	1,5 _b	86,7 _{ab}	2,8 _b
Raigrás	52,3 _b	18,0 _b	8,2	1,5 _b	80,0 _b	3,1 _b
EEM ³	4,67	1,56	1,03	0,16	6,80	0,28
Tratamientos						
Original	77,3 _a	27,9 _a	10,7 _a	2,2 _a	118,1 _a	2,8 _b
FDNfr	51,6 _b	15,6 _b	6,3 _b	1,3 _b	74,8 _b	3,4 _a
FDNse	46,5 _b	15,2 _b	7,1 _b	1,3 _b	70,1 _b	3,2 _a
EEM	4,67	1,56	1,03	0,16	6,80	0,28
Estadístico (valor F)⁴						
Sust (n=6)	13,72	5,41	2,66	6,52	8,78	10,84
Trat (n=6)	75,38	128,62	29,70	62,38	90,72	7,71
Sust×Trat (n=3)	0,61	0,77	0,37	1,85	0,52	2,20
Significancia⁵						
Sust	***	*	ns	**	**	**
Trat	***	***	***	***	***	**
Sust×Trat	ns	ns	ns	ns	ns	ns

¹Ac, ácido acético; Pr, propiónico; But, butírico; Val, valérico; AGVt, AGV totales, Ac:Pr, relación molar entre acético y propiónico. ²*Chloris gayana* (CG); *Milium coloratum* (MC); Raigrás (RG, *Lolium perenne*). ³EEM, error estándar de la media; ⁴Sust, Sustrato; Trat, Tratamiento; Sust×Trat, interacción entre sustrato y tratamiento; ⁵ns, no significativo ($p > 0,05$); *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; Comparaciones según Tukey, letras diferentes en cada columna para los sustratos indican $p < 0,05$.

Mientras que a las 48 h, CG presentó mayores valores de acético, valérico, AGVt y mayor relación Ac: Prop ($p < 0,05$, Cuadro 3.17), MC tuvo mayores concentraciones de propiónico ($p < 0,05$). Por otro lado, los materiales Or presentaron mayores concentraciones del perfil completo de AGV, AGVt y menor relación Ac: Prop, sin encontrar diferencias entre PCP ($p > 0,05$).

3.5. Discusión

El principal propósito de este trabajo fue analizar el rol de los componentes solubles en agua y de las paredes celulares insolubles en detergente neutro sobre la eficiencia de digestión ruminal y la PCH₄ asociada. Aspectos que han sido solo parcialmente cubiertos por la bibliografía especializada.

3.5.1. Calidad nutricional de los forrajes tropicales y templados

Los resultados de digestión *in vitro* mostraron que ALF y RG fueron los materiales más digestibles, lo que se constató a través de la ivDMS, ivDMO y PGA, particularmente durante las primeras 24 h. Por su parte, las especies C4 mostraron valores de digestibilidad relativamente altos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los valores aquí reportados son análogos a la digestibilidad verdadera de la MS antes que la digestibilidad aparente (resultado de digestión *in vitro* por Tilley y Terry, 1963) que supera a la estimación de digestibilidad aparente en *c.a.* 130 g/kg MS (Van Soest et al., 1966).

Estudios anteriores han reportado digestibilidades de la MS menores al 70% en CC, MM y *Penisetum purpureum* (*in vitro*; Singh et al., 2014), menores al 60% en *Brachiaria dictyoneura* (*in vivo*, en corderos; Hess et al., 2004) o inclusive menores al 50% en *Cynodon dactylon* (Pasto Bermuda) y *Paspalum notatum* (Pasto Bahía) en incubadores Daisy II (Ankom) (Krueger et al., 2008). En esta tesis los forrajes C4 presentaron concentraciones proteicas con una media de 183 g/kg MS (rango= 98 - 267 g/kg MS, Cuadro 3.1 y Cuadro 3.2) que, aún siendo menor que la de ALF y RG, fueron mayores a las reportadas en el meta-análisis de Archimède et al. (2011, gramíneas C4, PB= 101 g/kg MS). Los forrajes aquí estudiados presentaron una concentración de aFDN_{MO} de 598 g/kg MS (rango= 553 - 664 g/kg MS, menor a lo reportado por Archimède et al., 2011 para gramíneas C4, FDN= 646 g/kg MS) y una concentración de FDA_{MO} de 293 g/kg MS (rango= 257 - 322 g/kg MS). En correspondencia con lo anterior, los valores de asLDA_{MO} de las megatérmicas fue de 27 g/kg MS (rango= 20 - 33 g/kg MS, dentro de lo esperado). Esta composición química podría explicar (al menos en parte) el comportamiento fermentativo de los Or (*i.e.* sin ningún tipo de lavado).

Además, hay que considerar, que los sustratos utilizados en este capítulo correspondieron a láminas de plantas en estado vegetativo durante su primer ciclo de crecimiento y adicionalmente, es importante resaltar, que fueron molidas e incubadas en fresco (a excepción del tratamiento en seco del exp. 2).

Para conocer la digestibilidad *in vitro* de los forrajes normalmente se incuban sustratos por 48 o 72 h (o incluso más horas), en los sistemas comúnmente llamados de “punto final” (Tilley y Terry, 1963). Estos sistemas simulan una digestión ruminal “controlada”, aunque en el animal, pasadas las 24 – 36 h, el alimento fibroso es reducido a un tamaño tal que puede pasar por el orificio retículo omasal y de esta manera abandona el rumen, sobre todo para el caso de forrajes frescos, con poco grado de lignificación (Van Soest, 1994). Es por este motivo, que en este capítulo se evaluó la digestibilidad verdadera *in vitro* de la MS y MO (ivDMS, ivDMO) y digestibilidad de la

fibra (DFDN y FDNd) en distintos horarios: a 24 h para evaluar el comportamiento análogo al que tendría dentro de un rumen y hasta las 48 o 72 h para llegar a un potencial de degradación teórico, para evaluar la cinética, ajustando la PGAN a un modelo no lineal (Ørskov y McDonald, 1979, $PGAN = A + B \times (1 - \exp^{-c \times tiempo})$). Si bien la implementación de un modelo no lineal en la PGAN habría aportado datos de gran interés para interpretar la cinética de fermentación de los Sust, muchas de las curvas de PGAN no se ajustaron al modelo durante el análisis estadístico, generando errores.

El parámetro A, por su lado, que representa la MS rápidamente degradable y estaría asociada, en parte, con la PG generada por los CS, resultó en datos negativos, en todos los sustratos de ambos experimentos, que refleja la presencia de una fase Lag al inicio de la fermentación. La mayoría de las gramíneas C4 presentaron fases Lag mayores a 2 h (*i.e.* CG, UB, CC y MM). Por su parte ALF y RG mostraron tasas instantáneas de PG durante las primeras horas superiores a las de los forrajes C4, manifestando la mayor disponibilidad de compuestos rápidamente degradables en rumen.

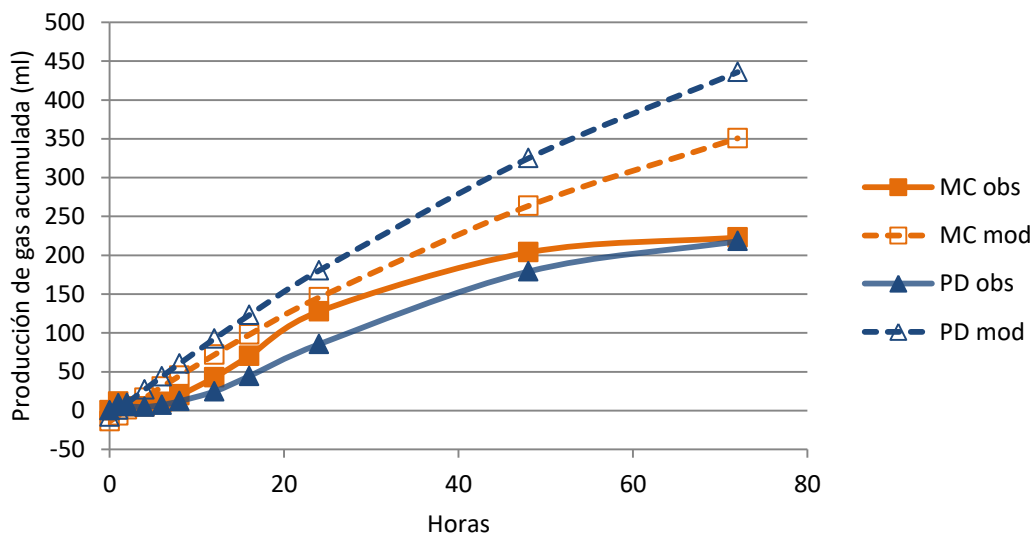


Figura 3.10 Producción de gas acumulada observada (líneas y marcadores enteros, n=6) y estimada a través del modelo de Orskov ($PGA = A + B \times (1 - \exp^{-c \times t})$, líneas punteadas, marcadores sin relleno, n=6), de *Millium coloratum* (MC, naranja, cuadrados) y *Paspalum dilatatum* (PD, azul, triángulos).

Asimismo, el parámetro B, que refleja el gas producido por el sustrato potencialmente degradado, en ciertos Sust (*i.e.* MC y PD) fue más del doble que la PGA observada. Estos valores estimados (Par A y B) no tuvieron relación con la fermentación ruminal real, debido fundamentalmente a que las PGA de la mayoría de las gramíneas C4 no llegaron, aún después de 72 h, a la meseta que requiere el modelo para estimar con exactitud la PGA (Figura 3.10). Esto se evidencia sobre todo en MC, PD y CC, donde de acuerdo a las predicciones de los modelos la PGA continúa aún pasadas 150 h, lo que no se corresponde con lo esperado como probable consecuencia de que los tiempos de incubación resultaron breves para estas especies (Barahona Rosales, 1999).

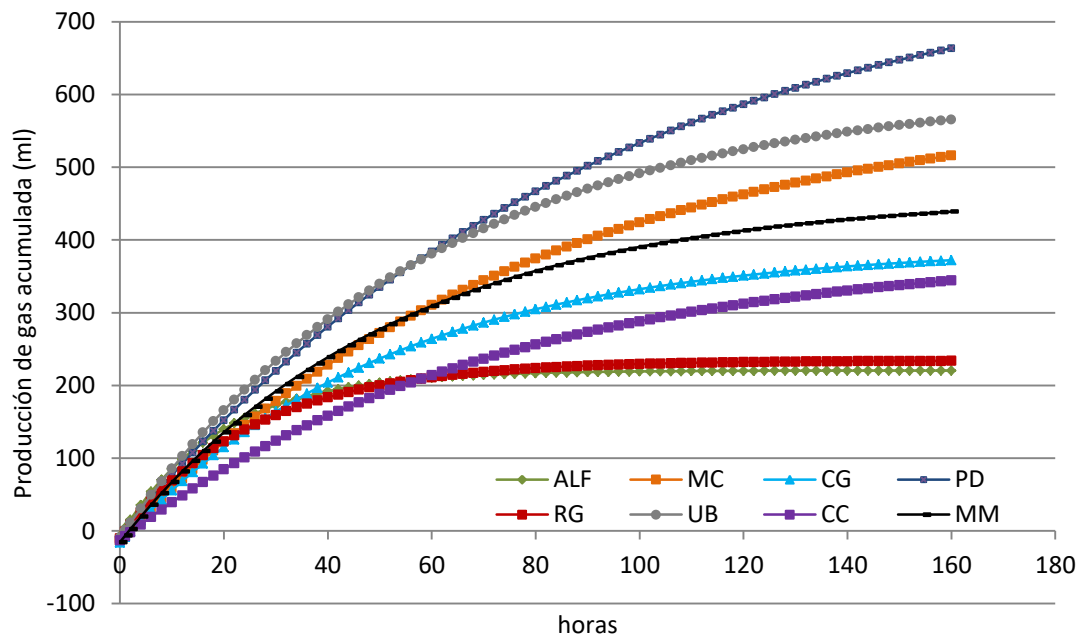


Figura 3.11 Producción de gas acumulada estimada a través del modelo de Orskov y McDonald (1979; $PGA = A + B \times (1 - \exp(-c \times t))$) de ocho forrajeras; ALF, Alfalfa (*Medicago sativa*); MC, *Milium coloratum*; CG, *Chloris gayana*; PD, *Paspalum dilatatum*; RG, Raigrás (*Lolium perenne*); UB, *Urochloa brizanta*; CC, *Cenchrus ciliaris*; MM, *Megathyrus maximus*, n=3).

Por el contrario, ALF y RG evidenciaron un cese en la fermentación pasadas las 48 h (Figura 3.11). Las tasas de B, por otro lado (*i.e.* Par c), fueron similares a las reportadas en otros trabajos evaluando Sust similares (Arroquy et al., 2014; González Ronquillo et al., 1998), pero debido a la falta de correspondencia entre el resto de los Par y los resultados observados se decidió no continuar con el análisis de los Par modelados. Consecuentemente se juzgó conveniente analizar la PG a través de otras variables (*i.e.* tasas horarias de PGAN en diferentes horarios, fase Lag).

3.5.2. Efecto de las fracciones solubles e insolubles en agua y en detergente neutro sobre la capacidad fermentativa y digestibilidad de las forrajeras tropicales y templadas

Los forrajes lavados con agua (exp. 1) presentaron menores ivDMS que los materiales Or, y en concordancia con esto, las fracciones insolubles en agua del RG y del MC presentaron mayores fases Lag que los materiales Originales. Este comportamiento podría deberse a la eliminación de los compuestos solubles producto del lavado, lo cual es coherente con la menor tasa horaria de PG para RG y MC en las primeras horas de fermentación. Sin embargo, para las otras especies C4, si bien se observaron reducciones en ivDMS asociadas al lavado, no se modificaron ni las fases Lag ni las tasas horarias de PG; quizá debido a que el lavado podría generar modificaciones en la estructura del forraje tal como lo señalara Stefanon et al. (1996).

De forma similar, en el exp. 2, el material insoluble en SDN (*i.e.* Lavado), presentó menores ivDMS y ivDMO solo en las forrajeras C4 (*i.e.* CG y MC), no detectándose diferencias para RG (no obstante, es de destacar que la diferencia numérica entre los materiales Or y las PCP fue importante, 883 y 813 g / kg MS, respectivamente), lo que puso en evidencia la excelente calidad de la pared celular de las láminas de esta gramínea.

La fase Lag, normalmente asociada a la demora necesaria para iniciar el ataque microbiano, como fue comentado anteriormente, fue significativa para casi todos los materiales, mostrando una dispersión entre las distintas especies. Este comportamiento ha sido previamente reportado, *e.g.* en CC, CG, MM y UB (3,5 a 4,0 h, Arroquy et al., 2014), en CC con diferentes intervalos de cortes (2,6 h, González Ronquillo et al., 1998) o llegando a valores muy por encima de la media para Angleton (*Dichanthium aristatum*) y MM (8,6 y 14,1 h, Molina Botero et al., 2013), lo cual está dentro de lo esperado, en correspondencia con la cantidad y calidad de los carbohidratos no estructurales típicamente presentes en estos forrajes.

El PD, por el contrario, fue el único material que prácticamente no presentó fase Lag en el residuo Lavado con agua, diferenciándose de la fracción Or, que tardó más de 2,5 h en empezar a fermentar (Figura 3.6). Este comportamiento resultó llamativo, dado que la fase Lag se redujo al eliminar los CSA. Por otro lado, el análisis de las tasas instantáneas de la PG (Figura 3.7) permitió identificar una primera fase para los materiales Or y Lavados de aproximadamente 5 h de prácticamente nula PG, salvo durante las primeras dos horas del material Lavado, donde se registró PG, como probable reflejo de la existencia de compuestos fermentables. En adición, la DFDN a las 24 h del material Lavado superó notablemente al material Or (618 y 208 g/kg FDN, respectivamente; Cuadro 3.5).

En correspondencia con estas observaciones de las primeras 24 h de fermentación, luego de 48, e incluso de 72 h de incubación, el residuo lavado del PD (exp. 1) superó en digestibilidad al material Or (ivDMS y ivDMO, Figuras 3.1 y 3.2), explicado fundamentalmente por el incremento en DFDN (aumentos del 197, 29 y 33 %, para 24, 48 y 72 h, respectivamente; Figura 3.3). Un comportamiento similar, aunque de menor magnitud, fue observado en DFDN para las 48 y 72 h para MC.

Adicionalmente, la exclusión de los CSA (*i.e.* materiales Lavados) en PD produjo menos gas que el Or (Figura 3.12). Este comportamiento indica que, en PD, el lavado con agua produce un mejor aprovechamiento (tanto de la MS y MO como de la fibra) con menos PG/unidad de MS desaparecida que el resto de los sustratos, lo cual produciría un mejor flujo de la energía digestible hacia BM (Blümmel et al., 1997c).

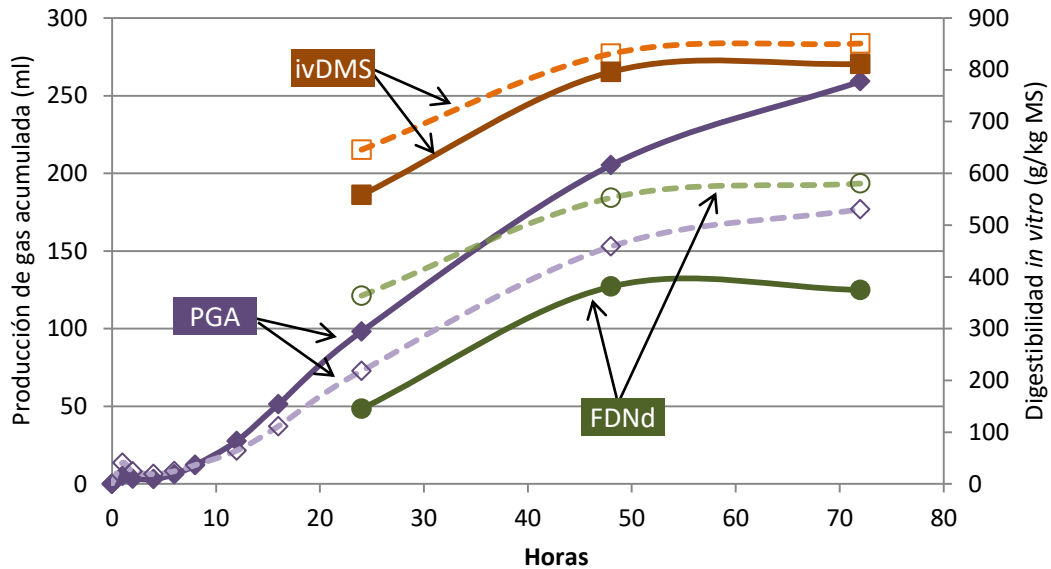


Figura 3.12 Producción de gas acumulada (PGA, líneas violetas, rombos), digestibilidad *in vitro* de la MS (ivDMS, líneas naranjas, cuadrados, g/kg de MS) y FDN digestible (FDNd, líneas verdes, círculos, g FDN/kg de MS) producto de la fermentación de *Paspalum dilatatum* (PD) sin lavar (líneas y marcador enteros, n=3) o después de lavarlo con agua para extraer los compuestos solubles (líneas punteadas, marcador vacío, n=3).

Este resultado sugiere que la presencia de CSA de algún modo retrasan o dificultan el desarrollo microbiano, o bien que el tratamiento de lavado con agua hubiera afectado en forma inadvertida la estructura de los compuestos fermentables remanentes en el residuo (Stefanon et al., 1996).

Al evaluar como afectaron a la DFDN los CSDN, generando las PCP en el exp. 2, los forrajes C4 no presentaron diferencias entre Or y PCP. Esto resulta controversial para MC, ya que en el lavado con SDN, los CSA deberían perderse también y por lo tanto, los Trat en los cuales se eliminaron los CS (*i.e.* en agua y en SDN) deberían resultar similares. Solo RG a las 48 h presentó una mejora después de ser lavado con SDN, en fresco (*i.e.* FDNfr) con respecto al Or, sugiriendo que este forraje podría contener un elemento soluble en SDN (pero no en agua) que al extraerlo mejora en 7-8 % la DFDN. Sin embargo, es mucho más probable que el tratamiento con SDN (más agresivo que el lavado con agua) pudo haber modificado las propiedades de la pared celular en forma diferenciada para MC y RG, dejando a los carbohidratos estructurales del RG más susceptibles a la acción enzimática de las bacterias.

Schofield y Pell (1995b) también analizaron el efecto de los CSDN, por una sustracción de la fracción fibrosa al forraje entero y determinaron que la DFDN del

forraje original no difería de la fracción fibrosa tanto en la alfalfa como en MM. Mientras que para *timothy grass* (*i.e. Phleum pratense*) y trébol (*i.e. Trifolium pratense*) la PCP se digirió un 6 % más. El efecto beneficioso observado en la digestibilidad *in vitro* de las PCP podría deberse a que la fibra de estos tratamientos se encuentra más expuesta a la acción de las bacterias fibrolíticas, que podría ser especialmente beneficioso para forrajeras tropicales (Hess et al., 2003), sin embargo, estos autores no encontraron diferencias entre los forrajes enteros y la fracción fibrosa en MM, en concordancia con lo reflejado en CG y MC del exp. 2 de esta tesis, sugiriendo que, al menos en estos forrajes, dichos cambios estructurales no aparecen o no interfieren en la fermentación de la fibra.

En los casos en los que se produjo un incremento en la DFDN en los materiales lavados con agua o con SDN (*i.e.* exp. 1, PD a las 24, 48 y 72 h y MC a las 48 y 72 h; exp. 2, RG a las 48 h), podría ser indicativo del efecto de carbohidratos rápidamente fermentables en la digestión de la fibra (Hoover, 1986; Piwonka y Firkins, 1993) debido al descenso de pH que se genera (por debajo de 6,2). Sin embargo, el pH del medio en ambos experimentos fue mayor a 7,0, desestimando el efecto pH como explicación.

Por otro lado, ha sido señalado con anterioridad que pueden existir interferencias de carbohidratos rápidamente fermentables sobre la digestión de la fibra mas allá de la modificación del pH antes mencionada, por el denominado “Efecto carbohidrato” (Mould y Ørskov, 1984). Este fenómeno ha sido estudiado fundamentalmente alrededor del impacto del almidón sobre la digestión de la fibra y se le ha prestado mucho menos atención al rol de los CS (Stefanon et al., 1996). Sin embargo, en este caso, el aumento de la digestión de la fibra observado para PD y MC, no parecería estar asociado con compuestos rápidamente degradables, en virtud del escaso impacto de la PG instantánea en las primeras horas para estos sustratos.

En adición a lo anterior expuesto, no hay que perder de vista que uno de los supuestos fuertes de los modelos biológicos utilizados en estos ensayos, es que la funcionalidad del sistema de digestión *in vitro* dependiente de las poblaciones microbianas no se altera significativamente por el tipo de sustratos evaluados. Por lo cual, y teniendo en cuenta que el lavado con agua no genera una separación completa de las fracciones fibrosas y no fibrosas (Stefanon et al., 1996), se podría pensar que estos cambios particulares de PD y MC podrían deberse a algún compuesto particular de la fracción soluble en agua que genere una modificación en la población microbiana o en la actividad enzimática (Hungate, 1966).

3.5.3. Potencial metanogénico de las forrajeras tropicales y el rol de los CS en la producción de CH₄

El CH₄ entérico en rumiantes se produce, en gran medida, por la liberación de hidrógeno como consecuencia de la fermentación de carbohidratos estructurales de las dietas a base de forraje, que, captado por ciertos microorganismos, lo eliminan en forma de metano utilizando las vías metanogénicas (*i.e.* conversión de hidrógeno en metano, Stewart et al., 1997). Debido a la importancia ambiental y económica que representa la emisión de este gas, los modelos predictivos de CH₄ entérico se han convertido en

herramientas muy útiles y de gran aceptación en el ámbito científico, y para la toma de decisiones a nivel gubernamental o empresarial. Sin embargo, la gran mayoría están formulados con datos provenientes de bovinos de razas británicas (*Bos taurus*) consumiendo forrajes templados o bovinos lecheros (Holstein) con dietas a base de concentrados (IPCC, 2007; Lesschen et al., 2011) por lo que su aplicación para predecir emisiones en bovinos que consuman forrajeras tropicales está limitada. Por este motivo ha sido reclamada la necesidad de obtener datos objetivos de emisiones producidas por la fermentación de forrajeras tropicales (Kurihara et al., 1999; McCrabb y Hunter, 1999) teniendo en cuenta características tanto de los animales (*e.g.* consumo de MS), como del alimento (*i.e.* fuente de fibra, concentración de FDN del alimento, DMS, proporción del concentrado en la ración, Jaurena et al., 2015).

Debido a las características de pared celular, que afectan en gran medida el consumo y la digestibilidad, hay estudios que sostienen que las forrajeras C4 producen más CH₄ que las templadas (Hess et al., 2004; Kurihara et al., 1999), presumiblemente debido a la mayor relación pared celular: componentes solubles (Van Soest, 1994) y a la menor digestibilidad (Minson, 1990) de las tropicales. Sin embargo, los resultados encontrados en nuestros experimentos, no concuerdan con estas afirmaciones. Dado que, si bien los forrajes que presentaron mayores PCH₄ fueron tropicales (MC y CG), no se diferenciaron de ALF y RG. Y además, cuando la PCH₄ es afectada por la digestibilidad (tanto de la MS como de la MO), las especies que menos produjeron fueron PD y UB, dos gramíneas tropicales.

Si bien es cierto que las mayores PCH₄ se relacionan con niveles de N bajos y altos contenidos de fibra de las gramíneas tropicales en comparación con aquellos animales consumiendo forrajeras templadas, estas pérdidas son comúnmente reportadas por animal (Hess et al., 2004) o por unidad de MS consumida (McCrabb y Hunter, 1999) sin tener en cuenta cuanta de esa MS ingerida fue efectivamente fermentada, ya que el gas producido (y por ende el CH₄) es producto del sustrato fermentado; es decir el ordenamiento de los sustratos puede cambiar según la métrica utilizada (*e.g.* PCH₄/animal/día, PCH₄ por unidad de MS incubada/digerida o MO incubada/digerida o Ym)

En el exp. 2, la CH₄-MSi de CG no presentó diferencias detectables entre las distintas formas de presentación del material (*i.e.* Original, FDNfr y FDNse), mientras que, al expresar por unidad de MS o MO digestible, la fracción FDNfr produjo mucho más CH₄-MSd o MOd que el Or (Cuadro 3.12). Estos resultados son análogos a lo observado en un estudio anterior, donde la CH₄-MSi de MC fue menor que la correspondiente a la vega patagónica (VP) estudiada (CH₄-MSi= 4,3 y 4,9 g/kg MS incubada, para MC y VP respectivamente). Sin embargo, cuando se consideró la digestibilidad verdadera de los forrajes la relación se invirtió (CH₄-MSd= 8,0 y 7,2 g/kg MS desaparecida, para MC y VP respectivamente, Cantet et al., 2016).

Analogamente la situación podría cambiar si las ventajas en digestibilidad repercuten sobre un mayor consumo (y consecuentemente, mayor PCH₄/ animal/ día); efecto que a su vez puede ser compensado por una mayor producción animal que repercutiría en una menor intensidad de emisión (*e.g.* CH₄/ kg de ganancia de peso). Aspectos que obviamente exceden los alcances de este trabajo.

Teniendo en cuenta que el CH₄ de fermentación proviene exclusivamente de la MO fermentada, el análisis de la CH₄-MOd resulta la métrica más razonable para el propósito de este trabajo.

Es importante tener en cuenta que la fibra digestible es considerada como la mayor responsable de la metanogénesis (Van Soest, 1994). Consecuentemente, es de esperar que la PCH₄ esté asociado positivamente con especies forrajeras con mayor contenido de pared celular (tal como se discutió anteriormente), y con el avance del estado fenológico de la pastura, producido por el incremento de contenido de fibra (Jaurena et al., 2015), con la consecuente reducción de la digestibilidad y aumento en el tiempo de permanencia del alimento en el rumen (Buddle et al., 2011).

De hecho, hay evidencias bibliográficas que afirman que la PCH₄ por unidad de MO digerida de los azúcares solubles es menor que la de la fibra (Hindrichsen et al., 2004; Moss et al., 1995), ya que el consumo de carbohidratos no fibrosos genera un patrón de fermentación hostil para muchas especies metanogénicas (pH más bajo, mayor tasa de pasaje y mayor concentración de propiónico que representa una demanda por H₂ lo que compite con la PCH₄, Knapp et al., 2014). En concordancia con esto, Lana et al. (1998) encontraron una correlación negativa entre el pH y la PCH₄, incrementando en una dieta fibrosa, la proporción de concentrado. Sin embargo, aunque estos autores afirman que una reducción por debajo de 6,6 en el pH ruminal puede decrecer rápidamente la PCH₄, esto se vería acompañado de una menor eficiencia en el crecimiento microbiano y una disminución en la fermentación de la fibra. En el caso de los resultados de este capítulo, en ningún caso se registraron pH en los medios de incubación que resultaran preocupantes.

Un aspecto menos explorado es el efecto de las características de los carbohidratos estructurales sobre la PCH₄. A las 48 h (exp. 2) se observó la existencia de diferencias en el potencial metanogénico de las PCP (*e.g.* CH₄-MOd de la fracción FDNfr, CG= 15,1a, MC =14,5ab y RG= 11,9b g/kg MO digerida; Cuadro 3.12). Para las 24 h, RG mostró un comportamiento muy similar entre las fracciones bajo estudio (*i.e.* Original, FDNfr y FDNse; Cuadro 3.12), sin embargo, en CG, se observó un notable incremento en la CH₄-MOd para FDNfr al compararlo con el material Or, mientras que en MC se observó una diferencia numérica inversa a la de CG (Interacción Sust × Trat, $p < 0,05$). Estos resultados están en concordancia con el meta-análisis realizado por Archimède et al. (2011) quienes estimaron que el potencial metanogénico (para un mismo nivel de fibra, digestibilidad y consumo) de gramíneas tropicales sería un 12% mayor (lt/kg MS consumida) que sus similares templados.

Las observaciones antes expuestas sugieren que existen aspectos de la composición físico-química de las paredes celulares que determinan variaciones en el potencial metanogénico de los sustratos. Esta idea es reforzada por el hecho de los probables cambios físico-químicos generados sobre las paredes celulares que surgen de la comparación de la FDNfr y FDNse.

3.5.4. Relación estequiométrica entre los productos de fermentación

3.5.4.1. *Primeras 24 h de fermentación*

La relación negativa existente entre la PGA y la BM fue confirmada por estudios realizados con ^{15}N o con evaluaciones de bases púricas, en sistemas *in vitro* como *in vivo* (Blümmel y Lebzien, 2001; Blümmel et al., 1997b). Esta relación indica que, a igual digestibilidad, aquellos alimentos que producen menos gas tendrán mayores FP, reflejando una mayor cantidad de la energía consumida/incubada retenida en BM.

En asociación con lo anterior la descripción de la estequiometría ruminal descrita por Wolin (1960), indica que existe una estrecha relación entre la PCH_4 y la producción de AGV. Sin embargo, como indica Archimède et al. (2011) no existe hasta el momento ningún trabajo empírico que permita evaluar la relación entre PCH_4 y la producción de AGV para explicar las diferencias entre forrajeras C3 y C4.

En ambos exp. aquí presentados se midió el sustrato incubado que fue degradado (ivDMS y ivDMO), la PGAN (incluyendo la participación del CH_4) y la concentración de AGV, y a partir de estos datos se estimó la BM teniendo en cuenta un factor estequiométrico, que afecta la PGA, tomando un factor estequiométrico que depende del tipo de alimento que se evalúe (*i.e.* 2,2 en alimentos acetogénicos, Blümmel et al., 1997a), según la siguiente ecuación:

$$BM = \text{Sustrato real degradado} - (\text{Volumen de gas} \times \text{Factor estequiométrico})$$

El FP explica en gran medida la eficiencia de síntesis de BM, asumiendo como verdaderos los siguientes supuestos: 1) que las cadenas carbonadas de la MO verdaderamente digerida se reparten cuantitativamente en la BM, el gas de fermentación y los AGV formados y 2) que la PG está relacionada estequiométricamente con el perfil de AGV (Kiran y Krishnamoorthy, 2007).

En la Figura 3.13 se analizó la relación entre la PGA estimada a partir de la concentración de AGV (Blümmel et al., 1999) y la PGAN efectivamente observada para los Or y se halló una escasa relación entre ambas ($p < 0,10$; $r^2 = 0,112$), mientras que, en los Lavados, más de la mitad de las estimaciones presentaron correlación no significativa, desestimando entonces la aplicación del FP para evaluar los forrajes del exp.1.

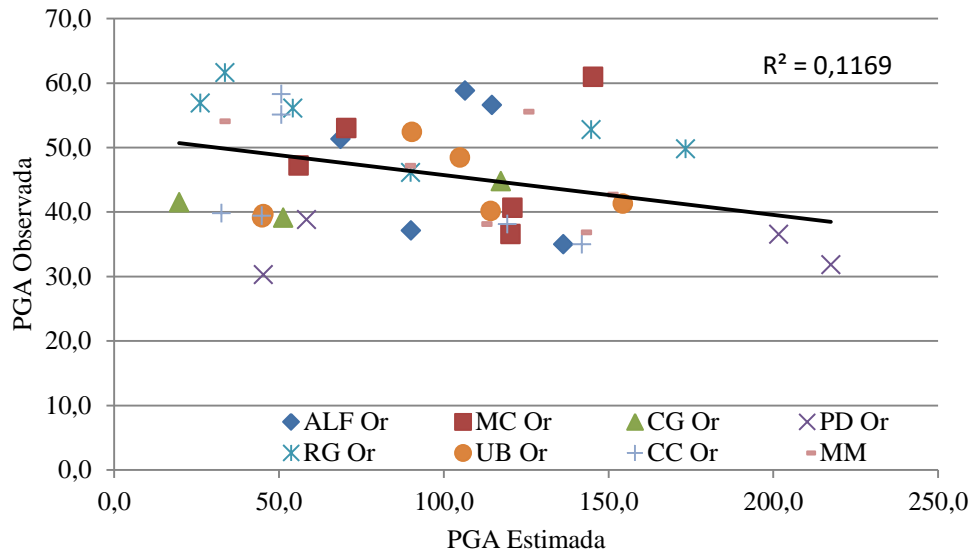


Figura 3.13 Relación entre la PGA observada en el sistema *in vitro* (en 24 h), y la PG estimada estequiometricamente a partir del perfil de AGV, según (Blümmel et al., 1999) de ocho forrajes en el exp. 1, (ALF, Alfalfa (*Medicago sativa*); MC, *Milium coloratum*; CG, *Chloris gayana*; PD, *Paspalum dilatatum*; RG, Raigrás (*Lolium perenne*); UB, *Urochloa brizanta*; CC, *Cenchrus ciliaris*; MM, *Megathyrus maximus*).

Por su parte, en el exp. 2, el mismo análisis halló una buena relación de PGA observada y estimada ($p < 0,05$; $r^2 = 0,55$; Figura 3.14), aunque los valores estimados fueron 3,5 veces mayores a los observados y menores a las encontradas en otros trabajos (Blümmel et al., 2003, 1997a). Sin embargo, al agrupar las observaciones por tratamiento, se observó una clara distinción entre el Or y FDNfr y FDNse, siendo esta última la que mejor ajustó ($r^2 = 0,80$, Figura 3.15).

Resultó congruente la falta de relación observada y esperados para el exp. 1, ya que los materiales fueron tratados frescos, teniendo en cuenta que en el exp. 2 los materiales frescos arrojaron resultados similares. Resulta difícil de explicar de qué modo la forma de presentación indujo modificaciones en la relación de los AGV y el gas producido.

En el exp. 1, el PD fue uno de los Sust con menor PGAN y AGV en todos los horarios, lo cual podría explicar porqué presentó la menor PCH_4 , aunque produjo una relación Ac: Prop relativamente alta.

De acuerdo con estas modelaciones, los sustratos que tengan mayores PG, menores digestibilidades y mayor producción de AGV deberían incorporar menos sustrato a proteína microbiana. En el exp. 1, si bien ALF y RG fueron los que mayores ivDMO presentaron, también fueron los que mayor gas produjeron, por lo que resultaron con producción de BM intermedia. En esta comparación CC fue la forrajera que pese a la limitada ivDMO, orientó mayor proporción de la energía hacia la síntesis de BM. En el otro extremo los Sust que provocaron la menor incorporación de BM en el medio fueron MC y CG.

Por otro lado, en las primeras horas de fermentación, la producción de AGV de los forrajes estaría influenciada en gran medida por la participación de los CS (Doane et al., 1997b), que podría explicar la disminución de las concentraciones de AGV con la eliminación tanto de CSA, como de CSDN, sobre todo en forrajeras C4. Sin embargo, la exclusión de CS genera un efecto que se prolonga en el tiempo, ya que la producción de AGV a las 48 y/o 72 h también es menor que en los materiales Or. En adición habría que considerar que la eliminación de estos CS pudo haber modificado las poblaciones microbianas actuantes.

Similar a lo que ocurrió en el exp. 1, en el exp. 2 el RG fue el que más gas produjo, sobre todo en las primeras horas, con una mayor ivDMO y DFDN, aunque con concentraciones de AGV similares a los forrajes C4; lo que explicaría la falta de diferencias en la PCH₄ y en la síntesis de BM (Blümmel et al., 1994).

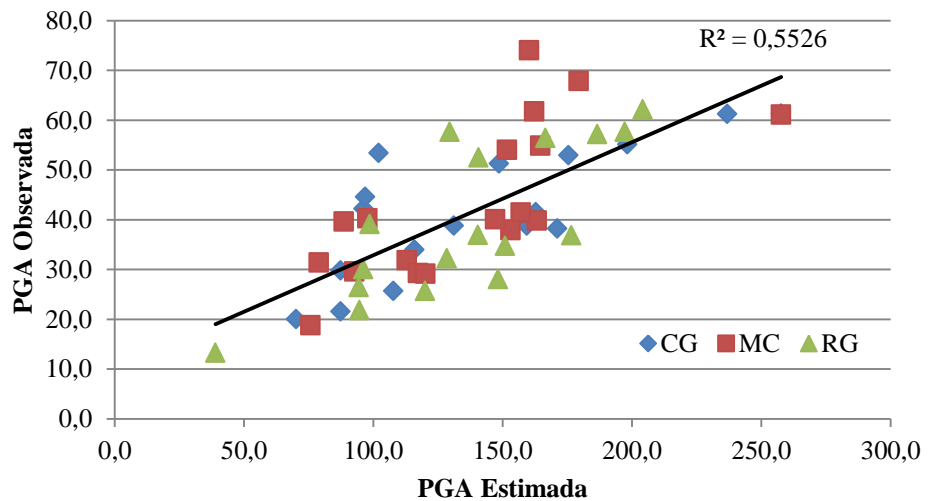


Figura 3.14 Relación entre la PGA observada en el sistema *in vitro* (en 24 h), y la PG estimada estequiometricamente a partir del perfil de AGV según Blümmel et al. (1999) de los sustratos evaluados en el exp. 2 (MC, *Milium coloratum*; CG, *Chloris gayana*; RG, Raigrás (*Lolium perenne*)).

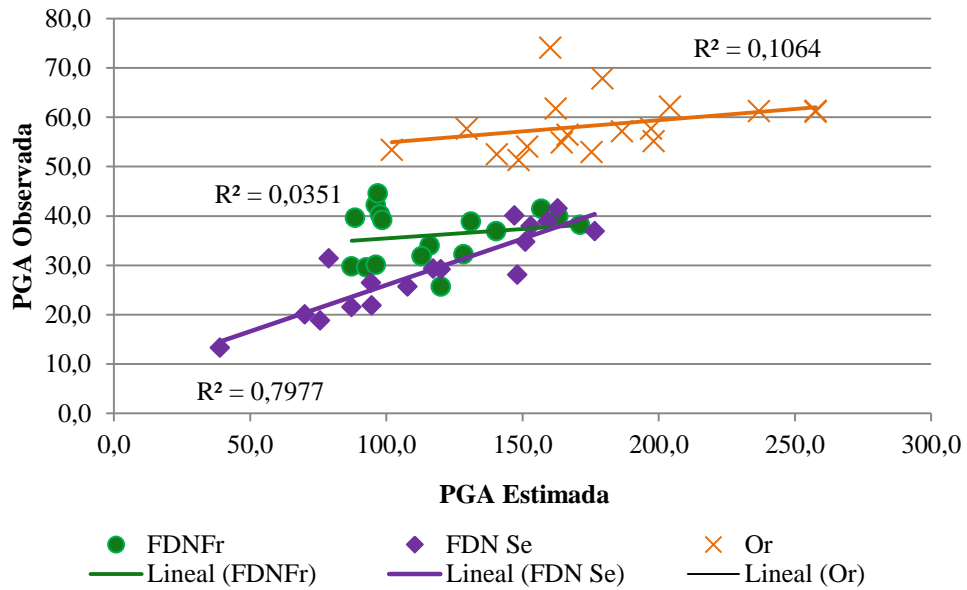


Figura 3.15 Relación entre la PGA observada en el sistema *in vitro* (en 24 h), y la PG estimada estequiometricamente a partir del perfil de AGV según Blümmel et al. (1999) de los sustratos evaluados tal cual (Or), lavados con SDN, frescos (FDNFr) y secados en estufa (FDNSe) del exp. 2.

3.5.4.2. Fermentaciones tardías, a 48 y 72 h.

Después de 48 h de fermentación en el exp. 1, la exclusión de CSA mostró diferentes comportamientos entre los sustratos estudiados, siendo el PD el que mejor respondió a la eliminación de estos compuestos, ya que aumentó su digestibilidad total con una menor PG, que se reflejó en un mejor FP. Este incremento del FP podría deberse a algún factor soluble no fermentable o a la acción de proteína degradable, que contribuyan a incrementar la ivDMO o disminuir la PG, respectivamente (Blümmel et al., 2003).

Por otra parte, aunque el Lavado también generó una mejora en la DFDN de MC, la exclusión de CSA no generó diferencias en la PGAN para 48 y 72 h, que se reflejó en la similitud en los resultados de FP y producción de BM. Este comportamiento dísimil específico de estos sustratos haría pensar los CSA de PD y MC, aunque formados por concentraciones variables de pectinas, fructosanos y otros CHOs solubles que se encuentran directamente disponibles para la flora microbiana (Stefanon et al., 1996), tuvieron un efecto perjudicial en el aprovechamiento de la fibra en estos dos Sust, pero solo en PD provocaron además una peor distribución de la energía digestible, reflejado en el bajo FP para la fracción completa (Or).

Con respecto a la producción de AGV, el lavado generó una disminución en la concentración de acético y propiónico (reflejado en los AGV totales), en forma similar a lo que ocurrió a las 24 y 48 h, siendo PD, el que menos CH₄-MOD presentó. Por otro lado, CC, que fue el que mayor producción de acético y propiónico presentó a las 48 h (también elevadas a las 72 h, pero sin diferencias significativas con el resto), fue el

único Sust en el cual la eliminación de los CSA generó una mayor PG, influyendo además en una menor FP con respecto al Or.

En el exp. 2 también las fracciones FDNfr presentaron menores ivDMS comparado con los Originales en los forrajes C4, mientras que se equipararon cuando se evaluó la ivDMO y DFDN. Si comparamos los forrajes C4 con el RG y teniendo en cuenta que cuanto mayor sea el contenido de fibra en los sustratos evaluados tal cual, la cantidad de gas producida por la fracción soluble disminuye (Doane et al., 1997b; Schofield y Pell, 1995b), deberíamos encontrar en las gramíneas C4 una disminución en la PG en FDNfr comparado con Or, al menos durante las primeras horas de fermentación.

Sin embargo, ni a las 24 h, ni a las 48 h se encontraron diferencias en la PGAN entre FDNfr y Or. La principal diferencia observada en la fermentación tardía fue que el CG produjo más CH₄ que el RG, siendo una observación en concordancia con lo reportado por Archimède et al. (2011). La mayor potencial metanogénico de CG, estuvo asociado a una mayor relación acético: propiónico en la producción de AGV, tal como señalan Blümmel et al. (1999).

Por otro lado, las PCP presentaron menores concentraciones de AGV para todos los sustratos, aunque solo presentó menor digestibilidad la PCP de MC, lo que sugiere que no solo hay diferencias en la fermentación de forrajeras tropicales y templadas, sino que existe una amplia heterogeneidad entre forrajeras C4 estudiadas.

3.5.5. Efecto del tratamiento térmico en las paredes celulares purificadas

En las técnicas *in vitro* de evaluación de alimentos más comúnmente utilizadas (Menke y Steingass, 1988; Theodorou et al., 1994; Tilley y Terry, 1963; Wawrzkievicz y Danelón, 2004) se utilizan sustratos secados en estufa, para poder moler dicho sustrato hasta un tamaño de partícula adecuado para la escala del sistema (*i.e.* 1-2 mm, Theodorou et al., 1994), para favorecer el contacto de los microorganismos con el Sust, disminuir la fase Lag y tratar de que la fermentación empiece lo antes posible (Williams, 2000). Si bien este secado se realiza a una temperatura cercana a 60°C, con el fin evitar modificaciones en la conformación de carbohidratos y proteínas (*e.g.* formación de compuestos de Maillard), estudios previos han mostrado efectos del secado sobre la fermentación *in vitro* (Cantet et al., 2011a; Wawrzkievicz, 2010), debido posiblemente a cambios en la estructura de la fibra, que podría alterar los resultados de la evaluación nutricionales de los alimentos (Wawrzkievicz, 2010), por lo que sería deseable emplear alimentos frescos, sobre todo si se pretende evaluar forrajes que serían consumidos en pie por los rumiantes.

En el exp. 2 se evaluó el efecto del secado con estufa en el comportamiento fermentativo de las paredes celulares, generando 2 tipos de PCP (FDNfr y FDNse). Trabajos anteriores han señalado que puede modificarse los contenidos de FDN y los parámetros de fermentación, sobre todo de muestras ricas en proteínas (Cone et al., 1994). Sin embargo, en los forrajes tropicales estudiados, no se notaron alteraciones en las concentraciones de fibra y PB.

En el exp. 2, teniendo en cuenta la digestibilidad, el secado no indujo diferencias entre las 2 PCP para los 3 Sust. Sin embargo, Doane et al. (1997a) encontraron una pequeña subestimación en la DFDN para ALF, *Bromus inermis* y *Dactylis glomerata*, en concordancia con los resultados encontrados en ALF, PD y RG por Cantet et al. (2011a), cuando se evaluaron los forrajes sin fraccionar.

Al evaluar la fermentación, sin embargo, se observó que la PGAN durante las primeras 24 h fue diferente para las dos PCP. Por un lado, el secado retrasó la instalación de microorganismos y fermentación en los 3 Sust estudiados, y esto se reflejó, a su vez, en menores tasas horarias y PGAN total durante las primeras 24 h. Esta reducción en las PCP secadas en estufa se encontró en el trabajo de Doane et al. (1997a), aunque la disminución encontrada aquí fue del 41% mientras que en el citado trabajo no llegó al 5%. Por otro lado, aunque se ha sugerido que el retraso en la cinética de PG y en la PGAN durante las primeras 24 horas de incubación *in vitro* podrían ser explicadas por las diferencias en la composición de AGV producidos (Wawrzkievicz, 2010), los perfiles de AGV producto de la fermentación de ambas PCP no presentó diferencias a 24 o 48 h, para ninguno de los sustratos estudiados.

En CG hubo una reducción numérica sustancial debido al secado, para todos los parámetros de digestión estudiados (Cuadro 3.13). En los otros sustratos (*i.e.* RG y MC), la falta de diferencias en la digestibilidad producto del secado, pero con una PG sustancialmente menor que FDN_{fr}, explican los mejores FP observados para FDN_{Se}. Sin embargo, esta mejora en la eficiencia de la distribución de la energía, no se vio reflejada en una menor PCH₄, generada por el secado.

Estos resultados tienen implicancias sumamente serias, por un lado, obliga a repensar la preparación de las muestras al momento de evaluar alimentos, dado que la PG demostró ser especialmente sensible al tratamiento térmico. Por otro lado, cabe considerar especular las consecuencias nutricionales que tiene para el animal el suministro de alimentos deshidratados en comparación con los materiales frescos.

3.6. Conclusiones

El propósito de este capítulo fue estudiar el efecto de los CSA y de las diferencias entre los materiales evaluados tal cual (*i.e.* Or) y las PCP de forrajeras templadas y megatérmicas utilizadas como alimento para los rumiantes.

En general las digestibilidades de las especies megatérmicas halladas en este trabajo superaron a las usualmente reportadas en la bibliografía. Este comportamiento estaría explicado por la técnica *in vitro* utilizada (ivDMS verdadera), porción del forraje utilizado (exclusivamente láminas), forma de presentación (material fresco, no secado en estufa como se reporta habitualmente) y el ambiente predominantemente templado de crecimiento de las pasturas (CABA, Argentina).

Las forrajeras megatérmicas tardaron más tiempo (fase Lag) en comenzar la fermentación que las templadas. Sin embargo, al analizar otros aspectos de la cinética de digestión y del perfil fermentativo se observó un comportamiento heterogéneo entre las gramíneas C4, lo que alerta sobre la necesidad de ser extremadamente cautos al realizar extrapolaciones para este conjunto de especies.

Entre los sustratos estudiados, el *Paspalum dilatatum* merece una mención aparte. La eliminación de los CSA redujo la fase Lag, aumentó la DFDN y la ivDMS y ivDMO, lo que repercutió en una mayor producción de BM en los residuos del lavado con agua, debido a la menor PGA respecto al material Or; este efecto nos llevaría a especular que o bien la fermentación se redujo por la presencia de algún CS no identificado, o menos probablemente que el lavado con agua afectó las propiedades de la pared celular del PD. En forma analoga, para el residuo del lavado con agua del MC también se detectó una mejora en la DFDN a las 48 h.

La PCH₄ por unidad de MS y MO digerida no solo fue afectada por los CS, sino que también estuvo afectada por la estructura particular de la pared celular (exp. 2), tal como se puso en evidencia por la PCH₄ que aumentó en la PCP de CG, mientras que se redujo en MC. Por otro lado, la eliminación de CS en los residuos lavados con agua disminuyó la producción de AGV y generó perfiles más acetogénicos en las forrajeras C4, lo que se asoció con fermentaciones más largas, sugiriendo un efecto a largo plazo sobre las poblaciones microbianas.

La estimación de la PGA a tiempo fijo a partir de la composición de AGV, en ambos experimentos donde se utilizaron forrajes frescos, no presentó una buena asociación con los resultados observados. Sin embargo, en los forrajes secados en estufa, la relación entre valores observados y estimados fue muy buena ($r^2 = 0,80$).

Las PCP secadas en estufa (*i.e.* exp. 2) presentaron un retraso y una disminución en la fermentación de los forrajes estudiados, mientras que solo en CG redujo sustancialmente la digestibilidad del sustrato, aunque la PCH₄ por unidad de MS o MO digerida no se vió alterada. Esto sugiere que el secado de la muestra, conforme con lo concluido por otros autores, altera la fermentación en forma diferencial para distintos sustratos, de lo cual se deduce que sería recomendable utilizar forrajes molidos en fresco cuando se pretende caracterizar forrajes para pastoreo.

Capítulo 4.
**Efecto de la adición de extractos de taninos en los perfiles
de fermentación de forrajeras templadas y tropicales**

4.1. Resumen

El objetivo de este capítulo fue analizar el efecto del agregado de taninos condensados (TC) en la eficiencia de digestión, potencial metanogénico y distribución de la energía entre los productos de fermentación de forrajeras templadas y tropicales. Se realizaron dos experimentos mediante la técnica de producción de gas (PG) *in vitro*, donde se agregaron extractos de *Quebracho sp.* y *Lotus corniculatus* (exp. 1) y extractos de Sauco (*Sambucus peruviana*) y *Lotus uliginosus* (exp. 2), obtenidos por lavados diferenciales con agua destilada a 40°C y con etanol acuoso (etanol 70%) que fueron agregados a botellas de fermentación para evaluar la eficiencia de digestión y productos de fermentación de Raigrás (RG, *Lolium perenne*) en comparación dos forrajeras tropicales: *Megathyrus maximus* (MM, exp. 1) y *Penisetum purpureum* (Kikuyo, KK, exp. 2). Se observaron comportamientos disímiles entre las forrajeras tropicales, si bien MM y KK presentaron mayores y más tardías PG, digestibilidades *in vitro* de la MS (ivDMS), MO (ivDMO) y de la fibra (DFDN) relativamente altas (pero menores al RG), solo MM presentó mayor producción de CH₄ (PCH₄) que el RG. Los extractos acuosos del exp. 2 provocaron un aumento en la ivDMS y ivDMO, aunque no se puede atribuir esta mejora en el aprovechamiento de los nutrientes a los TC presentes en los mencionados extractos, sino que posiblemente otros compuestos (diferentes a los TC) arrastrados durante el lavado fueron los responsables. Por otro lado, si bien los TC de Quebracho indujeron un descenso en el DFDN, contrariamente a lo esperado, la PCH₄ fue mayor, aunque este efecto no pudo ser atribuido a la presencia de TC. Adicionalmente, la estequiometría indicó que mientras que la mayor PCH₄ en los tratamientos con Quebracho estuvieron asociados con perfiles acetogénicos encontrados, aquellos con *L. corniculatus* no tuvieron relación con la composición de AGV, sino con la mayor producción total de AGV y las mayores PG.

4.2. Introducción

Desde hace tiempo numerosos grupos de investigadores y técnicos que se dedican al estudio de la nutrición animal están interesados en modificar la capacidad fermentativa del rumen, para hacer más eficiente el uso de los nutrientes o disminuir la formación de compuestos nocivos para el animal, para los microorganismos deseables o para el medio ambiente. En este sentido, el estudio de la calidad de los alimentos y el proceso de fermentación ruminal, se ha basado en conocer la proporción de MS o MO disponible para los microorganismos del rumen, la velocidad de fermentación, los productos generados a partir de ella y la interacción entre estos factores (Blümmel et al., 1997a).

Los gases generados por los rumiantes son uno de los productos de fermentación más estudiados en los últimos años, por tener una relación directa e inmediata con la nutrición y, además, por representar, no solo contaminantes para la atmósfera, sino también una pérdida de energía bruta del alimento (Beauchemin et al., 2008). Se ha calculado, con base en el análisis del ciclo de vida, que el sector agropecuario emite aproximadamente 7,1 Gt de CO₂-eq/año, que equivale a el 14,5 % del total de las emisiones de los gases con efecto invernadero (**GEI**) antropogénicas (Gerber et al., 2013). Uno de los GEI más ligados a la actividad del hombre es el CH₄, ya que el 70 % de la producción de CH₄ (**PCH₄**) proviene de fuentes antropogénicas, siendo el sector agropecuario responsable de dos terceras partes del mismo (Duxbury et al., 1993).

Como potenciales instrumentos mitigadores de CH₄, el manejo de la dieta (calidad de forraje, mejoramiento genético vegetal, suplementación y utilización de aditivos) ha sido, en los últimos años, de los más evaluados por la comunidad científica (Eckard et al., 2010).

Los compuestos (o metabolitos) secundarios de las plantas fueron descritos desde hace más de 100 años, y han sido definidos como aquellas sustancias químicas que no están involucradas en procesos de crecimiento y reproducción vegetal (Hartmann, 2007), pero que son elaboradas por las plantas como mecanismos de defensa contra microorganismos, insectos y herbivoría (McL. Dryden, 2008).

Muchas de estas sustancias se han utilizado como aditivos modificadores de la fermentación ruminal desde no hace mucho tiempo (*e.g.* los aceites esenciales, las saponinas y los taninos; Patra y Saxena, 2010) y aunque algunos puedan tener efectos negativos sobre los animales, muchos de ellos en la dosis correcta, pueden presentar efectos benéficos en el aprovechamiento de los nutrientes, evitando o disminuyendo la formación de compuestos nocivos o indeseables para el rumiante (Jouany y Morgavi, 2007; Patra y Saxena, 2010) o incluso contribuyendo al control de parásitos gastrointestinales (McL. Dryden, 2008).

Los taninos han sido tradicionalmente diferenciados en taninos hidrolizables y condensados (**TC**). Debido al menor potencial de toxicidad, los TC han sido más estudiados que los hidrolizables (Frutos et al., 2004). Los TC o proantocianidinas son polímeros no ramificados de unidades flavonoides con un peso molecular más alto que los hidrolizables (2 a 7 veces mayor, McLeod, 1974), y han sido estudiados por su

capacidad de asociarse a proteínas y otras moléculas, evitando la degradación ruminal debido a que estos complejos se forman por puentes de H que son estables en un rango de pH de 3,5 a 8 (Aerts et al., 1999; Min et al., 2002).

La capacidad para formar complejos con proteínas ha sido uno de los efectos mejor descritos de los TC, sobre todo para forrajes que poseen mucha fibra y poca proteína bruta (**PB**) disponible, como es el caso de las forrajeras megatérmicas, ya que esta propiedad anti-nutricional de los taninos puede, por tanto, reducir aún más la calidad de estas forrajeras (Tiemann et al., 2008), llegando incluso cuando las dosis son excesivas a reducir el consumo voluntario de MS (**CVMS**, Blümmel et al., 1997b; Goel et al., 2008). Sin embargo, estos complejos pueden generar efectos benéficos, al proteger las proteínas de la excesiva degradabilidad ruminal, permitiendo el aprovechamiento en porciones posteriores del tracto gastrointestinal ya que estas conexiones se rompen a un pH menor de 3,5 (*e.g.* abomaso) o mayor a 8 (*e.g.* duodeno; Waghorn et al., 1994). Estos efectos se observan controlando los niveles de inclusión, por ejemplo, Barry et al. (1986) sugirieron que adicionando 30 a 40 g de TC de *Lotus pedunculatus* por cada kg de MS consumida se obtiene un efecto protector sobre la degradabilidad proteica y un mayor flujo de N hacia el duodeno, sin afectar la digestibilidad de la MS o el CVMS.

Sin embargo, los efectos de inhibición en la degradabilidad no solo se producen en las proteínas, sino que la formación de complejos con carbohidratos, como hemicelulosa, celulosa, almidón y pectinas fueron descritos por varios autores (Hervás et al., 2003; McSweeney et al., 2001), y tienen un efecto similar, fundamentalmente por producir un retardo en el ataque microbiano. Además de este efecto, la acción antimicrobiana de los taninos sobre bacterias celulolíticas y diversos hongos (Patra y Saxena, 2009) y sobre *archaea* metanogénicas (Tavendale et al., 2005) podrían explicar, al menos en algunos casos, el efecto antimetanogénico de estos compuestos.

Los efectos nocivos o benéficos antes descritos no siempre son encontrados, ya que dependen en gran medida de la dosis (Grainger et al., 2009b), el tipo de extracto (Goel et al., 2008) y del tipo de alimento que contenga los taninos (Mcnabb et al., 1997; Tiemann et al., 2008). Aunque los cambios en la degradabilidad de la fibra, afinidad a las proteínas y el efecto en el potencial metanogénico ha sido estudiados en el pasado, son pocos los estudios que evalúen en forma conjunta el perfil de fermentación, la digestibilidad y la PCH₄ (Guyader et al., 2017)

El estudio del gas de fermentación producido en los sistemas *in vitro* puede brindarnos información valiosa acerca de la degradabilidad de los alimentos y la velocidad en que éstos son degradados (Menke et al., 1979). Esta relación puede ser explicada, en gran medida, con estudios estequiométricos del gas producido y del perfil de ácidos grasos volátiles (**AGV**, Wolin, 1960) provenientes de la fermentación microbiana ruminal. Por otro lado, la síntesis de biomasa microbiana (**BM**) puede ser estimada, con el gas producido y el sustrato realmente degradado (Blümmel et al., 1997c) o con la velocidad de degradación y cantidad de fibra del alimento (Krishnamoorthy y Robinson, 2010). Por lo tanto, cambios cuali o cuantitativos en la población microbiana del rumen podrían verse reflejados en cambios en la fermentación

y en los productos derivados de ella (*i.e.* AGV, gases y BM, Blümmel et al., 1997a, Guyader et al., 2017, Morgavi et al., 2010;).

La degradación del sustrato consumido/incubado por parte de los microorganismos ruminales libera energía, y la mayor parte de ésta se utiliza para la producción de nueva proteína microbiana o AGV, que afectan, a su vez, el volumen y composición de los gases de fermentación (Blümmel et al., 1997a), a partir de un desplazamiento de la fermentación hacia propionato o mediante una reducción en la fermentación de la MO, sin embargo muchas veces no es posible reducir la PCH₄ sin tener resultados negativos sobre la digestibilidad (Benchaar et al., 2001).

Los TC han sido propuestos como potenciales mitigadores del potencial metanogénico (Carulla et al., 2005; Grainger et al., 2009a; Hess et al., 2006; Knapp et al., 2014), por los efectos que producen en la fermentación ruminal de los alimentos, en forma directa inhibiendo la metanogénesis producida por las *archaea* metanogénicas ruminales (Morgavi et al., 2010) o indirectamente optimizando la fermentación ruminal que disminuiría la emisión de CH₄ por unidad de MO digerida (Benchaar et al., 2001; Beauchemin et al., 2008).

Aunque el rol de los TC en la PCH₄ ha sido estudiado en el pasado, el análisis detallado del re-direccionamiento de los carbonos que irían a producir CH₄, en los otros productos de fermentación, es un tópico poco estudiado y de gran interés.

Asimismo, las forrajeras megatérmicas se caracterizan por su alta tasa de producción de biomasa, acompañado con altas concentraciones de fibra y escasa proteína, que los hacen alimentos con poca calidad. En adición a esto, los animales alimentados con este tipo de forrajes tienden a producir más CH₄ por unidad de MS consumida. Hasta el presente, pese a la creciente importancia que han tomado las forrajeras megatérmicas en nuestro país y países vecinos (para más información ver Sección 3.2, del Capítulo 3), existe interés en encontrar estrategias de mitigación de CH₄ asociado con estos recursos. Se han explorado estrategias tendientes a mejorar la digestibilidad de estas forrajeras, y al mismo tiempo, que contribuyan a mitigar la PCH₄, como podría ser la adición de TC y otros compuestos (Joany y Morgavi, 2007; Martin et al., 2010).

El objetivo principal de este capítulo fue analizar los efectos de distintos extractos de TC sobre la digestión, la cinética y los productos derivados de la fermentación de especies forrajeras tropicales y templadas.

4.3. Materiales y Métodos

4.3.1. Caracterización de los experimentos

Se llevaron a cabo dos experimentos para evaluar la adición de extractos de TC en la fermentación de forrajeras templadas y tropicales mediante la técnica de producción de gas *in vitro* (Theodorou et al., 1994, con modificaciones de Wawrzkievicz y Danelón, 2004) según lo descrito en la sección 2.3.2 del capítulo 2. El primer experimento (exp.1) se realizó en el Laboratorio de Nutrición Animal de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires (FAUBA), donde se evaluó el efecto de los extractos de TC de dos fuentes (*i.e.* *Lotus corniculatus* y *Quebracho sp.*) en la cinética y extensión de la fermentación de dos sustratos (*i.e.* raigrás, *Lolium perenne*, RG y *Megathyrsus maximus*, MM). Además, se evaluaron botellas sin la adición de extractos que fueron tomadas como Control, generando así 3 tratamientos (*i.e.* Control, *L. corniculatus* y Quebracho).

Los tratamientos fueron evaluados en presencia o ausencia de polietilenglicol (*i.e.* adicionando 1 ml de PEG o de agua destilada, **PEG** y **NP**, respectivamente), un compuesto con alta afinidad por los TC, que permite discriminar la acción específica de los TC de otros compuestos presentes en los extractos, sin generar cambios en la fermentación *in vitro* (Tiemann et al., 2008).

Por otra parte, el segundo experimento (exp. 2) se llevó a cabo en el laboratorio de la Sede de Investigación Universitaria (SIU) de la Universidad de Antioquia, ubicada en Medellín, Colombia. En este ensayo también se evaluó el efecto de los TC en los parámetros fermentativos y de digestión de dos sustratos (*i.e.* kikuyo, *Penisetum purpureum* [KK] y raigrás, *Lolium perenne* [RG]) aunque lo que se buscaba era diferenciar los efectos de los TC de dos fuentes, Sauco (*Sambucus peruviana*) y *Lotus uliginosus* mediante dos métodos de extracción diferentes, con agua destilada a 40°C o con etanol acuoso.

4.3.2. Descripción de los sustratos utilizados en la producción de gas *in vitro*

Los sustratos utilizados en el exp. 1 fueron los mismos que se utilizaron en los ensayos descritos en el Capítulo 3 (Para ver composición química ir a Cuadro 3.1, tratamientos Or (originales) de RG y MM). Las láminas de RG y MM fueron cosechadas del campo experimental de la FAUBA, molidas en fresco con hielo seco tal como fue descrito en la sección 3.3.1 del Capítulo 3 y reservadas a -20°C hasta su utilización. Por su parte, los forrajes utilizados en el exp. 2, fueron obtenidos en la Estación Agraria Cotové, de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín (Antioquia, Colombia; 540 m.s.n.m., temperatura y precipitaciones medias= 27°C y 1.100 mm, respectivamente).

La composición química de los mismos se detalla en el Cuadro 4.1. Estos sustratos se secaron en estufa, se molieron a un tamaño de partícula de 1 mm y se reservaron en un ambiente seco y fresco hasta su utilización. Todos los sustratos se caracterizaron por contenido de MS 105°C y cenizas (AOAC, 1995), proteína bruta (PB= N total \times 6,25; AOAC, 1995), extracto etéreo (EE, AOAC, 1995), fibra insoluble

en detergente neutro libre de cenizas con alfa-amilasa (aFDN_{MO}, según Goering y Van Soest, 1970), fibra insoluble en detergente ácido libre de cenizas (FDA_{MO}, según Van Soest *et al.*, 1991), contenido de lignina libre de cenizas (LDA_{MO}).

4.3.3. Obtención de los extractos de TC

Los extractos de taninos utilizados fueron preparados comerciales o se obtuvieron por lavados diferenciales a partir de los forrajes en estudio. En el exp. 1, se utilizó, por un lado, un extracto comercial en polvo de TC de *Quebracho sp.* (Unitan Saica, Chaco, Argentina), disuelto en agua destilada.

Cuadro 4.1 Composición química (g/kg) de los dos forrajes que se utilizaron como sustrato (raigrás, RG y kikuyo, KK) y de los dos que se utilizaron como fuente de taninos condensados (TC; Lotus uliginosus, LU y Sauco) realizando los extractos correspondientes del experimento 2.

Sustrato	ID ¹	MS	MO	PB	EE	aFDN _{MO}	FDA _{MO}	Hem
<i>Lolium perenne</i>	RG	944	932	154	38	502	307	195
<i>Penisetum Purpureum</i>	KK	947	914	176	25	668	327	341
<i>Lotus uliginosus</i>	LU	928	929	269	32	333	270	63
<i>Sambucus peruviana</i>	Sauco	942	913	221	42	271	250	21

¹ID, identificación; MS, Materia seca; MO, Materia orgánica; PB, Proteína bruta; EE, extracto etéreo; aFDN_{MO}, Fibra insoluble en detergente neutro tratado con alfa-amilasa (libre de cenizas); FDA_{MO}, Fibra insoluble en detergente ácido (libre de cenizas); Hem, Hemicelulosa.

Por otro lado, se tomó *L. corniculatus* cosechado en estado vegetativo, previa floración (*L. corniculatus*; MO= 911, PB= 211, EE= 21, aFDN_{MO}= 487, FDA_{MO}= 314 y LDA_{MO}= 107 g/kg MS), se lo secó en estufa con aire forzado (sin superar los 40°C), se molió hasta un tamaño de partícula de 1 mm y lavó con agua destilada (100 gr de sustrato en 1200 ml de agua) en un baño termostático a 40°C por 30 min, con agitaciones de 2 min, con 3 minutos de reposo. Posteriormente se filtró el contenido con papel de filtro. El líquido del filtrado se recuperó, procurando que no hubieran quedado partículas visibles sin disolver, y se lo almacenó en un frasco de vidrio color caramelo a 5°C. Los TC de ambos extractos fueron cuantificados por el método de Butanol-HCl (Terril *et al.*, 1992). En forma resumida, 0,5 ml de los extractos purificados fueron disueltos con acetona acuosa (relación extracto: acetona; 7: 3, v/v) en un tubo de ensayo. Luego fueron adicionados 3 ml de una solución de butanol-HCl (relación 95: 5, v/v) y 0,1 ml de reactivo férrico (20 mg/g de sulfato de amonio férrico en 2 N HCl). El contenido dentro de los tubos se mezcló con vortex, se cerraron con tapón de goma y fueron mantenidos en baño termostático a 95-100°C durante 60 minutos, hasta

visualizar un cambio de color y una solubilización completa del alcohol en el extracto. Una vez finalizado el calentamiento, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia de cada tubo en espectrofotómetro (MetroLab[®] 1500) a 550 nm, seteando en cero el aparato con la absorbancia de un blanco (un tubo siguiendo el mismo procedimiento, pero reemplazando el extracto de TC por agua destilada).

En el exp. 2, se cosechó *L. uliginosus* y se recolectaron hojas verdes de Sauco (*Sambucus peruviana*) de la Estación Agraria Cotové, que fueron secadas en estufa a 60°C con aire forzado y molidas. Los extractos diferenciales se obtuvieron lavando los 2 sustratos en cubetas individuales con agua destilada a 40°C, (relación sustrato: agua, 1: 0,9) o con etanol acuoso según Barahona (1999, etanol al 70% a temperatura ambiente; relación sustrato:etanol :: 2:1). La extracción se realizó por agitación constante durante 30 min, posterior filtrado con gasa del sustrato y recuperando el líquido residual.

4.3.4. Tratamientos utilizados para analizar el efecto de los TC en la fermentación *in vitro*

En el exp. 1 se confeccionaron 6 tratamientos combinando dos factores, tres fuentes de TC (*i.e.* Control (sin TC), Quebracho y *L. corniculatus*, a razón de 6 mg de TC por cada 200 mg de sustrato incubado) y la ausencia o presencia de polietilenglicol (PEG, *i.e.* 0 y 20 mg por botella, asegurando 2 mg de PEG por mg de TC incluidos en cada botella). Estos tratamientos fueron analizados en duplicados (*i.e.* réplicas intrabaño) y con dos líneas de botellas independiente para evaluar dos tiempos de sacrificio o de incubación (24 o 48 h de fermentación), utilizándose 48 botellas en cada corrida (*i.e.* 3 fuentes de TC × 2 PEG (ausencia o presencia) × 2 forrajes × 2 réplicas × 2 sacrificios).

Los extractos líquidos se concentraron según la cuantificación de TC obtenida por la metodología de Butanol-HCl, tal como se explicó en la sección anterior, de tal forma que para llegar a la dosis propuesta, se agregó 1 ml de extracto en cada botella, mientras que en las botellas Control se agregó 1 ml de agua destilada.

Por otro lado, en el exp. 2 se llevaron a cabo cinco tratamientos, a saber: un Control (sin TC) más cuatro tratamientos combinando dos fuentes de TC (*L. uliginosus* y Sauco) con dos tipos de extracciones (Agua y Etanol), también por duplicado y, esta vez, analizando 4 tiempos de fermentación (12, 24, 48 y 72 h post-incubación). En cada botella fue añadido el extracto al 2 % de inclusión, concentrado en 1 ml de preparado, añadiendo por su parte, en el Control, 1 ml de agua destilada. En cada corrida de producción de gas se utilizaron entonces 80 botellas (*i.e.* 5 tratamientos [Control, *L. uliginosus*-Agua, *L. uliginosus*-Etanol, Sauco-Agua y Sauco-Etanol] × 2 forrajes × 2 réplicas × 4 sacrificios). Ambos ensayos se repitieron 3 veces, en 3 semanas diferentes, correspondientes a 3 períodos (período ≡ repetición).

4.3.5. Producción de gas *in vitro* y análisis de los residuos de la fermentación

La metodología utilizada, obtención de licor ruminal y la relación licor ruminal: medio buffer en el exp. 1, fueron descriptos en las secciones 2.3.2 y 3.3.3 de los

capítulos 2 y 3, respectivamente. Brevemente, se utilizó contenido ruminal de 2 ovejas fistuladas, con una dieta de mantenimiento (heno de alfalfa y de grano de maíz, relación 70: 30), los sustratos se incubaron (*c.a.* 0,250 g de MS) molido en fresco (con hielo seco, tamaño de partícula= 1 mm) en botellas de vidrio color caramelo de 100 ml con los diferentes tratamientos en un baño termostático a 39°C en anaerobiosis durante 24 y/o 48 h. A cada botella se le agregó 36 ml de medio de incubación y 4 ml de licor ruminal (relación medio: licor, 9: 1), 1 ml de extracto de TC (o agua destilada en el caso del Control) y 1 ml de solución de PEG (o agua destilada para aquellos tratamientos sin PEG). A su vez se corrieron botellas blanco (*i.e.* Licor + medio, sin sustrato, tres para cada sacrificio), con extracto de Quebracho, *L. corniculatus*, o con agua destilada, generando así blancos utilizados como correctores de los tratamientos.

En el exp. 2, en cambio, el licor ruminal fue extraído de 3 bovinos raza Holstein, con canulas permanentes de rumen, que estaban pastoreando (hasta 3 horas antes de extraer el licor), un potrero con kikuyo. El licor se llevó desde el establecimiento donde fue recolectado hacia el laboratorio en termos previamente calentados, asegurando la anaerobiosis y temperatura hasta la inoculación. Por otro lado, las botellas, una vez inoculadas con el licor, el medio buffer (Menke y Steingass, 1988) y los extractos correspondientes, fueron trasladados a una estufa de ventilación forzada a 39 °C. También en este ensayo se utilizaron blancos (licor + medio, sin sustratos ni extractos), aunque fueron cuatro replicas para cada horario de sacrificio, a las cuales se les agregó, a la mitad 1 ml de etanol acuoso y a la otra mitad 1 ml de agua, para generar condiciones similares con los tratamientos a corregir.

En ambos experimentos se analizaron la presión (psi, con transductor de presión) y el volumen de gas (ml, con jeringa graduada) en 9 horarios para el exp. 1 (*i.e.* 1, 2, 4, 8, 12, 16, 24, 36 y 48 h) y 10 horarios en el exp. 2 (*i.e.* 2, 4, 7, 9, 12, 24, 30, 36, 48 y 72 h), para analizar la cinética de producción de gas acumulada (**PGA**), fase Lag, tasas horarias instantáneas de PG (ml/hr) y los parámetros de modelación no lineal (Ørskov y McDonald, 1979, $PGA = A + B \times (1 - e^{-c \times t})$). El gas colectado fue acumulado en viales de 20 y 50 ml, para el posterior análisis de la producción de metano *in vitro* (PCH₄) reportado en g de CH₄ afectado por kg MS incubada y desaparecida (**CH₄MSi** y **CH₄MSd**) y por kg de MO desaparecida (**CH₄MOd**, para más detalle ver sección 3.3.4, del Capítulo 3). Por su parte, la cuantificación de CH₄ del exp. 2 fue realizada en el Laboratorio de Análisis Instrumental de la Escuela de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín en un cromatógrafo de gases 6890-N (Agilent Technologies, USA).

Una vez interrumpida la fermentación con dos o tres gotas de timol saturado, se midió el pH con un peachímetro (Hanna instruments HI 9025) y se tomaron alícuotas, preservadas con ácido sulfúrico, para la determinación de AGV analizadas en un cromatógrafo Konik (modelo HRGC 5000b) o con ácido ortofosfórico para determinar concentración de N-NH₃ (kit de uremia, Wiener[®] lab). Por otro lado, el residuo insoluble de cada botella se filtró en vacío directamente dentro de bolsitas ANKOM[®] (ANKOM[®] Technology #F57 filter bags), para analizar la digestibilidad *in vitro* de la MS (**ivDMS**), de la MO (**ivDMO**) y de la fibra en detergente neutro (**DFDN**, % FDN).

Además, se evaluó el factor de partición (**FP**, mg/ml), que es la relación entre el sustrato real digerido y el volumen de gas producido en un determinado horario, que refleja la eficiencia de síntesis de biomasa microbiana (**BM**). A su vez, se evaluó la producción de BM, según Blümmel et al. (1997c), tal como fue explicitado en la sección 3.3.6, del Capítulo 3.

4.3.6. Diseño experimental y análisis estadísticos

El arreglo experimental que se utilizó para ambos ensayos fue en bloques completos aleatorizados (DBCA) con un arreglo factorial, teniendo en cuenta los siguientes modelos:

Experimento 1:

$$Y_{ijklm} = \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \delta_l + (\alpha \times \gamma)_{ik} + (\alpha \times \delta)_{il} + (\gamma \times \delta)_{kl} + (\alpha \times \gamma \times \delta)_{ikl} + \varepsilon_{ijklm}$$

donde, Y_{ijk} = variable en estudio; α_i = sustratos ($i= 2$); β_j = bloque ($j= 3$); γ_k = fuente de TC ($k= 3$); δ_l = Ausencia o presencia de PEG ($l= 2$); $(\alpha \times \gamma)_{ik}$ = interacción entre sustratos y fuentes de TC; $(\alpha \times \delta)_{il}$ = interacción entre sustrato y PEG; $(\gamma \times \delta)_{kl}$ = interacción entre Fuentes de TC y PEG; $(\alpha \times \gamma \times \delta)_{ikl}$ = triple interacción; ε_{ijkl} = error experimental ($l=3$). En este análisis se evaluaron las interacciones en cada parámetro analizado y al corroborar que no eran significativas, se eliminaron del modelo.

Experimento 2:

$$Y_{ijkl} = \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha \times \gamma)_{ik} + \varepsilon_{ijkl}$$

donde, Y_{ijk} = variable en estudio; α_i = sustratos ($i= 2$); β_j = bloque ($j= 3$); γ_k = tratamiento ($k= 5$); $(\alpha \times \gamma)_{ik}$ = interacción entre sustrato y tratamiento; ε_{ijkl} = error experimental ($l=3$). En las interacciones que fueron significativas se efectuó un análisis mediante la opción Slice por tratamiento, para evaluar el efecto del tratamiento en cada sustrato.

En ambos experimentos se realizaron 3 períodos (*i.e.* Período≡ Bloque≡ Repetición) separados en el tiempo. Las variables fueron analizadas mediante ANOVA usando el procedimiento GLM del paquete estadístico “SAS” versión 9.1 (SAS, 2002; SAS® Institute, Cary, NC.). Se realizaron comparaciones múltiples para evaluar las medias, usando el Test de Tukey (para los sustratos y las interacciones) o Dunnett (para contrastar el Control contra la adición de TC) con un nivel de significancia $p < 0,05$.

4.4. Resultados

4.4.1. Experimento 1

4.4.1.1. *Producción de metano in vitro*

Al analizar la PCH₄, MM produjo más CH₄ que el RG en todas las formas reportadas y en los 2 horarios de evaluación (p< 0,05, Cuadro 4.2). Por otro lado, la adición de TC (de ambas fuentes) generó mayores valores, tanto a 24 como a 48 h (p< 0,05). Sin embargo, no hubo efecto por la adición de PEG (p> 0,05).

4.4.1.2. *Digestibilidad in vitro*

El estudio de digestibilidad a las 48 h únicamente mostró diferencias entre los sustratos utilizados (p< 0,05), donde RG tuvo mayores digestibilidades (tanto de la MS, MO y DFDN, Cuadro 4.3). Sin embargo, a las 24 h se mostró que Quebracho redujo la digestibilidad, medida a través de todas las formas (p< 0,05), mientras que el agregado de PEG produjo una mejora en las digestibilidades de los tratamientos (p< 0,05).

4.4.1.3. *Cinética de la producción de gas in vitro*

Para analizar la cinética de fermentación de acuerdo al modelo no lineal propuesto por Ørskov y McDonald (1979) (*i.e.* $PGAN = A + B \times (1 - e^{-c \times t})$) donde PGAN corresponde a la producción de gas acumulada post-corrección con blancos. El parámetro A (*i.e.* fracción rápidamente soluble) presentó diferencias solo entre Sustratos (p< 0,05, Cuadro 4.4), aunque los valores fueron negativos, RG presentó un valor más cercano a cero. Además, el RG tuvo menor PGAN potencial (reflejada por el Par B) y una tasa más rápida (Par C), que su contraparte, MM. Además, presentó menor fase Lag (menor a 1 hora, p< 0,05), y en mayores tasas en las primeras horas (T1 y T10), aunque a las 42 h, MM produjo más gas (p< 0,05).

Al evaluar los tratamientos, y siempre comparando con el Control, si bien ambos extractos de TC presentaron una mayor producción de gas potencial (p< 0,05, Par B), solo *L. corniculatus* tuvo una mayor tasa de B y mayores tasas instantáneas de PG en las primeras horas (2 veces más en T1, y un 27% más en T10). Mientras que al evaluar T42, la adición de ambos extractos produjo una mayor fermentación (p< 0,05). No hubo respuesta evidente por el agregado de PEG (p< 0,05). En la fase Lag se encontró una interacción explicada porque la disminución provocada por la adición de *L. corniculatus* solo se produjo en MM (Control= 2,03, *L. corniculatus*= 1,05, EEM= 0,156, p< 0,05), mientras que en RG no hubo diferencias (Media general= 0,97, p> 0,05).

Cuadro 4.2. Producción de metano (g/kg) después de 24 o 48 h de fermentación, afectado por MS incubada (CH₄-MSi) o digerida (CH₄-MSd), MO digerida (CH₄-MOd) o como la proporción de energía perdida como metano (Y_m, mcal/mcal) de 2 forrajes con el agregado de extracto de taninos condensados (TC).

	24 h de incubación				48 h de incubación			
	CH ₄ -MSi	CH ₄ -MSd	CH ₄ -MOd	Y _m	CH ₄ -MSi	CH ₄ -MSd	CH ₄ -MOd	Y _m
Sustratos¹								
MM	12,5	16,1	16,3	3,76	14,7	17,4	17,2	4,44
RG	11,1	13,1	12,2	3,34	11,8	13,2	12,5	3,56
EEM ²	0,63	0,78	0,83	0,189	0,68	0,82	0,83	0,206
Fuente de TC³								
Control	9,5 _a	11,7 _a	11,5 _a	2,9 _a	10,7 _a	12,3 _a	12,0 _a	3,23 _a
<i>L. cornic.</i>	14,0 _b	17,2 _b	16,4 _b	4,2 _b	13,9 _b	16,0 _b	15,6 _b	4,20 _b
Quebracho	11,8 _b	15,0 _b	14,8 _b	3,6 _b	15,1 _b	17,7 _b	17,0 _b	4,55 _b
EEM	0,77	0,96	1,01	0,231	0,84	1,01	1,03	0,254
Inclusión de PEG⁴								
NP	11,9	14,8	14,3	3,6	13,0	15,0	14,6	3,93
PEG	11,7	14,4	14,2	3,5	13,4	15,5	15,1	4,05
EEM	0,63	0,78	0,83	0,189	0,68	0,82	0,83	0,206
Estadístico (valor F)								
Sustrato (n=18)	4,69	14,54	23,96	4,72	17,67	24,64	31,61	17,71
Fuente de TC (n=12)	17,42	16,89	11,99	17,36	14,77	14,34	12,64	14,83
PEG (n=18)	0,03	0,31	0,03	0,04	0,35	0,34	0,38	0,34
Significancia⁵								
Sustrato	*	***	***	*	***	***	***	***
Fuente de TC	***	***	***	***	***	***	***	***
PEG	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

¹MM, *Megathyrus maximus*; RG, Raigrás (*Lolium perenne*). ²EEM, error estándar de la media; ³Control, sin adición de TC; *L. cornic.*, extracto de *Lotus corniculatus*, Quebracho, Extracto comercial de *Quebracho sp.* ⁴NP, ausencia de polietilenglicol, PEG, adición de polietilenglicol. ⁵ns, no significativo (p > 0,05); *, p < 0,05; ***, p < 0,001; Comparaciones según Dunnett para la Fuente de TC, donde letras diferentes en cada columna indican diferente a Control (p < 0,05).

Cuadro 4.3 Digestibilidad *in vitro* de la materia seca (ivDMS), de la materia orgánica (ivDMO, g/kg MS) de la FDN (DFDN, g/ kg FDN) y FDN digestible (FDNd, g FDN/kg MS) después de 24 y 48 h de fermentación de 2 forrajes con de extracto de taninos condensados (TC) de *Lotus corniculatus*, *Quebracho sp.* o sin TC (Control), con o sin la adición de polietilenglicol (PEG o NP).

	24 h de fermentación				48 h de fermentación			
	ivDMS	ivDMO	DFDN	FDNd	ivDMS	ivDMO	DFDN	FDNd
Sustratos¹								
MM	776	769	672	122	843	850	799	145
RG	852	893	800	119	896	942	908	135
EEM ²	5,7	6,5	13,6	2,4	3,9	4,3	7,9	1,6
Fuente de TC³								
Control	824 _a	839 _a	750 _a	123	873	900	859	141
<i>L. cornic.</i>	824 _a	845 _a	757 _a	124	870	897	856	140
Quebracho	794 _b	810 _b	701 _b	115	866	891	844	139
EEM	7,0	8,0	16,7	2,9	4,7	5,2	9,7	1,9
Inclusión de PEG								
NP	807	822	722	118	868	895	851	140
PEG	820	840	750	123	871	897	855	140
EEM	5,7	6,5	13,6	2,4	3,9	4,3	7,9	1,5
Estadístico (valor F)								
Sustrato (n=18)	174,93	366,05	88,94	1,34	187,36	459,84	190,31	40,69
Fuente de TC (n=12)	12,03	10,75	6,68	6,17	0,92	1,30	1,28	0,87
PEG (n=18)	4,70	7,25	4,38	4,03	0,56	0,37	0,34	0,16
Significancia⁴								
Sustrato	***	***	***	ns	***	***	***	***
Fuente de TC	***	***	**	**	ns	ns	ns	ns
PEG	*	*	*	†	ns	ns	ns	ns

¹MM, *Megathyrus maximus*; RG, Raigrás (*Lolium perenne*). ²EEM, error estándar de la media; ³Control, sin adición de TC; *L. cornic.*, extracto de *Lotus corniculatus*, Quebracho, Extracto comercial de *Quebracho sp.* ⁴ns, no significativo (p > 0,05); †, p < 0,10; *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001; Comparaciones según Dunnett para la Fuente de TC, donde letras diferentes en cada columna indican diferente a Control (p < 0,05).

Cuadro 4.4 Cinética de producción de gas acumulada neta (PGAN), con los parámetros de un modelo no lineal (parámetros A, B y c del modelo según Orskov), Fase Lag (h) y tasas horarias de PGAN a las 1, 10 y 42 h (ml/h, T1, T10 y T42) de la fermentación de 2 forrajes con extracto de taninos condensados (TC) de *Lotus corniculatus*, *Quebracho sp.* o sin TC (Control), con o sin la adición de polietilenglicol (PEG o NP).

	PGA= A + B × (1 - e ^{-c × t})			Fase Lag	Tasas horarias de PG (ml/h)		
	Par A (ml)	Par B (ml)	Par c (h ⁻¹)		T1	T10	T42
Sustratos¹							
MM	-19,7	275	0,04	1,58	6,2	8,7	1,9
RG	-16,4	243	0,10	0,97	16,5	10,0	1,3
EEM ²	1,08	6,3	0,009	0,079	1,53	0,33	0,06
Fuente de TC³							
Control	-17,7	231 _a	0,05 _a	1,55 _a	6,5 _a	8,6 _a	1,3 _a
<i>L. cornic.</i>	-16,6	278 _b	0,10 _b	0,90 _b	19,5 _b	11,0 _b	1,5 _b
Quebracho	-20,0	267 _b	0,06 _a	1,38 _a	8,0 _a	8,4 _a	2,0 _b
EEM	1,32	7,7	0,012	0,137	1,87	0,40	0,07
Inclusión de PEG							
NP	-18,1	258	0,07	1,29	11,0	9,2	1,6
PEG	-18,0	261	0,07	1,26	11,7	9,4	1,6
EEM	1,08	6,3	0,009	0,079	1,53	0,33	0,06
Estadístico (valor F)							
Sustrato (n=18)	8,92	27,11	121,00	59,99	45,93	16,90	133,99
Fuente de TC (n=12)	3,23	21,38	31,00	24,41	28,59	26,25	45,31
PEG (n=18)	0,01	0,20	1,00	0,18	0,21	0,45	0,46
Sust × Fuente de TC (n=6)	0,35	1,21	31,00	6,03	-	-	-
Significancia⁴							
Sustrato	**	***	***	***	***	***	***
Fuente de TC	†	***	***	***	***	***	***
PEG	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Sust × Trat	ns	ns	***	**	-	-	-

¹MM, *Megathyrus maximus*; RG, Raigrás (*Lolium perenne*). ²EEM, error estándar de la media; ³Control, sin adición de TC; *L. cornic.*, extracto de *Lotus corniculatus*, Quebracho, Extracto comercial de *Quebracho sp.* ⁴ns, no significativo (p > 0,05); †, p < 0,10; **, p < 0,01; ***, p < 0,001; Comparaciones según Dunnett para la Fuente de TC, donde letras diferentes en cada columna indican diferente a Control (p < 0,05).

4.4.1.4. *Caracterización del licor ruminal*

El licor ruminal se caracterizó mediante el análisis del pH, que mostró diferencias entre sustratos a las 24 h (*i.e.* RG > MM, $p < 0,05$, Cuadro 4.5), entre fuentes de TC a las 24 y 48 h (*i.e.* *L. corniculatus* < Control, $p < 0,05$), y aumentando con el agregado de PEG ($p < 0,05$). Por su parte RG presentó mayores valores de N-NH₃ ($p < 0,05$) y el agregado de extracto de TC no produjo diferencias a las 24 h, sin embargo, indujo un aumento a las 48 h ($p < 0,05$). Por otro lado, se evaluó la eficiencia de síntesis de proteína microbiana, por medio del FP, donde RG fue superior a MM, a las 48 h ($p < 0,05$), mientras que la inclusión de TC redujo el FP a las 24 y 48 h y concomitantemente se redujo BM. La inclusión de PEG, en cambio, no afectó a estos parámetros ($p > 0,05$).

El análisis de los AGV mostró que no hubo diferencias entre ambos sustratos para las 24 h ($p > 0,05$), sin embargo para las 48 h RG presentó mayores concentraciones de todos los AGV ($p < 0,05$) sin haber modificaciones en la relación Ac/Prop (Cuadro 4.6 y Cuadro 4.7).

Por su parte, el agregado de PEG no presentó efecto alguno (24 y 48 h; salvo para iso-But a las 48 h, $p < 0,05$), pero la inclusión de los extractos de TC modificó los perfiles de fermentación. Mientras que el extracto de *L. corniculatus*, tanto a las 24 como a las 48 h generó una mayor producción de acético, propiónico, butírico y AGVT, la inclusión de TC de Quebracho no generó diferencias ($p > 0,05$) con respecto al Control a las 24 h, pero a las 48 h de fermentación generó un aumento en acético que provocó, a su vez, una mayor concentración de AGVt.

En adición a lo anterior, las relaciones de acético: propiónico cuando se agregó *L. corniculatus* se redujeron mientras que cuando se agregó Quebracho aumentó, tanto a las 24 como a las 48 h.

Cuadro 4.5 Caracterización del licor ruminal, pH y concentración de nitrógeno amoniacal (N-NH₃, mg/l), producción de biomasa microbiana (BM, mg/100 mg de MO desaparecida) y eficiencia de síntesis de BM expresado como factor de partición (FP, mg/ml) después de 24 y 48 h de fermentación de 2 forrajes con extracto de taninos condensados (TC) de *Lotus corniculatus*, *Quebracho sp.* o sin TC (Control), con o sin la adición de polietilenglicol (PEG o NP).

	pH		N-NH ₃		FP		BM	
	24	48	24	48	24	48	24	48
Sustratos¹								
MM	7,08	7,05	6,4	8,9	4,4	3,4	47,5	33,8
RG	7,14	7,05	7,9	11,7	4,3	3,7	46,3	39,0
EEM ²	0,009	0,009	0,42	0,60	0,19	0,14	2,48	2,59
Fuente de TC³								
Control	7,13 _a	7,08 _a	7,1	9,2 _a	5,0 _a	4,1 _a	54,6 _a	45,7 _a
<i>L. cornic.</i>	7,07 _b	7,04 _b	7,5	10,9 _b	3,5 _b	3,1 _b	36,1 _b	28,4 _b
Quebracho	7,12 _a	7,04 _b	6,9	10,8 _b	4,6 _b	3,4 _b	50,0 _b	35,1 _b
EEM	0,114	0,111	0,51	0,73	0,21	0,15	2,56	2,65
Inclusión de PEG								
NP	7,09	7,04	6,9	10,1	4,3	3,6	45,8	37,0
PEG	7,12	7,07	7,4	10,5	4,4	3,5	47,9	35,8
EEM	0,009	0,009	0,42	0,60	0,12	0,09	1,48	1,53
Estadístico (valor F)								
Sustrato (n=18)	36,52	0,02	12,89	22,45	1,48	9,22	0,69	11,48
Fuente de TC (n=12)	13,54	11,68	0,83	3,39	52,94	45,64	56,42	42,91
PEG (n=18)	10,06	13,63	1,66	0,38	1,06	0,78	1,99	0,60
Significancia⁴								
Sustrato	***	ns	**	***	ns	**	ns	**
Fuente de TC	***	***	ns	*	***	***	***	***
PEG	**	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns

¹MM, *Megathyrus maximus*; RG, Raigrás (*Lolium perenne*). ²EEM, error estándar de la media; ³Control, sin adición de TC; *L. cornic.*, extracto de *Lotus corniculatus*, Quebracho, Extracto comercial de *Quebracho sp.* ⁴ns, no significativo (p > 0,05); *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001; Comparaciones según Dunnett para la Fuente de TC, donde letras diferentes en cada columna indican diferente a Control (p < 0,05).

Cuadro 4.6 Perfil de ácidos grasos volátiles (AGV) después de 24 h de fermentación de 2 forrajes con extracto de taninos condensados (TC) de *Lotus corniculatus*, *Quebracho sp.* o sin TC (Control), con o sin la adición de polietilenglicol (PEG o NP).

	AGV - 24 h de fermentación					
	Ac	Prop	iso-But	But	AGVT	Ac/Prop
Sustratos¹						
MM	40,2	11,2	0,6	5,0	57,0	3,7
RG	41,4	11,4	0,6	5,5	58,9	3,7
EEM ²	1,35	0,55	0,13	0,28	2,05	0,11
Fuente de TC³						
Control	37,0 _a	10,3 _a	0,7	4,9 _a	52,9 _a	3,6 _a
<i>L. cornic.</i>	44,6 _b	13,7 _b	0,9	5,9 _b	65,0 _b	3,3 _b
Quebracho	40,8 _a	9,9 _a	0,4	4,9 _a	55,9 _a	4,2 _b
EEM	1,66	0,67	0,16	0,34	2,51	0,13
Inclusión de PEG						
NP	40,4	11,1	0,6	5,3	57,4	3,7
PEG	41,1	11,5	0,6	5,2	58,5	3,7
EEM	1,35	0,55	0,13	0,28	2,05	0,11
Estadístico (valor F)						
Sustrato (n=18)	0,82	0,18	0,03	2,41	0,83	0,06
Fuente de TC (n=12)	10,45	19,45	4,33	5,87	12,68	21,67
PEG (n=18)	0,28	0,57	0,01	0,12	0,26	0,04
Significancia⁴						
Sustrato	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Fuente de TC	***	***	†	*	*	***
PEG	ns	ns	ns	ns	ns	ns

¹MM, *Megathyrus maximus*; RG, Raigrás (*Lolium perenne*). ²EEM, error estándar de la media; ³Control, sin adición de TC; *L. cornic.*, extracto de *Lotus corniculatus*, Quebracho, Extracto comercial de *Quebracho sp.* ⁴ns, no significativo (p> 0,05); †, p< 0,10; *, p< 0,05; ***, p< 0,001; Comparaciones según Dunnett para la Fuente de TC, donde letras diferentes en cada columna indican diferente a Control (p< 0,05).

Cuadro 4.7. Perfil de ácidos grasos volátiles (AGV) después de 48 h de fermentación de 2 forrajes con extracto de taninos condensados (TC) de *Lotus corniculatus*, *Quebracho sp.* o sin TC (Control), con o sin la adición de polietilenglicol (PEG o NP).

	AGV - 48 h de fermentación					
	Ac	Prop	iso-But	But	AGVT	Ac/Prop
Sustratos¹						
MM	43,3	11,7	0,8	5,4	61,3	3,7
RG	50,2	13,8	1,2	6,2	71,4	3,7
EEM ²	1,78	0,47	0,11	0,26	2,43	0,06
Fuente de TC³						
Control	41,1 _a	11,7 _a	1,0	5,3 _a	59,2 _a	3,5 _a
<i>L. cornic.</i>	48,3 _b	14,5 _b	1,0	6,4 _b	70,2 _b	3,3 _b
Quebracho	50,8 _b	12,0 _a	1,0	5,8 _a	67,5 _b	4,3 _b
EEM	2,18	0,57	0,14	0,32	2,98	0,08
Inclusión de PEG						
NP	45,8	12,5	0,9	5,9	65,1	3,7
PEG	47,7	13,0	1,1	5,7	67,5	3,7
EEM	1,78	0,47	0,11	0,26	2,43	0,06
Estadístico (valor F)						
Sustrato (n=18)	14,95	19,40	10,25	9,65	17,26	0,68
Fuente de TC (n=12)	10,65	14,70	0,09	5,41	8,61	75,83
PEG (n=18)	1,10	0,81	4,85	0,44	0,94	0,20
Significancia⁴						
Sustrato	***	***	**	**	***	ns
Fuente de TC	***	***	ns	*	**	***
PEG	ns	ns	*	ns	ns	ns

¹MM, *Megathyrsus maximus*; RG, Raigrás (*Lolium perenne*). ²EEM, error estándar de la media; ³Control, sin adición de TC; *L. cornic.*, extracto de *Lotus corniculatus*, Quebracho, Extracto comercial de *Quebracho sp.* ⁴ns, no significativo (p > 0,05); *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001; Comparaciones según Dunnett para la Fuente de TC, donde letras diferentes en cada columna indican diferente a Control (p < 0,05).

4.4.2. Experimento 2

4.4.2.1. *Producción de metano in vitro*

El RG produjo más CH₄ que el KK solo a 24 h (expresado por gr MS incubada, $p < 0,05$, Cuadro 4.8). Se encontró un efecto asociado a la adición de Sauco, donde el Sauco-Agua superó significativamente al Control a las 12 h ($p < 0,05$), mientras que Sauco-Etanol produjo un aumento a las 24 y 48 h para CH₄-MSd y CH₄-MOd ($p < 0,10$) con respecto al Control. Aunque para CH₄-MSd a las 48 h se encontró una interacción explicada por el aumento de Sauco-Etanol con respecto al Control solo en KK (Control=100,3, Sauco-Etanol = 346,7, EEM= 58,64, $p < 0,05$).

4.4.2.2. *Digestibilidad in vitro*

El RG presentó mejores digestibilidades que KK para los cuatro horarios de sacrificios ($p < 0,05$, Cuadro 4.9). Con respecto al efecto de los extractos, en aquellos en los cuales se utilizó agua para la remoción de los TC (*i.e.* Lotus-Agua y Sauco-Agua), se visualizó una mejora en la ivDMS y en la ivDMO de hasta el 71 y 63 % para Lotus-Agua y Sauco-Agua, respectivamente. Mientras que la inclusión de Lotus-Etanol también produjo mejoras con respecto al Control, pero solo a las 24 y 72 h ($p < 0,05$). Por su parte Sauco-Etanol se comportó igual que el Control ($p > 0,05$). Una interacción Sustrato \times Tratamiento fue detectada a las 24 h, para ambos parámetros, donde los extractos con agua tuvieron mejores digestibilidades que el Control ($p < 0,05$).

Cuadro 4.8 Producción de metano (g/kg) después de 12, 24 o 48 h de fermentación, afectado por MS incubada (CH₄-MSi) o digerida (CH₄-MSd) o MO digerida (CH₄-MOd) de 2 forrajes con el agregado de extracto de taninos condensados.

	CH ₄ -MSi			CH ₄ -MSd			CH ₄ -MOd		
	12	24	48	12	24	48	12	24	48
Sustratos¹									
Kikuyo	21,2	42,1	132,8	40,1	88,6	209,8	44,2	104,0	221,8
Raigrás	21,6	68,3	146,7	34,1	96,3	198,4	35,5	98,4	201,8
EEM ²	6,82	28,55	59,47	10,30	42,13	59,67	9,6	39,53	39,01
Tratamientos³									
Control	15,4 _a	38,7	98,0	24,6 _a	73,9	169,6 _a	26,8 _a	96,8	157,5 _a
Lotus-Agua	25,9 _a	74,8	169,3	39,7 _a	100,0	206,0 _a	41,9 _a	101,8	207,6 _a
Lotus-Etanol	14,1 _a	58,8	117,8	31,6 _a	72,5	153,9 _a	34,9 _a	79,1	162,0 _a
Sauco-Agua	34,0 _b	64,6	133,6	52,1 _b	91,7	171,3 _a	54,4 _b	92,6	198,2 _a
Sauco-Etanol	17,7 _a	39,3	180,0	37,4 _a	124,0	319,8 _b	41,3 _a	135,6	333,7 _b
EEM	6,03	25,21	53,25	9,08	37,21	53,44	10,9	34,84	37,53
Estadístico (valor F)									
Sust (n=15)	0,02	4,62	0,36	1,78	0,16	0,23	3,34	0,09	1,50
Trat (n=6)	6,59	1,48	1,82	4,03	0,99	5,60	3,51	1,01	14,74
Sust × Trat (n=3)	0,31	2,38	2,67	1,24	3,02	3,65	1,11	3,08	3,25
Significancia⁴									
Sust	ns	*	ns	ns	ns	ns	†	ns	ns
Trat	**	ns	ns	*	ns	**	*	ns	***
Sust × Trat	ns	†	†	ns	†	* ⁵	ns	†	†

¹Kikuyo, *Penisetum purpureum*; Raigrás, *Lolium perenne*. ²EEM, error estándar de la media; ³Control, sin adición de TC; Lotus-Agua, extracto de *Lotus uliginosus* con agua, Lotus-Etanol, extracto de *Lotus uliginosus* con etanol, Sauco-Agua, extracto de *Sambucus peruviana* con agua, Sauco-Etanol, extracto de *Sambucus peruviana* con etanol. ⁴ns, no significativo, (p > 0,05); †, p < 0,10; *, p < 0,05; **, p < 0,01; ***, p < 0,001. ⁵Interacción Sust × Trat; KK, Control=100,3, Sauco-Etanol = 346,7, p < 0,05; RG, p > 0,05, EEM= 58,64. Comparaciones de acuerdo a Dunnett para los tratamientos, donde letras diferentes en cada columna indican diferente a Control (p < 0,05).

Cuadro 4.9 Digestibilidad *in vitro* de la materia seca (ivDMS) y de la materia orgánica (ivDMO, g/ kg MS) después de 12, 24, 48 y 72 h de fermentación de 2 forrajes con la adición de diferentes extractos de taninos condensados.

	ivDMS				ivDMO			
	12 h	24 h	48 h	72 h	12 h	24 h	48 h	72 h
Sustratos¹								
Kikuyo	426	504	582	623	381	466	552	597
Raigrás	566	685	741	730	544	671	731	719
EEM ²	15,3	41,5	58,2	52,1	16,8	45,1	64,5	57,9
Tratamientos³								
Control	449 _a	484 _a	530 _a	512 _a	411 _a	449 _a	499 _a	479 _a
Lotus-Agua	595 _b	734 _b	804 _b	825 _b	570 _b	721 _b	796 _b	819 _b
Lotus-Etanol	448 _a	572 _b	633 _a	664 _b	410 _a	544 _b	610 _a	645 _b
Sauco-Agua	562 _b	675 _b	793 _b	789 _b	534 _b	657 _b	784 _b	780 _b
Sauco-Etanol	428 _a	506 _a	548 _a	593 _a	388 _a	472 _a	518 _a	568 _a
EEM	13,5	36,7	57,3	51,5	14,8	39,9	62,3	56,5
Estadístico (valor F)								
Sust (n=15)	479,71	116,19	38,13	19,76	534,73	125,58	40,99	21,95
Trat (n=6)	118,18	33,26	20,88	23,10	115,44	33,36	20,78	23,16
Sust × Trat (n=3)	1,37	3,68	1,50	2,96	1,53	3,81	1,58	3,01
Significancia⁴								
Sust	***	***	***	***	***	***	***	***
Trat	***	***	***	***	***	***	***	***
Sust × Trat	ns	*	ns	†	ns	*	ns	†

¹Kikuyo, *Penisetum purpureum*; Raigrás, *Lolium perenne*. ²EEM, error estándar de la media; ³Control, sin adición de TC; Lotus-Agua, extracto de *Lotus uliginosus* con agua, Lotus-Etanol, extracto de *Lotus uliginosus* con etanol, Sauco-Agua, extracto de *Sambucus peruviana* con agua, Sauco-Etanol, extracto de *Sambucus peruviana* con etanol. ⁴ns, no significativo ($p > 0,05$); †, $p < 0,10$; *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$; Comparaciones de acuerdo a Dunnett para los tratamientos, donde letras diferentes en cada columna indican diferente a Control ($p < 0,05$).

Cuadro 4.10 Cinética de producción de gas acumulada neta (PGAN), con los parámetros de un modelo no lineal ($PGA = A + B \times (1 - e^{-c \times t})$), Fase Lag (h) y tasas horarias instantáneas de PGAN a las 3, 11, 33 y 60 h (T3, T11 T33 y T60) de la fermentación de 2 forrajes con la adición de extractos de taninos condensados.

	Parámetros			Fase Lag	Tasas horarias (ml/h)			
	Par A (ml)	Par B (ml)	Par c (h^{-1})		T3	T11	T33	T60
Sustratos¹								
Kikuyo	-5,9	454	0,03	0,9	12,3	11,9	4,9	2,5
Raigrás	7,1	493	0,04	-0,5	22,5	13,4	6,2	4,0
EEM ²	6,88	87,4	0,012	0,32	1,91	1,67	1,45	0,85
Tratamientos³								
Control	-0,5	327 _a	0,02 _a	0,8 _a	11,2 _a	7,0 _a	4,8	3,9 _a
Lotus-Agua	-5,4	429 _a	0,05 _b	0,3 _a	16,4 _b	17,1 _b	4,9	1,4 _b
Lotus-Etanol	2,6	662 _b	0,02 _a	0,5 _a	19,1 _b	12,1 _b	6,7	5,0 _a
Sauco-Agua	1,1	462 _a	0,05 _b	0,0 _b	20,4 _b	15,1 _b	5,9	1,6 _b
Sauco-Etanol	5,2	487 _a	0,04 _a	-0,4 _b	19,9 _b	11,6 _b	5,5	4,3 _a
EEM	6,08	76,9	0,010	0,32	1,84	1,59	1,39	0,76
Estadístico (valor F)								
Sust (n=15)	20,48	0,94	1,55	71,55	153,22	4,81	4,30	15,56
Trat (n=6)	1,39	7,26	7,31	6,00	16,78	24,40	1,23	17,35
Sust × Trat (n=3)	1,45	0,77	0,09	7,26	0,60	1,15	0,34	3,65
Significancia⁴								
Sust	***	ns	ns	***	***	*	†	**
Trat	ns	**	**	**	***	***	ns	***
Sust × Trat	ns	ns	ns	** ⁵	ns	ns	ns	†

¹Kikuyo, *Penisetum purpureum*; Raigrás, *Lolium perenne*. ²EEM, error estándar de la media; ³Control, sin adición de TC; Lotus-Agua, extracto de *Lotus uliginosus* con agua, Lotus-Etanol, extracto de *Lotus uliginosus* con etanol, Sauco-Agua, extracto de *Sambucus peruviana* con agua, Sauco-Etanol, extracto de *Sambucus peruviana* con etanol. ⁴ns, no significativo ($p > 0,05$); †, $p < 0,10$; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$. ⁵Interacción Sust × Trat; KK, Control= 2,21, Lotus-Agua= 0,37, Sauco-Agua= 0,27 h, $p < 0,05$; RG, $p > 0,05$, EEM= 0,39. Comparaciones de acuerdo a Dunnett para los Tratamientos, donde letras diferentes en cada columna indican diferente a Control ($p < 0,05$).

4.4.2.3. *Cinética de producción de gas in vitro*

Al evaluar la cinética, RG presentó un mayor Par A ($p < 0,05$), aunque sin diferencias en Par B y c, con respecto a KK ($p > 0,05$, Cuadro 4.10). Por otro lado, RG presentó mayores tasas de PG instantánea a las 3, 11 y 60 h. Con respecto a los tratamientos, evaluados contra el Control, Lotus-Etanol presentó mayores PGAN potencial ($p < 0,05$, Par B), sin embargo los extractos con Agua presentaron mayores Par c ($p < 0,05$), comparado con el Control.

La adición de extractos de TC produjo mayores tasas durante las primeras horas (T3 y T11, $p < 0,05$), mientras que a las 60 h (*i.e.* T60), Lotus-Agua y Sauco-Agua provocaron un descenso de la PG. Con respecto a la fase Lag, el descenso provocado por el agregado de extractos con Agua, solo se detectó en KK (Control= 2,21, Lotus-Agua= 0,37, Sauco-Agua= 0,27 h, EEM= 0,39, $p < 0,05$).

4.4.2.4. *pH y partición de la energía durante la fermentación in vitro*

En el exp. 2 se tomaron muestras de la misma forma que en el exp. 1, del líquido residual de fermentación en los cuatro horarios de sacrificios, para evaluar AGV y concentración de N-NH₃ pero lamentablemente, las muestras reservadas a -20°C se descongelaron accidentalmente por varias horas, antes de ser analizadas. De todas formas, como las muestras no estaban completamente descongeladas (a simple vista), se analizaron para determinar si la interrupción de la cadena de frío no fue suficiente para alterar las muestras, sin embargo, los valores, tanto de AGV como de N-NH₃, fueron mucho menores de lo esperable, comparado con otras muestras de ensayos análogos que se estaban corriendo en paralelo con los mismos sustratos, por lo que se optó por no reportar los datos obtenidos. Con respecto al pH, no hubo diferencias significativas a las 12 y a las 24 h (media general= 7,12 y 7,32, EEM= 0,044 y 0,129 para cada horario, $p < 0,05$, Cuadro 4.11).

Mientras que a las 48 y 72 h las botellas fermentando KK presentaron un pH mayor que RG (pH 48h, KK= 7,19, RG= 7,08; EEM= 0,046; pH 72h, KK= 7,10, RG= 7,02; EEM= 0,072; $p < 0,05$). El agregado de los extractos con agua produjo una disminución con respecto al Control a las 48 h (Control= 7,19, Agua= 7,09; EEM= 0,040; $p < 0,05$). Con respecto al FP, en ninguno de los horarios estudiados los sustratos se diferenciaron ($p > 0,05$, Cuadro 4.11), sin embargo, se detectó una disminución producida por los extractos a las 12 y a las 24 h ($p < 0,05$). A las 72 h, solo los extractos con Etanol (*i.e.* Lotus-Etanol y Sauco-Etanol) indujeron una disminución en el FP ($p < 0,05$).

Cuadro 4.11 Eficiencia de síntesis de BM expresado como factor de partición (mg de MO digerida/ml de gas producido) de dos forrajes con extracto de taninos condensados.

	Factor de partición			
	12 h	24 h	48 h	72 h
Sustratos¹				
Kikuyo	3,1	2,7	1,7	1,6
Raigrás	3,0	2,5	1,8	1,6
EEM ²	0,39	0,48	0,16	0,18
Tratamientos³				
Control	4,2 _a	3,3 _a	1,9 _a	1,8 _a
Lotus-Agua	2,8 _b	2,4 _b	1,9 _a	2,0 _a
Lotus-Etanol	2,8 _b	2,4 _b	1,7 _a	1,3 _b
Sauco-Agua	2,9 _b	2,3 _b	1,9 _a	1,7 _a
Sauco-Etanol	2,4 _b	2,4 _b	1,5 _b	1,3 _b
EEM	0,34	0,44	0,16	0,17
Estadístico (valor F)				
Sust (n=15)	0,48	1,30	1,67	0,65
Trat (n=6)	12,88	3,40	4,38	14,28
Sust × Trat (n=3)	0,66	1,09	0,55	0,47
Significancia⁴				
Sust	ns	ns	ns	ns
Trat	***	*	*	***
Sust × Trat	ns	ns	ns	ns

¹Kikuyo, *Penisetum purpureum*; Raigrás, *Lolium perenne*. ²EEM, error estándar de la media; ³Control, sin adición de TC; Lotus-Agua, extracto de *Lotus uliginosus* con agua, Lotus-Etanol, extracto de *Lotus uliginosus* con etanol, Sauco-Agua, extracto de *Sambucus peruviana* con agua, Sauco-Etanol, extracto de *Sambucus peruviana* con etanol. ⁴ns, no significativo ($p > 0,05$); *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$. Comparaciones de acuerdo a Dunnett para los Tratamientos, donde letras diferentes en cada columna indican diferente a Control ($p < 0,05$).

4.5. Discusión

El propósito final de este capítulo fue analizar el efecto de extractos de TC de diferentes fuentes, obtenidos por el lavado diferencial con distintos solventes, en la fermentación de forrajeras templadas y tropicales.

Los TC actúan como protectores de la degradación proteica (Aerts et al., 1999; McNabb et al., 1997) y de carbohidratos (Lascano et al., 1995) a nivel ruminal y, dependiendo de la dosis, la fuente y el tipo de material con el que se extraigan, tienen gran potencial para mitigar los gases de fermentación (Knapp et al., 2014), fundamentalmente por la actividad antimicrobiana contra microorganismos metanogénicos (Jayanegara et al., 2009). Teniendo en cuenta que las forrajeras tropicales son señaladas como grandes productoras de CH₄ (Ulyatt et al., 2002), se espera que el agregado de extractos de TC a la fermentación de estas forrajeras no solo disminuya el potencial metanogénico de las mismas, sino también se especula que el descenso en PCH₄ esté relacionado con un cambio en el perfil fermentativo de los AGV y/o la BM (Guo et al., 2009).

4.5.1. Características fermentativas de forrajeras tropicales y templadas

En los dos experimentos se contrastó el efecto de los extractos de TC con un forraje templado de referencia (RG, *Lolium perenne*) con una forrajera megatérmica (MM, *Megathyrus maximus*, exp. 1 o KK, *Penisetum purpureum*, exp. 2). Tal como se preveía RG presentó mayores DivMS y DivMO que las megatérmicas (Leng, 1990), y en el exp. 1 además RG tuvo mayor DFDN; con resultados muy similares a los reportados en la sección 3.4.2.3 del Capítulo 3.

Más allá de las diferencias entre Forrajes C3 y C4, también se observaron, comparando los dos experimentos, las diferencias entre las dos forrajeras tropicales en estudio. Teniendo en cuenta que se analizó la digestibilidad verdadera por Goering y Van Soest, tal como se detallara en la Sección 3.3.6 del Capítulo 3, MM presentó digestibilidades verdaderas por encima del 77% y 84% y con una DFDN del 67 y 80%, a las 24 y 48 h, respectivamente. Por otro lado, el KK que no pasó el 60% de aprovechamiento de la MS sino hasta las 72 h de fermentación, en concordancia con los trabajos de Singh et al. (2014).

La mayor PG de RG en los horarios tempranos, sumado a la menor fase Lag comparado con las forrajeras tropicales, evidenció una mayor y más rápida fermentación, coherente con la descripción de la sección 3.4.2.4 del Capítulo 3.

Aunque no sean estrictamente comparables, resultaron notables las diferencias entre las características de digestión y fermentación de los RG utilizados en los exp. 1 y 2 (Figura 4.1), dado que, a las 24 h, la ivDMS fue en el exp. 1 de 85,2, mientras que en el exp. 2, fue de 68,5 % y el factor de partición fue en el exp 1 de 4,3 y en el exp 2 de 2,5 mg de MO/ ml de gas producido. Es necesario tener en cuenta al hacer esta comparación que estas diferencias responderían a variaciones propias de la especie y a los procedimientos de preparación de las muestras, ya que el RG del exp. 1 correspondió a láminas cosechadas en Buenos Aires (Argentina) y se utilizaron en

fresco (*i.e.* molido en fresco, con hielo seco. Para más detalle ver Sección 3.3.1 del Capítulo 3) en el Laboratorio de Nutrición Animal de la FAUBA, mientras que en el exp. 2, se utilizó RG cosechado en Antioquia, Colombia, sin discriminar entre hoja y tallo y que fue secado para su utilización a 65°C durante 4 horas, en el Laboratorio de la SUI, Universidad de Antioquia.

Con respecto a la PCH₄, en el exp. 1, si bien no se encontraron diferencias entre estos mismos sustratos evaluados en el Capítulo 3 (ver Cuadro 3.3, de la Sección 3.4.2.2), la mayor producción por parte de MM en contraste con RG, está en concordancia con lo reportado por varios autores que afirman que las gramíneas C4 producen más CH₄ por kg de MS o MO digerida que las C3 (Kurihara et al., 1999; Ulyatt et al., 2002).

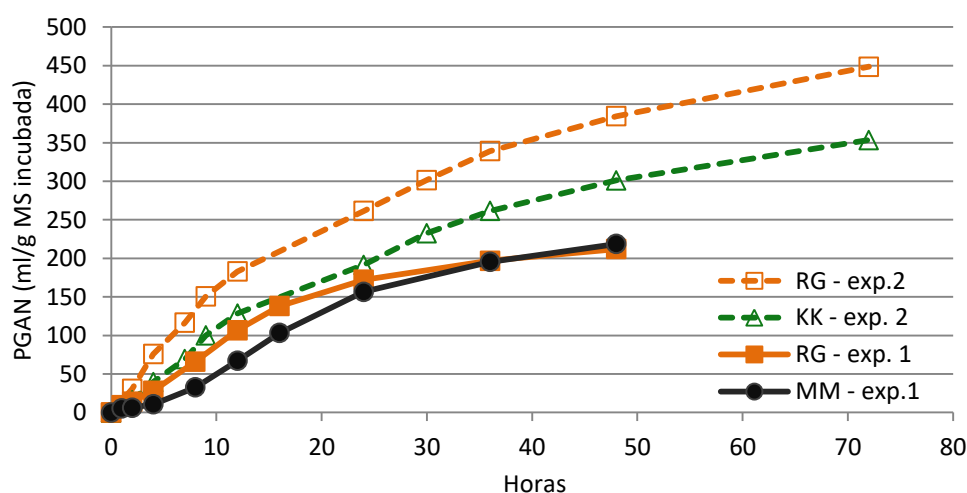


Figura 4.1. Producción de gas acumulada neta (PGAN, ml/g de MS incubada) de los sustratos utilizados en los dos experimentos (exp. 1, n=18 y exp. 2, n=18) que conforman el presente capítulo (RG, raigrás, *Lolium perenne*, KK, kikuyo, *Penisutem purpureum*; MM, *Megathyrus maximus*).

Sin embargo, en el meta-análisis realizado por Archiméde et al. (2011), se compararon gramíneas tropicales y templadas al mismo nivel de fibra, consumo y digestibilidad y encontraron producciones 10 – 17 % mayor en las tropicales. Estas diferencias podrían surgir, en parte, de las discrepancias cuali y cuantitativas de la producción total de AGV, que estarían definidas estequiométricamente por la composición de los productos de fermentación. Teniendo en cuenta que tanto una mayor concentración de AGV totales como los perfiles de AGV acetogénicos (*i.e.* mayores relaciones acético: propiónico) liberarían al medio mayor cantidad de H⁺ con poder metanogénico (Janssen, 2010), en el exp. 1, el RG, con mayores concentraciones de AGV (48 h de fermentación) debería haber producido más CH₄ por unidad de MS o MO digerida, sin embargo, esto no fue así.

De hecho, si bien a las 24 horas hubo una relación, aunque pobre ($p < 0,05$, R^2 ajustado = 0,17, Figura 4.2) entre la PCH₄ y la producción de ácido acético (el AGV que mejor define estequiométricamente la PCH₄, Blümmel et al., 1999; Wolin, 1960), a las

48 h no hubo relación visible entre las producciones de CH₄ y ácido acético para ninguna de las especies estudiadas ($p > 0,05$; R^2 ajustado= 0,01; Figura 4.3).

Como en el capítulo anterior también se evaluó la relación entre la PGA observada y la estimada a partir del modelo de Blümmel et al. (1999) y se encontró que a las 24 h el análisis de regresión fue significativo ($p < 0,05$) quizá por la mejor relación entre observados y predichos del RG (Figura 4.4), aunque el R^2 del total de datos fue bajo (R^2 ajustado= 0,14); asimismo los tratamientos se comportaron de forma similar. Para las 48 h, no hubo relación entre PGA observada y predicha para el total de observaciones, ni para cada sustrato o tratamiento por separado ($p > 0,05$).

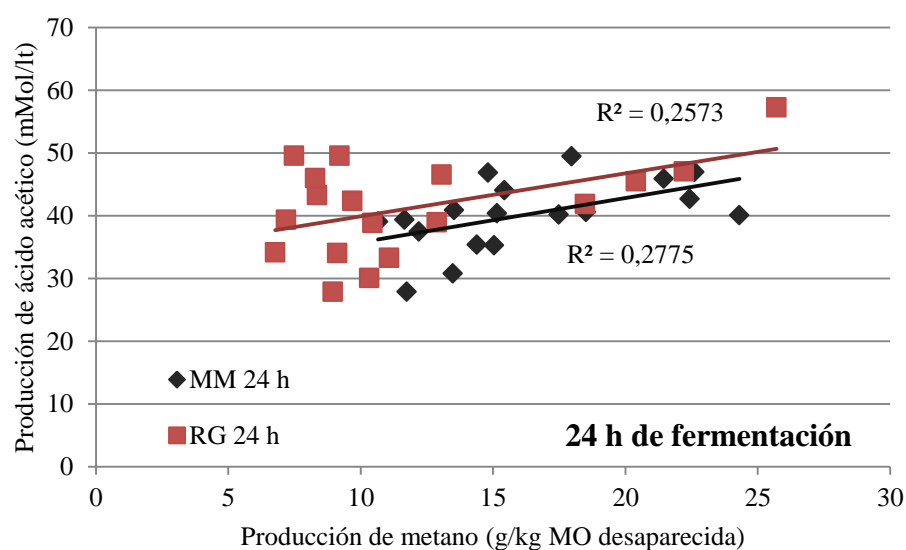


Figura 4.2 Relación entre la producción de metano *in vitro* y la producción de ácido acético productos de la fermentación *in vitro* de *Megathyrus maximus* (MM) y raigrás (*Lolium perenne*, RG) después de 24 h de incubación

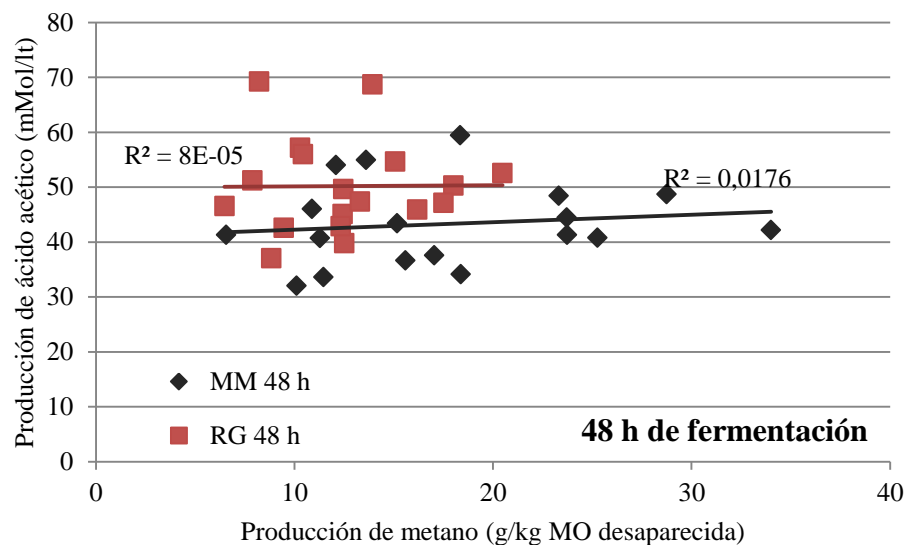


Figura 4.3 Relación entre la producción de metano *in vitro* y la producción de ácido acético productos de la fermentación *in vitro* de *Megathyrus maximus* (MM) y raigrás (*Lolium perenne*, RG) después de 48 h de incubación.

4.5.2. Efecto de los taninos condensados en la fermentación *in vitro* de forrajeras tropicales y templadas

La adición de taninos en la dieta puede alterar la fermentación ruminal de los forrajes, y esto puede deberse a varios factores. La teoría más aceptada quizá tenga que ver con la incapacidad de los microorganismos para adherirse a los sustratos (McAllister et al., 1994), debido fundamentalmente a la capacidad de los TC de formar complejos, no solo con proteínas, sino también con las paredes celulares de los forrajes (Leinmüller et al., 1991; McSweeney et al., 2001). A modo de ejemplo, Rittner y Reed (1992) encontraron una relación negativa entre la incorporación de TC solubles al sistema *in vitro* y la DFDN. Este efecto se visualiza en la disminución de la DFDN, ivDMS y ivDMO provocada por la adición de Quebracho, a las 24 h en el exp. 1. Este extracto (adquirido comercialmente, con un mínimo de 90% de TC) generó resultados similares a los encontrados por Hervás et al. (2003).

Por otro lado, los tratamientos con PEG indujeron un aumento en la digestibilidad (solo a las 24 h), lo que nos da un indicio del efecto propio de los TC, ya que el PEG tiene alta afinidad por los mismos y se ha utilizado para evaluar los efectos de los TC en la PCH₄ y fermentación de los alimentos tanto en ensayos *in vivo* (Animut et al., 2008) como en ensayos *in vitro* (Baba et al., 2002; Goel et al., 2008; Salem et al., 2007), ya que no posee efectos directos ni indirectos en la fermentación ni en la metanogénesis (Tavendale et al., 2005).

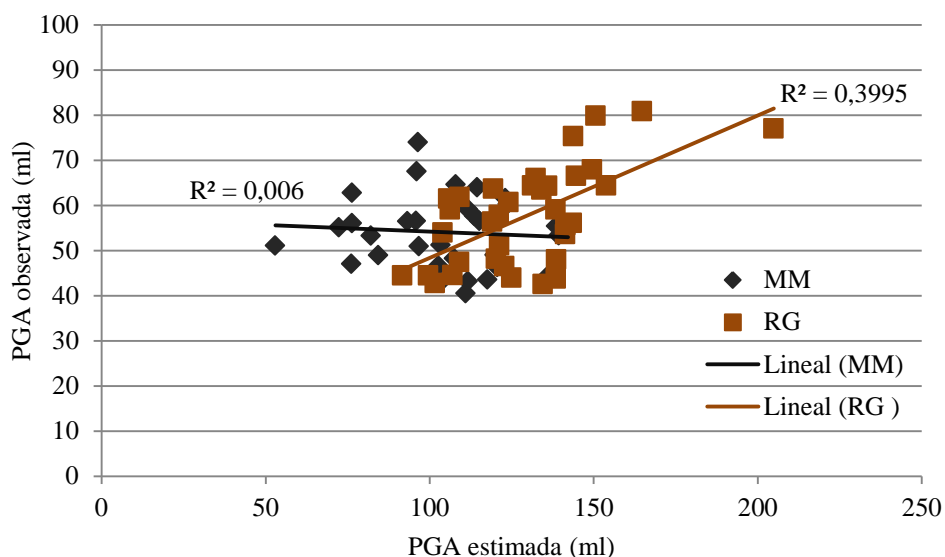


Figura 4.4. Relación entre la producción de gas acumulada (PGA) observada en el sistema *in vitro* (en 24 h), y la PG estimada estequiometricamente a partir del perfil de AGV según Blümmel et al. (1999) de los sustratos evaluados en el exp. 1 (MM, *Megathyrsus maximus*; RG, Raiigrás (*Lolium perenne*)).

Es importante resaltar que, si bien la disminución en el aprovechamiento del forraje entero, así como de la fibra por parte de los TC, fue descrito por numerosos autores (Hervás et al., 2003; McSweeney et al., 2001; Pinares-Patiño et al., 2003; Waghorn et al., 2002), la acción de los TC depende de varios factores, tales como la estructura del compuesto, el peso molecular y el tipo de extracción (Hagerman y Butler, 1991; Jouany y Morgavi, 2007). De estos factores, el tipo de extracción que se realice para la obtención de los TC cobra importancia al evaluar las diferencias observadas.

En el exp. 2, los extractos acuosos de Sauco y de *L. uliginosus* (*i.e.* *L. uliginosus*-Agua y Sauco-Agua) antes que reducir, produjeron un incremento de hasta 58 y 67 % en la ivDMS y ivDMO ($p < 0,05$, EEM=5,15 y 5,65, respectivamente). Aunque Molina Botero et al. (2013) reportaron mejoras en la ivDMS en dietas con gramíneas tropicales (*i.e.* MM y Ángleton [*Dichantium aristatum*]) al agregar más del 20% de leguminosas con altas concentraciones de TC (*i.e.* *Leucaena leucocephala* y *Gliricidia sepium*), en este trabajo no se realizaron extractos, sino que se incluyeron las leguminosas enteras en el sistema *in vitro*, por lo que es difícil atribuir este aumento en la digestibilidad al efecto exclusivo de los TC presentes en estas forrajeras. Sin embargo, los resultados de este capítulo serían coherentes con el aporte de sustratos de alta degradabilidad presentes en los extractos acuosos.

No obstante lo anterior, no deja de ser llamativo que el aporte del extracto acuoso, pese a su alta dilución (*i.e.* 1 ml de extracto en 42 ml de volumen final de medio + inóculo + extracto en cada botella) haya aumentado, por ejemplo, un 46 % la digestibilidad a las 24 h.

El comportamiento encontrado con la adición de los extractos en el exp. 2 entonces, podría deberse a la acción de compuestos que eventualmente hayan sido

arrastrados con el agua (junto con los taninos), como azúcares simples, proteínas y ácidos orgánicos solubles (Smith, 1981), que generarían una mejora en la ivDMS y ivDMO, tal como fue reflejado en los resultados de digestibilidad del exp. 1 del Capítulo 3 (Ver Cuadro 3.4, de la sección 3.4.2.3). Sin embargo, estos compuestos solubles en agua son rápidamente fermentescibles, y el efecto que generan debería diluirse después de las primeras horas de fermentación (Van Soest, 1994), por lo que esta hipótesis no podría explicar la mejora en fermentaciones tardías (48 y 72 h).

Este resultado fue consistente a través de los distintos períodos y sacrificios evaluados en la digestibilidad (*i.e.* 2 replicas \times 4 sacrificios \times 2 sustratos \times 3 períodos = 48 botellas independientes). Lamentablemente en este experimento no se utilizó la adición de PEG, que hubiera aportado mayor información sobre la causa de la mejora en la digestibilidad, ya que podría explicar si el incremento fue producto de un efecto benéfico de los TC sobre el sustrato o los microorganismos o por los cambios sostenidos en el licor ruminal provocados por los compuestos solubles arrastrados durante la extracción de los TC (Stefanon et al., 1996).

4.5.3. Papel de los TC en la cinética de producción de gas *in vitro* y potencial metanogénico de forrajeras

La modelación de la PGA neta (*i.e.* PGAN, post-corrección con blancos, para más detalle ver sección 2.5.5, del Capítulo 2) se realizó a través de un modelo no lineal sugerido por Ørskov y McDonald (1979), aunque además se evaluó la fase Lag y tasas horarias instantáneas a determinados tiempos, para evaluar la evolución de la fermentación a lo largo de la incubación. En el exp. 1, la adición de TC incrementó la PGA potencial (Par B), mientras que en el exp. 2 solo el extracto de Sauco-Etanol indujo una mayor producción. Esta mayor producción de gas potencial se contradice con el efecto inhibitorio descrito por Makkar et al. (1995), con varias fuentes de TC (donde inclusive testearon un extracto de Quebracho similar al utilizado en este ensayo). Asimismo, Baba et al. (2002) encontraron disminuciones en la PGA *in vitro* de numerosas fuentes de TC, cuando no se agregaba PEG a los sistemas de fermentación. Bento et al. (2005) sugirieron que esta disminución en la fermentación podría deberse a la inhibición parcial de la degradación de las paredes celulares.

Por otro lado, solo cuando el extracto de *L. corniculatus* se adicionó a MM, el comienzo de la fermentación (*i.e.* fase Lag) disminuyó casi a la mitad comparado con el Control, simultáneamente se observó un incremento en la PGAN de un 200% más que el Control a la hora 1 (T1, Cuadro 4.4), con menor proporción las 10 y 42 horas (*i.e.* T10 y T42). En forma similar, en el exp. 2, se observó un incremento en las tasas horarias tempranas (*i.e.* T3 y T11, Cuadro 4.10) para ambos sustratos, producido por la inclusión de los cuatro extractos con respecto al Control, contrariamente a lo observado por Tavendale et al. (2005). Adicionalmente se observó concordancia entre los incrementos en la digestibilidad y de la PGAN sobre todo por parte de los extractos acuosos del exp.2.

Dependiendo fundamentalmente de la dosis y el tipo, el agregado de TC puede generar reducciones importantes en la PCH₄ (Bodas et al., 2012), sin embargo, en el

caso de los ensayos del presente capítulo, la adición de TC, sorpresivamente, incrementó la PCH₄ con respecto al Control. En el exp. 1 tanto Quebracho como *L. corniculatus* indujeron aumentos en todas las formas reportadas, tanto a las 24 como a las 48 h. Por otro lado, en el exp. 2, la adición de Sauco también indujo aumentos con respecto al Control a las 12 y 48 h.

Estos resultados se contraponen a estudios previos que reportaron que la alimentación con forrajes que contienen taninos reducen las emisiones de CH₄ entéricas (Carulla et al., 2005; Goel y Makkar, 2012; Hess et al., 2006), que se da fundamentalmente por 2 mecanismos, en primer lugar por una inhibición directa del crecimiento de los microorganismos metanogénicos (Jayanegara et al., 2015; Tavendale et al., 2005) o indirectamente por disminución en la digestión de la fibra, ya que se ha reportado que los TC afectan el crecimiento de bacterias celulolíticas (Jayanegara et al., 2015; Mcsweeney et al., 1998), aunque también podría deberse a una alteración provocada por los TC en la actividad fibrolítica (Bento et al., 2005) o por la formación de complejos taninos-celulosa (Makkar et al., 1995).

El aditivo presentado como un mitigador ideal de la metanogénesis, no solo debería reducir la PCH₄, sino que también debería promover una menor relación acético: propiónico en el perfil de AGV, que conlleve a una mayor ESBM (Guo et al., 2009; Tavendale et al., 2005). Esto es cierto, aunque parcialmente, ya que, como se expresó anteriormente, la reducción de la PCH₄ muchas veces está asociada con una disminución en la degradabilidad de la MO en general y de la fibra en particular (Jayanegara et al., 2015; Makkar et al., 1998).

En el exp. 1, el agregado de extracto de Quebracho redujo la DFDN (tanto a las 24 como a las 48 h) pero, contrariamente a lo esperado, aumentó la PCH₄, aunque esta mayor potencial metanogénico estaría explicada estequiométricamente por el aumento en la relación acético: propiónico (Blümmel et al., 1999). Gracias al agregado de PEG, se pudo determinar que la reducción en la DFDN fue por acción exclusiva de los TC, mientras que la mayor PCH₄ no estuvo relacionada exclusivamente con los TC, ya que no se encontraron diferencias entre tratamientos sin PEG o con el agregado de PEG (Cuadro 4.2 y Cuadro 4.3). Esto sugiere que, en los extractos, inclusive en aquellos comerciales (e.g. *Quebracho sp.* utilizado en el exp.1), existen compuestos diferentes a los TC que pueden alterar el potencial metanogénico de distintos forrajes, sin alterar la capacidad de los mismos por inhibir la degradabilidad de la proteína y de la fibra.

Con el agregado de *L. corniculatus*, el aumento en la PCH₄ no estuvo acompañado con cambios en la digestibilidad, y contrariamente a lo ocurrido con Quebracho, la presencia del extracto indujo mayores concentraciones de acético y propiónico y una menor relación entre estos 2 AGV (Ac: Prop) con respecto al Control. Esta relación no permite explicar estequiométricamente la mayor emisión de CH₄, aunque se puede inferir que este asociado a una mayor PG de las botellas con *L. corniculatus*, a igual digestibilidad comparada con el Control.

Por otro lado, habría que tener en cuenta que en muchos de los trabajos donde se reporta que la adición de TC disminuye la PCH₄, tanto *in vitro* (Tavendale et al., 2005; Williams et al., 2011) como *in vivo* (Cieslak et al., 2012), esta reducción se produce, en

gran medida, por cambios en la composición y calidad del forraje que se ofreció como fuente de taninos. Por lo tanto, la efectividad de los extractos de taninos, no puede compararse linealmente con los trabajos que evalúen la inclusión de forrajeras taniníferas para reducir las emisiones de CH₄ entérico de rumiantes.

De todas formas, también se reportaron disminuciones en la PCH₄ y DFDN con la adición de extractos de Quebracho (*Schinopsis balansae*) y mimosa (*Mimosa tenuiflora*) obtenidos con etanol acuoso (Jayanegara et al., 2015), o con extractos de Acacia (*Acacia molissima*) disminuyendo la ivDMS y la PGA (Bueno et al., 2015), así como también se observó la disminución de la PGA y la PCH₄ con el agregado de extractos de te verde (*Camellia sinensis*), Quebracho (*Schinopsis lorentzii*) y semillas de uva (*Vitis vinifera*) en fermentaciones de alfalfa (Pellikaan et al., 2011) o con diferentes fracciones de TC de *Leucaena LLB* (Huang et al., 2011). Sin embargo, algunas fuentes de TC no fueron efectivas en la PCH₄, tal como la adición de Quebracho (*Schinopsis quebracho*) en la dieta de vaquillonas Angus (Beauchemin et al., 2007) o con un silaje de sorgo alto tanino en novillos Nelore (de Oliveira et al., 2007).

Estos resultados evidencian que todavía existe una considerable incertidumbre acerca de la efectividad de los forrajes que contienen taninos para reducir las emisiones de metano entérico ruminal (Jayanegara et al., 2015), asimismo el potencial efecto benéfico que se busca con la adición de extractos de TC sobre la fermentación ruminal depende de la fuente de taninos (Carreño et al., 2015), la concentración (Hervás et al., 2003), el tipo de solvente utilizado y el procedimiento (tiempo de exposición al solvente, temperatura, nivel de agitación, etc., Barahona Rosales, 1999).

Este complejo escenario genera dificultades para comparar efectos de TC de diferentes trabajos, ya que los componentes solubles presentes en los extractos utilizados como fuente de TC generan modificaciones en los parámetros de fermentación ruminal, la digestibilidad y los productos de fermentación.

4.5.4. Distribución de la energía entre los productos finales de fermentación.

El análisis del licor ruminal y los productos generados durante la fermentación brindan información muy valiosa que debería ser tenida en cuenta cuando se utiliza la técnica de PG *in vitro* para evaluar alimentos para rumiantes (Blümmel et al., 1997a; Getachew et al., 1998, Guyader et al., 2017). La relación entre la PG *in vitro* y el perfil de AGV encontrados en el medio está explicada a partir de la estequiometría presentada por Wolin (1960), donde tanto la producción total de gas, como la composición de los gases de fermentación (*i.e.* CO₂ y CH₄) pueden ser calculados a partir de las proporciones de acético, propiónico y butírico generados en el sistema *in vitro* (Blümmel et al., 1999).

Mientras que la producción de propiónico a partir de piruvato consume hidrógeno, la producción de acético y butírico libera al ambiente ruminal CO₂ y H metabólico libre que rápidamente buscan un sumidero para escapar del rumen (Moss et al., 2000). Uno de los sumideros más importantes del ambiente ruminal es la formación de CH₄ (Janssen, 2010; Van Soest, 1994). Aunque no siempre es así; de hecho Guyader

et al (2017) encontraron que la reducción de la metanogénesis no estaba asociado a una mayor producción de glucosa vía propionato.

En el exp. 1, el extracto de *L. corniculatus* produjo, tanto a las 24 como a las 48 h, un aumento del 23% en los AGVt (Figura 4.5). Debe tenerse en cuenta que el aumento en AGVt fue proporcionalmente mayor en propiónico (33%) en contraposición al acético (21% con respecto al Control), generando una relación acético: propiónico a las 24 h, 8 % menor, (Figura 4.6; comportamiento análogo a lo observado a las 48 h). Este cambio en la composición de los AGV habría mermado la disponibilidad de H⁺ para la síntesis de CH₄ por unidad de carbohidratos fermentado, con respecto al Control. Estos resultados indican que el aumento en la PCH₄ estuvo explicada por el aumento en los AGVt antes que por los cambios en su composición.

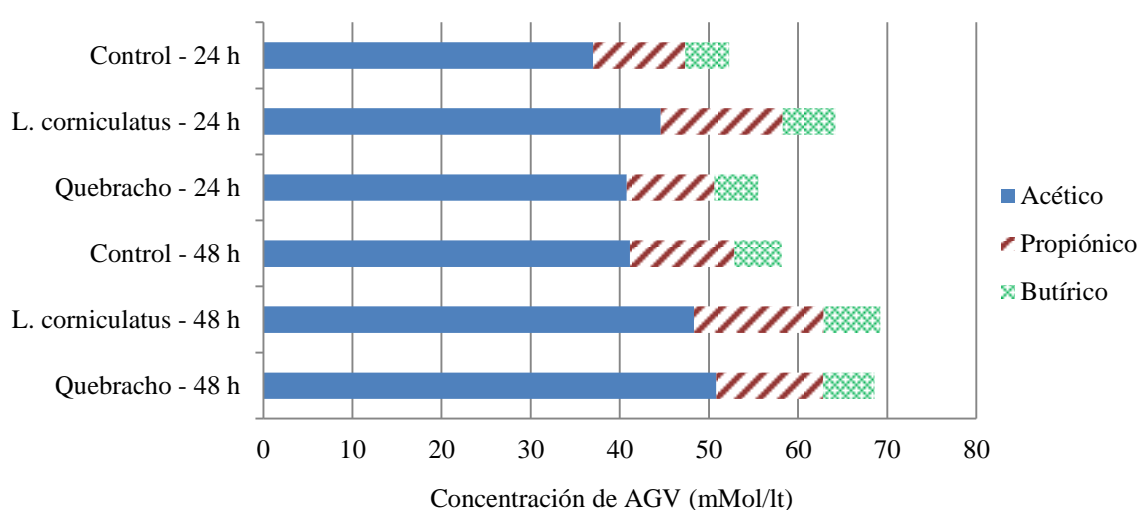


Figura 4.5 Concentración de ácidos grasos volátiles totales (AGV) y proporciones de los AGV más importantes (ácidos acético, propiónico y butírico) del residuo de fermentación in vitro después de 24 o 48 h para los tratamientos sin agregado de TC (Control) o con extracto de *Lotus corniculatus* o Quebracho del exp. 1 (n=12).

Por el contrario, el agregado de Quebracho redujo el aprovechamiento de la MO, sin cambios en la PG, con una mayor relación acético: propiónico, que pudo haber contribuido a explicar la mayor PCH₄ por unidad de MO digerida con respecto al Control (Figura 4.6).

La proteína microbiana puede ser estimada a través de la relación entre la PGA y el sustrato verdaderamente digerido. Esto se explica por medio del factor de partición (FP), que refleja la eficiencia de síntesis de proteína microbiana, ya que fue propuesto como un índice de partición de la MO verdaderamente digerida entre gases de fermentación y biomasa microbiana (BM, Blümmel et al., 1994).

Baba et al. (2002), por ejemplo, encontraron que el agregado de diferentes fuentes de TC provenientes de leguminosas y plantas leñosas producían menos gas de fermentación, que aquellos a los cuales se les había se les adicionaba PEG (inhibidor

específico de TC). Esto generaba mayores valores de FP en los sustratos con TC activos, acompañado con una mejora en la síntesis de proteína microbiana (Blümmel et al., 1997a). Por otro lado, Goel et al (2008) utilizando el sistema de producción de gas de *Hohenheim*, adicionaron a un heno extracto de hojas de *Carduus pycnocephalus* realizado con 2 proporciones de metanol acuoso (metanol: agua 1: 1 y 0,95: 0,05) y agua y encontraron no solo una disminución en la actividad metanogénica sino también una mejora en la partición de nutrientes hacia la producción de biomasa microbiana.

En este trabajo, el FP así como la estimación de BM fueron menores en los tratamientos con Quebracho y *L. corniculatus* (exp. 1), comparados con el Control, aunque la falta de efecto del PEG, indica que la disminución de este factor no puede ser atribuida exclusivamente a los TC. Evaluaciones realizadas en plantas conteniendo taninos o con la adición de extractos de TC no presentaron una disminución en el rango teórico del factor de partición (Makkar et al., 1997).

Más allá de la diferencia entre el Control y los extractos, se debería tener en cuenta que en forrajes el rango teórico de FP debería ser de 2,75 a 4,65 mg/ml (Blümmel et al., 1997a), que entra dentro de los valores encontrados en el exp. 1. Sin embargo, aunque los cuatro extractos del exp. 2 también disminuyeron el FP a las 12 y 24, presentaron a las 48 y 72 h valores por debajo del rango teórico (1,3 a 2,0, Cuadro 4.12).

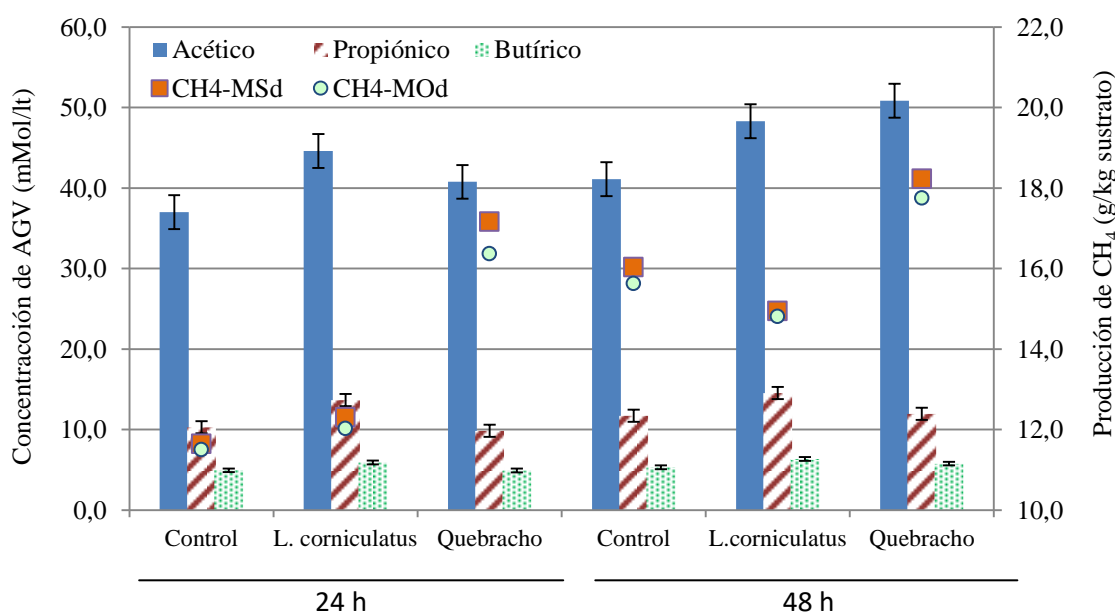


Figura 4.6 Relación entre la concentración de ácidos grasos volátiles totales (AGV, acético, propiónico y butírico, n=12) del residuo de fermentación y producción de CH₄ *in vitro* (g/kg MS o MO desaparecida, CH₄-MSd y CH₄-MOd, respectivamente), después de 24 o 48 h para los tratamientos sin agregado de TC (Control) o con extractos de *Lotus corniculatus* o Quebracho del exp. 1.

Para explicar estos resultados podríamos referirnos a las proposiciones formuladas por Makkar et al. (1997), quienes sugirieron que no se puede determinar el factor de partición (y por ende, tampoco estimar la producción de biomasa microbiana) en forrajes que contengan TC, debido a que la utilización de la solución de detergente neutro para determinar la ivDMO en forrajes que contengan (o se les haya adicionado) taninos no es confiable, fundamentalmente porque la formación de complejos tanino-proteína provocarían una subestimación de la digestibilidad real. Si bien una disminución en la ivDMO (provocada por la subestimación analítica mencionada) provocaría un descenso en el valor de FP por debajo de los niveles teóricos, no fue el caso de estos experimentos. Inclusive, tal como se mencionó en la sección 4.5.2, los extractos de Sauco y *L. uliginosus* del exp. 2 provocaron un aumento en la digestibilidad.

Por lo tanto, los bajos valores de FP encontrados en los tratamientos conteniendo extractos del exp. 2 se deben fundamentalmente a los altos valores de la PGAN en fermentaciones tempranas (*i.e.* 12 y 24 h), de hecho las PGA de los sustratos del exp. 2 son considerablemente mayores que las del exp. 1 (Figura 4.1).

De todas formas, aunque la adición de TC mejore la ESBM evidenciado por un incremento en el FP, esto no siempre está relacionado con una menor concentración de CH₄ en los gases de fermentación, sino más bien a una menor PG (Bueno et al., 2015).

Como se detallo en el párrafo anterior, en gran parte de la bibliografía revisada el agregado de TC estuvo asociado con una mayor síntesis de proteína microbiana, sugiriendo que la presencia de taninos en el rumen produciría un incremento del flujo de N microbiano hacia el duodeno (Barahona Rosales et al., 1997; Reed, 1995). Los resultados de Carulla (1994) corroboraron esta situación. Asimismo, Reed (1995) sugirió que los taninos pueden aumentar la eficiencia de urea reciclada para el rumen, debido a una reducción en la tasa de degradación de proteínas, con una menor concentración de N-NH₃ ruminal. Siguiendo la coherencia en el comportamiento de los TC de *L.corniculatus* y Quebracho adicionados en este trabajo con la disminución en los FP y en la producción de BM, la mayor concentración de N-NH₃ encontrados a las 48 h de fermentación nos sugiere una falta de efecto de los TC, al menos parcial, en la protección de la proteína bruta ante el ataque microbiano.

4.6. Conclusiones

Las forrajeras tropicales aquí evaluadas presentaron digestibilidades y PGA relativamente altas. Sin embargo no se comportaron en forma uniforme con respecto a la PCH₄, dado que MM fue el único que presentó mayor PCH₄ que el RG (KK no difirió de RG).

El agregado de TC también indujo cambios diferenciales según la fuente y el tipo de solvente utilizado para su extracción. Mientras que los tratamientos con Quebracho provocaron descensos en la fermentación de la fibra, los extractos acuosos de *L. uliginosus* y Sauco, indujeron aumentos mayores al 50% en la ivDMS y ivDMO, aunque en estos últimos, es difícil atribuir este efecto al agregado de TC.

Contrariamente a lo esperado, se evidenciaron mayores PCH₄ en los tratamientos conteniendo extractos de TC, aunque en el caso de Quebracho y *L. corniculatus* del exp. 1, debido a la falta de efecto del PEG para inhibir los TC, no se puede atribuir este aumento a los TC presentes en los extractos, sugiriendo que compuestos solubles presentes en los extractos promovieron la fermentación.

El análisis estequiométrico indicó que si bien no hubo una relación evidente entre los AGV y PCH₄, las mayores PCH₄ provocadas por Quebracho estarían asociadas a la composición del perfil (*i.e.* más acetogénico que el Control), mientras que en las botellas con *L. corniculatus* no estuvieron asociadas al perfil de AGV, sino a las mayores concentraciones de AGVt y mayores PG.

Por último, los menores valores de FP junto con mayores concentraciones de N-NH₃ en los tratamientos con TC, evidencian una falta de protección de estos compuestos en la degradación ruminal de la PB de los forrajes en estudio.

Capítulo 5.

Conclusiones generales

El trabajo llevado a cabo en esta tesis pretendió contribuir al conocimiento sobre el valor nutricional de diversos forrajes tropicales de creciente importancia para la ganadería bovina. Para analizar la eficiencia de digestión y el potencial metanogénico de estos forrajes, se utilizó el sistema de producción de gas *in vitro*, que permite evaluar numerosos sustratos y/o aditivos en poco tiempo y en forma económica.

El primer objetivo específico fue estandarizar el sistema de digestión y producción de gas *in vitro*, con el fin de generar una herramienta más confiable, con mayor repetibilidad (*i.e.* menor variabilidad interna). Se realizó una pre-incubación del licor ruminal utilizado como inóculo en los sistemas *in vitro*, con el fin de homogeneizar su desempeño dado que constituye uno de los factores que más variabilidad aporta. Sin embargo, contrariamente a lo previsto, el mismo sustrato utilizado para la pre-incubación generó mayor variabilidad en las botellas blanco, utilizadas como correctores del sistema. Por lo tanto, el licor ruminal pre-incubado no logró reducir la variabilidad del licor utilizado para la incubación.

El análisis del potencial metanogénico, eficiencia de digestión y productos de la fermentación mostró que lejos de comportarse como un grupo homogéneo, las forrajeras tropicales mostraron importantes diferencias entre si (Capítulos 3 y 4).

Las digestibilidades reportadas en el Capítulo 3 fueron mayores a las usualmente halladas en la bibliografía debido a que se utilizaron sólo láminas (separadas de las vainas, inflorescencias y material senescente) en fresco (*i.e.* sin secado previo) provenientes de plantas cosechadas en una zona templada. El análisis de material fresco en el sistema *in vitro*, sería más representativa de lo que ocurre con los rumiantes cuando pastorean forraje directamente.

Como era previsto, la digestión *in vitro* de las especies forrajeras megatérmicas comenzó más tarde que las templadas (*i.e.* mayores fases Lag y menores producciones de gas **(PG)** instantáneas en las primeras horas de fermentación), y concomitantemente se observó que, aún luego de 72 h de fermentación, estas forrajeras no habían logrado la digestión completa (evidenciado por el "plateau" o meseta de la curva de PGA).

Las hojas de *Paspalum dilatatum* (**PD**) y *Urochloa brizanta* (**UB**) presentaron digestibilidades menores a las halladas en las otras gramíneas C4, como *Chloris gayana* (**CG**) o *Megathyrsus maximus* (**MM**). Merece destacarse que estas mismas especies (PD y UB) también presentaron menor producción de CH₄ (**PCH₄**) por unidad de MS y MO digerida (produjeron 39 y 41% menos, respectivamente comparadas con *Milium coloratum* (**MC**) y CG. Estas notables diferencias encontradas en el potencial metanogénico (asociado a la MO digerida) de especies de equivalente composición química, sugieren un comportamiento fermentativo dísimil que podría estar asociado a características propias de la pared celular o a compuestos solubles presentes en algunas de las forrajeras megatérmicas.

En el mismo Capítulo se analizó el efecto de los compuestos solubles en agua (**CSA**) y las diferencias entre los materiales originales y las paredes celulares purificadas (**PCP**, obtenidas después de lavar los sustratos con solución de detergente neutro). El análisis de estas fracciones por separado permite entender el mecanismo subyacente que podría explicar las diferencias observadas entre las distintas especies,

información que resulta relevante desde el punto de vista descriptivo de las especies forrajeras, así como para entender los mecanismos involucrados en la digestión y la emisión de metano y probablemente iluminar futuras aproximaciones de manejo y fitomejoramiento.

La digestión de los residuos lavados con agua y DN (*i.e.* sin compuestos solubles) fue coherente con lo reportado en la bibliografía, mostrando menor digestibilidad que los materiales originales, salvo el PD que presentó un comportamiento inverso. En el PD, la fracción lavada con agua casi no presentó fase Lag, y se observó un notable incremento en la DFDN (24, 48 y 72 h de fermentación) y de las ivDMS y ivDMO (a las 48 y 72 h), con respecto del material original (**Or**, evaluado tal cual). Este aumento de la digestión producto de la eliminación de los CSA en el PD, estuvo acompañado por una menor PG comparado con el Or; lo cual se reflejó en una mejora de la eficiencia de síntesis de biomasa microbiana (**BM**, evaluada por el factor de partición, **FP**). Esto sugiere la presencia de algún compuesto soluble que retrasa o dificulta el ataque microbiano o bien que el lavado con agua hubiera afectado la estructura de la pared celular residual, en forma diferenciada para este forraje. De modo similar, después de 48 h de fermentación, el lavado de los CSA de MC también produjo una mejora en la DFDN. Estos son resultados particularmente interesantes que ameritan continuar siendo investigados en el futuro.

Las diferencias en la PCH₄ por unidad de MS y MO digerida durante la evaluación de las PCP como sustrato para la fermentación reveló que en sustratos que presentan características químicas similares, la PCH₄ se modificó no sólo por la presencia y concentración de los productos solubles, sino también por las características particulares de las paredes celulares. Adicionalmente, la homogeneidad en el comportamiento fermentativo (*e.g.* digestibilidad, cinética y PCH₄) observado en las paredes celulares y el material original de RG, a diferencia de lo ocurrido con las especies megatérmicas del exp. 2 (*i.e.* MC y CG), señalan que existen aspectos físico-químicos de las paredes celulares propios de cada especie forrajera, que determinan variaciones en la PCH₄ producto de la fermentación.

Las relaciones estequiométricas entre los productos de fermentación ruminal son una herramienta valiosa para comprender como se relaciona la composición de los alimentos con su aprovechamiento ruminal. Los productos de la fermentación ruminal (PGA, BM, ácidos grasos volátiles, **AGV**) están fuertemente interrelacionados por lo cual teóricamente se puede estimar alguno de ellos (*e.g.* BM, PGA) a partir de las otras variables y de relaciones de la estequiometría ruminal ya conocidas.

El análisis de la relación entre PGA y AGV demostró que sólo existió una razonable concordancia para las paredes celulares después de secarlas (*i.e.* tratamiento FDNse del exp. 2). Por el contrario, cuando se analizaron los materiales originales y los residuos del lavado con agua o con detergente neutro en fresco no se detectó relación alguna. Estos resultados, indican que la forma de presentación de los sustratos interfirió en la relación de los AGV y el gas producido.

La producción de AGV de las forrajeras C4 estuvo influenciada, en parte, por los CS, ya que al eliminarlos la producción disminuyó. Este efecto no sólo se vio durante

las primeras horas de fermentación, sino que se prolongó en el tiempo, sugiriendo que los CS generarían un cambio en la microbiota del rumen por más de 24 h.

El secado de las PCP no generó diferencias en la composición química al comparar con las PCP frescas (exp. 2, Capítulo 3), pero se observó un retraso en la fermentación (*i.e.* reflejado en un aumento de la fase Lag, menores tasas de PG durante las primeras horas de fermentación y PGAN a las 24 h), sin encontrar diferencias en el perfil de los AGV. Aunque estos resultados se observaron en las PCP de las tres especies estudiadas (*i.e.* CG, MC y RG), sólo en CG el secado redujo sustancialmente la digestibilidad del sustrato, sin alterar la PCH₄ por unidad de MS o MO digerida.

Como se señalara en el Capítulo 4, los taninos condensados (TC; entre otras sustancias vegetales tales como aceites esenciales y saponinas) están siendo estudiados como alternativa a sustancias sintéticas para sostener la productividad animal (*e.g.* mejoras nutricionales, sanitarias) o reducir el impacto ambiental (*e.g.* emisión de gases con efecto invernadero, P y N en el estiércol). Estas acciones están fuertemente impulsadas por normativas tales como la resolución de la Unión Europea (2006) que prohibió el uso de antibióticos en el alimento como promotores de crecimiento para el ganado debido al riesgo de retención de residuos en los productos para consumo humano (Diario Oficial de la Unión Europea, 2003).

En el Capítulo 4 se evaluó el efecto de varias fuentes de TC sobre la fermentación *in vitro* de forrajeras mediante el agregado de distintos extractos. Se evaluaron forrajeras tropicales y se comparó el perfil fermentativo de las mismas con una gramínea templada de referencia (*i.e.* raigrás, *Lolium perenne*, RG). Las digestibilidades de los forrajes C4 fueron ligeramente superiores que las encontradas en la bibliografía, aunque con fermentaciones más tardías que el RG.

Las forrajeras tropicales han sido señaladas como grandes productoras de CH₄, aunque en ambos experimentos ensayados en el Capítulo 4, y en correspondencia con lo encontrado en el Capítulo 3, ambas especies tropicales se comportaron diferente. Mientras que el kikuyo (KK, *Penisetum purpureum*) no mostró diferencias con el RG, el *Megathyrsus maximus* (MM) presentó mayores producciones de CH₄. Por otro lado no existió relación estequiométrica entre la concentración de AGV (sobre todo acético) y la PCH₄ para estas forrajeras (exp. 1).

La expectativa al agregar TC al sistema de fermentación supone que actúen como mitigadores de CH₄, sin alterar el aprovechamiento de los nutrientes. Sin embargo se encontraron resultados dispares. El agregado de TC de Quebracho indujo descensos en la fermentación de la fibra, pero contrariamente a lo esperado, estuvo acompañado por una mayor PCH₄, aunque no se pudo atribuir exclusivamente a la acción de los TC, ya que al agregar polietilenglicol (PEG) a las fermentaciones con extracto de Quebracho no presentó diferencias con respecto a los tratamientos sin PEG.

Por otro lado, los extractos acuosos de *Lotus uliginosus* y Sauco (*Sambucus peruviana*), sorprendentemente indujeron aumentos mayores al 50% en la ivDMS y ivDMO. Una de las explicaciones posibles es que la extracción con agua arrastró compuestos diferentes a los TC, tales como azúcares simples, proteínas y/o ácidos orgánicos, en cantidades tales que provocaron mejoras en la fermentación de los

sustratos, sobre todo durante las primeras horas de incubación. Asimismo, aunque el extracto representara una pequeña proporción del volumen final del medio de incubación, los cambios generados en la fermentación temprana se mantuvieron hasta las 48 h de incubación.

Teniendo en cuenta la partición de la energía entre CH_4 y AGV explicado por la relación estequiométrica entre estos parámetros, la mayor PCH_4 en las botellas con extracto de Quebracho podrían asociarse a la alta relación entre los ácidos acético y propiónico (Ac: Prop), mientras que el aumento en la PCH_4 inducido por los extractos de *Lotus corniculatus* fueron debidos fundamentalmente al aumento en la concentración de AGV total y a la mayor PG comparadas con el Control. Estos resultados evidencian que cuando se tratan de comparar los efectos de diferentes extractos en la fermentación de forrajeras existen numerosos factores dependientes del tipo de tanino, el solvente y el procedimiento de extracción que inciden en los resultados, dificultando la previsibilidad de los efectos.

El FP utilizado para evaluar la eficiencia de síntesis de BM, fue menor en los tratamientos con agregado de TC; aunque en muchos trabajos la adición de TC estuvo asociada con un incremento del N microbiano hacia el duodeno, en el exp. 1 la presencia de TC no protegió a la proteína del forraje, evidenciado por las mayores concentraciones de N-NH_3 presentes en los residuos de fermentación de los tratamientos con TC comparados con el Control.

En síntesis, el desarrollo de este trabajo permitió demostrar la importancia que tiene la forma de presentación (*i.e.* secado) del sustrato a evaluar en un sistema *in vitro* en los parámetros de digestión y de PCH_4 . Asimismo, se pudo poner en evidencia la heterogeneidad existente entre las forrajeras megatérmicas en cuanto a su eficiencia de digestión y potencial metanogénico, dependiente tanto de características de los CS y de las paredes celulares. Por otro lado, la respuesta de la fermentación ruminal al agregado de los TC no fue uniforme, sugiriendo la necesidad de mejorar la caracterización de los TC o extratos que los contengan para estudios futuros. A su vez, el análisis de las relaciones estequiométricas de los procesos bioquímicos del rumen demostró que la validez de dicha relación sería dependiente de las características del sustrato, sugiriendo la necesidad de profundizar su estudio.

Bibliografía

- Aerts, R.J., McNabb, W.C., Molan, A., Brand, A., Barry, T.N., Peters, J.S., 1999. Condensed tannins from *Lotus corniculatus* and *Lotus pedunculatus* exert different effects on the in vitro rumen degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) protein. *J. Sci. Food Agric.* 79, 79–85.
- AFRC, 1987. Technical committee on responses to nutrients, Report Number 1, characterization of feedstuffs: energy. *Nutr. Abstr. Rev. (Series B)* 57, 507–523.
- Agarwal, N., Shekhar, C., Kumar, R., Chaudhary, L.C., Kamra, D.N., 2009. Effect of peppermint (*Mentha piperita*) oil on in vitro methanogenesis and fermentation of feed with buffalo rumen liquor. *Anim. Feed Sci. Technol.* 148, 321–327.
- Alexander, G., Singh, B., Sahoo, a., Bhat, T.K., 2008. In vitro screening of plant extracts to enhance the efficiency of utilization of energy and nitrogen in ruminant diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145, 229–244.
- Animut, G., Puchala, R., Goetsch, A.L., Patra, A.K., Sahlu, T., Varel, V.H., Wells, J., 2008. Methane emission by goats consuming different sources of condensed tannins. *Anim. Feed Sci. Technol.* 144, 228–241.
- AOAC, 1995. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis, 16th Edit. ed. Arlington, VA, USA.
- Araujo, R.C., Pires, A.V., Mourão, G.B., Abdalla, A.L., Sallam, S.M.A., 2011. Use of blanks to determine in vitro net gas and methane production when using rumen fermentation modifiers. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166-167, 155–162.
- ARC, 1980. Agricultural Research Council. The nutrient Requirements of ruminant livestock. Slough, UK.
- Archimède, H., Eugène, M., Marie Magdeleine, C., Boval, M., Martin, C., Morgavi, D.P., Lecomte, P., Doreau, M., 2011. Comparison of methane production between C3 and C4 grasses and legumes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166-167, 59–64.
- Arroquy, J.I., Cornacchione, M.V., Colombatto, D., Kunst, C., 2014. Chemical composition and in vitro ruminal degradation of hay and silage from tropical grasses. *Can. J. Anim. Sci.* 94, 1-11.
- Baba, A.S.H., Castro, F.B., Orskov, E.R., 2002. Partitioning of energy and degradability of browse plants in vitro and the implications of blocking the effects of tannin by the addition of polyethylene glycol. *Anim. Feed Sci. Technol.* 95, 93–104.
- Barahona, R., Lascano, C.E., Narvaez, N., Owen, E., Morris, P., Theodorou, M.K., 2003. In vitro degradability of mature and immature leaves of tropical forage legumes differing in condensed tannin and non-starch polysaccharide content and composition. *J. Sci. Food Agric.* 83, 1256–1266.
- Barahona Rosales, R., 1999. Condensed tannins in tropical forage legumes: their characterisation and study of their nutritional impact from the standpoint of structure-activity relationships. The University of Reading.
- Barahona Rosales, R., Lascano, C.E., Cochran, R., Morrill, J., Titgemeyer, E.C., 1997. Intake, Digestion, and Nitrogen Utilization by Sheep Fed Tropical Legumes with Contrasting Tannin Concentration and Astringency. *J. Anim. Sci.* 75, 1633–1640.
- Barry, T.N., Manley, T.R., Duncan, S.J., 1986. The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep. 4. Sites of carbohydrate and protein digestion as influenced by dietary reactive tannin concentration. *Br. J. Nutr.* 55, 123–137.

- Beauchemin, K.A., Kreuzer, M., O' Mara, F., McAllister, T.A., 2008. Nutritional management for enteric methane abatement : a review. *Aust. J. Exp. Agric.* 48, 21–27.
- Beauchemin, K.A., McGinn, S.M., 2006. Methane emissions from beef cattle : Effects of fumaric acid, essential oil, and canola oil. *J. Anim. Sci.* 84, 1489–1496.
- Beauchemin, K.A., McGinn, S.M., Martinez, T.F., McAllister, T.A., 2007. Use of condensed tannin extract from quebracho trees to reduce methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.* 85, 1990–1996.
- Benchaar, C., Calsamiglia, S., Chaves, A.V., Fraser, G.R., Colombatto, D., McAllister, T.A., Beauchemin, K.A., 2008. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145, 209–228.
- Benchaar, C., Greathead, H., 2011. Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166-167, 338–355.
- Benchaar, C., Pomar, C., Chiquette, J., 2001. Evaluation of dietary strategies to reduce methane production in ruminants: A modelling approach. *Can. J. Anim. Sci.* 81, 563–574.
- Bento, M.H.L., Makkar, H.P.S., Acamovic, T., 2005. Effect of mimosa tannin and pectin on microbial protein synthesis and gas production during in vitro fermentation of 15 N-labelled maize shoots. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124, 365–377.
- Blaxter, K.L., 1989. *Energy metabolism in animals and man*, 1st ed. ed. Cambridge University Press, Cambridge, GB.
- Blaxter, K.L., Clapperton, J.L., 1965. Prediction of the amount of methane produced by ruminants. *Br. J. Nutr.* 19, 511–22.
- Blümmel, M., Aiple, K.-P., Steingass, H., Becker, K., 1999. A note on the stoichiometrical relationship of short chain fatty acid production and gas formation in vitro in feedstuffs of widely differing quality. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 81, 157–167.
- Blümmel, M., Karsli, A., Russell, J.R., 2003. Influence of diet on growth yields of rumen micro-organisms in vitro and in vivo: influence on growth yield of variable carbon fluxes to fermentation products. *Br. J. Nutr.* 90, 625–634.
- Blümmel, M., Lebzien, P., 2001. Predicting ruminal microbial efficiencies of dairy rations by in vitro techniques. *Livest. Prod. Sci.* 68, 107–117.
- Blümmel, M., Makkar, H.P.S., Becker, K., 1997a. In vitro gas production: a technique revisited. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 77, 24–34.
- Blümmel, M., Makkar, H.P.S., Chisanga, G., Mtimuni, J., Becker, K., 1997b. The prediction of dry matter intake of temperate and tropical roughages from in vitro digestibility / gas-production data , and the dry matter intake and in vitro digestibility of African roughages in relation to ruminant liveweight gain. *Anim. Feed Sci. Technol.* 69, 131–141.
- Blümmel, M., Ørskov, E.R., 1993. Comparison of in vitro gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 40, 109–119.
- Blümmel, M., Steingass, H., Becker, K., 1997c. The relationship between in vitro gas production, in vitro microbial biomass yield and 15N incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages. *Br. J. Nutr.* 77, 911–921.
- Blümmel, M., Steingass, H., Becker, K., 1994. The partitioning of in vitro fermentation products and its bearing for voluntary feed intake. *Proc. Soc. Nutr. Physiol.* 3, 123.
- Bodas, R., López, S., Fernández, M., García-González, R., Rodríguez, A.B., Wallace, R.J., González, J.S., 2008. In vitro screening of the potential of numerous plant species as antimethanogenic feed additives for ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 145, 245–258.

- Bodas, R., Prieto, N., García-González, R., Andrés, S., Giráldez, F.J., López, S., 2012. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Anim. Feed Sci. Technol.* 176, 78–93.
- Boguhn, J., Zuber, T., Rodehutschord, M., 2013. Effect of donor animals and their diet on in vitro nutrient degradation and microbial protein synthesis using grass and corn silages. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 97, 547–57.
- Buddle, B.M., Denis, M., Attwood, G.T., Altermann, E., Janssen, P.H., Ronimus, R.S., Pinares-Patiño, C.S., Muetzel, S., Neil Wedlock, D., 2011. Strategies to reduce methane emissions from farmed ruminants grazing on pasture. *Vet. J.* 188, 11–17.
- Bueno, I.C.S., Brandi, R.A., Franzolin, R., Benetel, G., Fagundes, G.M., Abdalla, A.L., Louvandini, H., Muir, J.P., 2015. In vitro methane production and tolerance to condensed tannins in five ruminant species. *Anim. Feed Sci. Technol.* 205, 1–9.
- Bueno, I.C.S., Cabral Filho, S.L.S., Gobbo, S.P., Louvandini, H., Vitti, D.M.S.S., Abdalla, A.L., 2005. Influence of inoculum source in a gas production method. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124, 95–105.
- Calabrò, S., Carone, F., Cutrignelli, M., D'Urso, S., Piccolo, G., Tudisco, R., Angelino, G. and Infascelli, G., 2006. The effect of haymaking on the neutral detergent soluble fraction of two intercropped forages cut at different growth stages. *Ital. J. Anim. Sci.* 5(4), 327-339.
- Cantet, J.M., Colombatto, D., Jaurena, G., 2016. Methane production and in vitro dry matter digestibility of low quality forages treated with a protease or a cellulase. *Anim. Prod. Sci.* 56(10), 1700-1706
- Cantet, J.M., Wawrzkievicz, M., Gambetti, P., Palladino, R.A., Jaurena, G., 2011a. Impacto del secado en estufa sobre la digestibilidad in vitro de la materia seca., in: 34° Congreso Argentino de Producción Animal - 1st Joint Meet AAPA - ASAS. *Revista Argentina de Producción Animal*, Mar del Plata, Argentina, p. 272.
- Cantet, J.M., Wawrzkievicz, M., Palladino, R.A., Jaurena, G., 2011b. El secado en estufa de las muestras sobrestima la producción de metano in vitro, in: *Memorias de La XXII Reunión ALPA. Archivo Latinoamericano de Producción Animal*, Montevideo, Uruguay, p. 310.
- Carreño, D., Hervás, G., Toral, P.G., Belenguer, A., Frutos, P., 2015. Ability of different types and doses of tannin extracts to modulate in vitro ruminal biohydrogenation in sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 202, 42–51.
- Carro, M.D., Ranilla, M.J., Tejido, M.L., 2005. Using an in vitro gas production technique to examine feed additives: Effects of correcting values for different blanks. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124, 173–184.
- Carulla, J.E., 1994. Forage intake and N utilization by sheep as affected by condensed tannins. University of Nebraska, Lincoln.
- Carulla, J.E., Kreuzer, M., Machmüller, A., Hess, H.D., 2005. Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. *Aust. J. Agric. Res.* 56, 961–970.
- Church, D.C., 1993. *The Ruminant Animal: Digestive Physiology and Nutrition*. Waveland Press.
- Cieslak, A., Zmora, P., Pers-Kamczyc, E., Szumacher-Strabel, M., 2012. Effects of tannins source (*Vaccinium vitis idaea* L.) on rumen microbial fermentation in vivo. *Anim. Feed Sci. Technol.* 176, 102–106.

- Colombatto, D., Morgavi, D.P., Furtado, A.F., Beauchemin, K.A., 2003. Screening of exogenous enzymes for ruminant diets: Relationship between biochemical characteristics and in vitro ruminal degradation. *J. Anim. Sci.* 81, 2628–2638.
- Cone, J.W., 1998. The development, use and application of the gas production technique as the DLO Institute for Animal Science and Health (ID-DLO), in: Deaville, E.R., Owen, E., Adesogen, A.T., Rymer, C., Huntington, J.A., Lawrence, T.L.J. (Eds.), *In Vitro Techniques for Measuring Nutrient Supply to Ruminants*. BSAS Occ. Publ. No. 22., Edinburgh; UK, pp. 65–78.
- Cone, J.W., Gelder, A.H., van Marvin, H.J.P., 1994. The effect of different drying conditions on chemical composition, physical properties, organic matter digestibility and fermentation kinetics of grass and maize stems (in Dutch)., Rapport. Lelystad, the Netherlands. doi:0922-3282
- Cone, J.W., van Gelder, A.H., Bachmann, H., 2002. Influence of inoculum source on gas production profiles. *Anim. Feed Sci. Technol.* 99, 221–231.
- Craig, W.M., Brown, D.R., Broderick, G.A., Ricker, D.B., 1987. Post-Prandial Compositional Changes of Fluid- and Particle-Associated Ruminal Microorganisms. *J. Anim. Sci.* 65, 1042–1048.
- Czerkawski, J.W., Breckenridge, G., 1977. Design and development of a long-term rumen simulation technique. *Br. J. Nutr.* 38, 371–384.
- de Oliveira, S.G., Berchielli, T.T., Pedreira, M.D.S., Primavesi, O., Frighetto, R., Lima, M.A., 2007. Effect of tannin levels in sorghum silage and concentrate supplementation on apparent digestibility and methane emission in beef cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 135, 236–248.
- Diario Oficial de la Unión Europea, 2003. Reglamento (CE) N° 1831/2003 Del Parlamento Europeo y del consejo de 22 de septiembre de 2003 sobre los aditivos en la alimentación animal. Bruselas, Belgica.
- Dijkstra, J., Kebreab, E., Bannink, A., France, J., López, S., 2005. Application of the gas production technique to feed evaluation systems for ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124, 561–578.
- Doane, P.H., Pell, A.N., Schofield, P., 1997a. The effect of preservation method on the neutral detergent soluble fraction of forages. *J. Anim. Sci.* 75, 1140–1148.
- Doane, P.H., Schofield, P., Pell, A.N., 1997b. Neutral detergent fiber disappearance and gas and volatile fatty acid production during the in vitro fermentation of six forages. *J. Anim. Sci.* 75, 3342–3352.
- Dominguez Bello, M.G., Escobar, A., 1997. Rumen manipulation for the improved utilization of tropical forages. *Anim. Feed Sci. Technol.* 69, 91–102.
- Duxbury, J.M., Harper, L.A., Mosier, A.R., 1993. Contributions of agroecosystems to global climate change, in: Harper, L.A., Mosier, A.R., Duxbury, J.M., Rolston, D. (Eds.), *Agroecosystem Effects on Radiatively Important Trace Gases & Global Climate Change*. ASA Special Publication No. 55. American Society of Agronomy, MADison, WI, pp. 1–18.
- Eckard, R.J., Grainger, C., de Klein, C.A.M., 2010. Options for the abatement of methane and nitrous oxide from ruminant production: A review. *Livest. Sci.* 130, 47–56.
- Feng, P., Hoover, W.H., Miller, T.K., Blauwiekel, R., 1993. Interactions of fiber and nonstructural carbohydrates on lactation and ruminal function. *J. Dairy Sci.* 76, 1324–1333.
- Frutos, P., Hervás, G., Giráldez, F.J., Mantecón, A.R., 2004. Review . Tannins and ruminant nutrition. *Spanish J. Agric. Res.* 2, 191–202.

- Gerber, P.J., Steinfeld, H., Henderson, B., Mottet, A., Opio, C., Dijkman, J., Falcucci, A. & Tempio, G., 2013. Tackling climate change through livestock – A global assessment of emissions and mitigation opportunities. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome.
- Getachew, G., Blümmel, M., Makkar, H.P.S., Becker, K., 1998. In vitro gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds : a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 72, 261–281.
- Getachew, G., Crovetto, G., Fondevila, M., Krishnamoorthy, U., Singh, B., Spanghero, M., Steingass, H., Robinson, P.H., Kailas, M.M., 2002. Laboratory variation of 24 h in vitro gas production and estimated metabolizable energy values of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 102, 169–180.
- Getachew, G., Robinson, P.H., DePeters, E.J., Taylor, S.J., 2004. Relationships between chemical composition, dry matter degradation and in vitro gas production of several ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 111, 57–71.
- Getachew, G., Robinson, P.H., DePeters, E.J., Taylor, S.J., Gisi, D.D., Higginbotham, G.E., Riordan, T.J., 2005. Methane production from commercial dairy rations estimated using an in vitro gas technique. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124, 391–402.
- Gierus, M., Schiborra, A., Südekum, K.H., Rave, G., Taube, F., 2008. Comparison of gas accumulation profiles of several feeds using manual or automated gas production methods. *Anim. Feed Sci. Technol.* 147, 310–325.
- Goel, G., Makkar, H.P.S., 2012. Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins. *Trop. Anim. Health Prod.* 44, 729–39.
- Goel, G., Makkar, H.P.S., Becker, K., 2008. Effects of *Sesbania sesban* and *Carduus pycnocephalus* leaves and Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) seeds and their extracts on partitioning of nutrients from roughage- and concentrate-based feeds to methane. *Anim. Feed Sci. Technol.* 147, 72–89.
- Goering, H.K., Van Soest, P.J., 1970. Forage Fiber Analyses (Apparatus, Reagents, Procedures and Some Applications). *Agric. Handb.* 379.
- González Ronquillo, M., Fondevila, M., Barrios Urdaneta, a, Newman, Y., 1998. In vitro gas production from buffel grass (*Cenchrus ciliaris* L.) fermentation in relation to the cutting interval, the level of nitrogen fertilisation and the season of growth. *Anim. Feed Sci. Technol.* 72, 19–32.
- Grainger, C., Clarke, T., Auldist, M.J., Beauchemin, K.A., McGinn, S.M., Waghorn, G.C., Eckard, R.J., 2009a. Condensed Tannins To Reduce Methane Emissions and Nitrogen Excretion From Grazing Dairy Cows. *Can. J. Anim. Sci.* 89, 241–251.
- Grainger, C., Clarke, T., Auldist, M.J., Beauchemin, K.A., McGinn, S.M., Waghorn, G.C., Eckard, R.J., 2009b. Potential use of *Acacia mearnsii* condensed tannins to reduce methane emissions and nitrogen excretion from grazing dairy cows. *Can. J. Anim. Sci.* 89, 241–251.
- Guo, W.S., Schaefer, D.M., Guo, X.X., Ren, L.P. and Meng, Q.X., 2009. Use of nitrate-nitrogen as a sole dietary nitrogen source to inhibit ruminal methanogenesis and to improve microbial nitrogen synthesis in vitro. *Asian-australas. J. Anim. Sci.* 22, 542-549.
- Guyader, J., Ungerfeld, E.M. and Beauchemin, K.A., 2017. Redirection of metabolic hydrogen by inhibiting methanogenesis in the rumen simulation technique (RUSITEC). *Front. Microbiol.* 8:393.
- Hagerman, A.E., Butler, L.G., 1991. Tannins and lignins, in: Rosenthal, G.A., Berenbaum, M.R. (Eds.), *Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites*. Academic Press Inc., New York, USA, pp. 355–388.

- Hall, M.B., Hoover, W.H., Jennings, J.P., Miller Webster, T.K., 1999. A method for partitioning neutral detergent- soluble carbohydrates. *J. Sci. food Agric.* 79, 2079–2086.
- Hartmann, T., 2007. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 68, 2831–2846.
- Hervás, G., Frutos, P., Giráldez, F.J., Mora, M.J., Fernández, B., Mantecón, Á.R., 2005. Effect of preservation on fermentative activity of rumen fluid inoculum for in vitro gas production techniques. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124, 107–118.
- Hervás, G., Frutos, P., Javier Giráldez, F., Mantecón, Á.R., Álvarez Del Pino, M.C., 2003. Effect of different doses of quebracho tannins extract on rumen fermentation in ewes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 109, 65–78.
- Hess, H.D., Beuret, R.A., Lötscher, M., Hindrichsen, I.K., Machmüller, A., Carulla, J.E., Lascano, C.E., Kreuzer, M., 2004. Ruminal fermentation, methanogenesis and nitrogen utilization of sheep receiving tropical grass hay-concentrate diets offered with *Sapindus saponaria* fruits and *Cratylia argentea* foliage. *Anim. Sci.* 79, 177–189.
- Hess, H.D., Monsalve, L.M., Lascano, C.E., Carulla, J.E., Díaz, T.E. and Kreuzer, M., 2003. Supplementation of a tropical grass diet with forage legumes and *Sapindus saponaria* fruits: effects on in vitro ruminal nitrogen turnover and methanogenesis *Austr. J. Agr. Res.* 54(7), 703-713.
- Hess, H.D., Tiemann, T.T., Noto, F., Carulla, J.E., Kreuzer, M., 2006. Strategic use of tannins as means to limit methane emission from ruminant livestock. *Int. Congr. Ser.* 1293, 164–167.
- Hindrichsen, I.K., Wettstein, H.R., Machmüller, A., Jörg, B., Kreuzer, M., 2005. Effect of the carbohydrate composition of feed concentrates on methane emission from dairy cows and their slurry. *Environ. Monit. Assess.* 107, 329–350.
- Hindrichsen, I.K., Wettstein, H.R., Machmüller, A., Soliva, C.R., Bach Knudsen, K.E., Madsen, J., Kreuzer, M., 2004. Effects of feed carbohydrates with contrasting properties on rumen fermentation and methane release in vitro. *Can. J. Anim. Sci.* 84, 265–276.
- Hoover, W.H., 1986. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. *J. Dairy Sci.* 69, 2755–2766.
- Huang, X.D., Liang, J.B., Tan, H.Y., Yahya, R., Ho, Y.W., 2011. Effects of *Leucaena* condensed tannins of differing molecular weights on in vitro CH₄ production. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166-167, 373–376.
- Hungate, R.E., 1966. *The rumen and its microbes.* Academic Press Inc., New York, USA.
- IPCC, 2007. *Climate Change 2007. Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* Geneva, Switzerland.
- Janssen, P.H., 2010. Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. *Anim. Feed Sci. Technol.* 160, 1-22.
- Jaurena, G., Cantet, J.M., Arroquy, J.I., Palladino, R.A., Wawrzkievicz, M., Colombatto, D., 2015. Prediction of the Y_m factor for livestock from on-farm accessible data. *Livest. Sci.* 177, 52–62.
- Jaurena, G., Cantet, J.M., Wawrzkievicz, M., 2011. Modelo de ajuste alternativo para los blancos de la técnica de producción de gas in vitro. *Rev. Argentina Prod. Anim.*
- Jaurena, G., Wawrzkievicz, M., 2008. PROMEFA (Programa para el mejoramiento de forrajes y alimentos). Guía de procedimientos normalizados.

- Jaurena, G., Wawrzekiewicz, M., Colombatto, D., 2012. Propuesta de terminología para los reportes de laboratorios de nutrición animal. Nota Técnica. Rev. Argentina Prod. Anim. 32, 135–147.
- Jayanegara, A., Goel, G., Makkar, H.P.S., Becker, K., 2015. Divergence between purified hydrolysable and condensed tannin effects on methane emission, rumen fermentation and microbial population in vitro. Anim. Feed Sci. Technol. 209, 60–68.
- Jayanegara, A., Togtokhbayar, N., Makkar, H.P.S., Becker, K., 2009. Tannins determined by various methods as predictors of methane production reduction potential of plants by an in vitro rumen fermentation system. Anim. Feed Sci. Technol. 150, 230–237.
- Jessop, N.S., Herrero, M., 1998. Modelling fermentation in an in vitro gas production system: effects of microbial activity, in: Deaville, E.R., Owen, E., Adesogan, A.T., Rymer, C., Huntington, J.A., Lawrence, T.L.J. (Eds.), *In Vitro Techniques for Measuring Nutrient Supply to Ruminants*. BSAS Occ. Publ. No. 22., Edinburgh; UK, pp. 81–84.
- Johnson, K.A., Johnson, D.E., 1995. Methane Emissions from Cattle. J. Anim. Sci. 73, 2483–2492.
- Kiran, D., Krishnamoorthy, U., 2007. Rumen fermentation and microbial biomass synthesis indices of tropical feedstuffs determined by the in vitro gas production technique. Anim. Feed Sci. Technol. 134, 170–179.
- Knapp, J.R., Laur, G.L., Vadas, P. a, Weiss, W.P., Tricarico, J.M., 2014. Invited review: Enteric methane in dairy cattle production: Quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. J. Dairy Sci. 97, 3231–3261.
- Krishnamoorthy, U., Robinson, P.H., 2010. Prediction of rumen microbial N supply in bovines from dietary values of partitioning factor (PF), in vitro rate of gas production (k), neutral detergent fibre and crude protein: A brief systematic review of studies completed in Bengaluru (India). Anim. Feed Sci. Technol. 160, 167–171.
- Krishnamoorthy, U., Rymer, C., Robinson, P.H., 2005. The in vitro gas production technique: Limitations and opportunities. Anim. Feed Sci. Technol. 123-124, 1–7.
- Krueger, N. a., Adesogan, a. T., Staples, C.R., Krueger, W.K., Dean, D.B., Littell, R.C., 2008. The potential to increase digestibility of tropical grasses with a fungal, ferulic acid esterase enzyme preparation. Anim. Feed Sci. Technol. 145, 95–108.
- Kurihara, M., Magner, T., Hunter, R.A., McCrabb, G.J., 1999. Methane production and energy partition of cattle in the tropics. Br. J. Nutr. 81, 227–34.
- Lana, R.P., Russell, J.B., Van Amburgh, M.E., 1998. The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production. J. Anim. Sci. 76, 2190–2196.
- Lascano, C.E., Maass, B., Keller-Grein, G., 1995. Forage quality of shrub legumes evaluated in acid soils, in: Evans, D.O., Szott, L.T. (Eds.), *Nitrogen Fixing Trees for Acid Soils. Nitrogen Fixing Tree Research Reports (Special Issue)*. Winrock International and NFTA, Morrilton, AR., p. 228.
- Lassey, K.R., Ulyatt, M.J., Martin, R.J., Walker, C.F., Shelton, I.D., 1997. Methane emissions measured directly from grazing livestock in New Zealand. Atmos. Environ. 31, 2905–2914.
- Leinmüller, E., Steingass, H., Menke, K.H., 1991. Tannins in ruminant feedstuffs. Biannu. Collect. Recent Ger. Contrib. Concern. Dev. through Anim. Res.
- Leng, R.A., 1990. Factors affecting the utilization of “poor-quality” forages by ruminants particularly under tropical conditions. Nutr. Res. Rev. 3, 277–303.

- Lesschen, J.P., van den Berg, M., Westhoek, H.J., Witzke, H.P., Oenema, O., 2011. Greenhouse gas emission profiles of European livestock sectors. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166-167, 16–28.
- Lopez, S., Newbold, C.J., 2007. Analysis of methane, in: Makkar, H.P.S., Vercoe, P.E. (Eds.), *Measuring Methane Production from Ruminants*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 1–14.
- Lorenz, M.M., Karlsson, L., Hetta, M., Udén, P., 2011. Recycling of microbial N and estimation of protein degradation by in vitro gas production. *Anim. Feed Sci. Technol.* 170, 111–116.
- Makkar, H.P.S., Blümmel, M., Becker, K., 1997. In vitro rumen apparent and true digestibilities of tannin-rich forages. *Anim. Feed Sci. Technol.* 67, 245–251.
- Makkar, H.P.S., Blümmel, M., Becker, K., 1995. In vitro effects of and interactions between tannins and saponins and fate of tannins in the rumen. *J. Sci. Food Agric.* 69, 481–493.
- Makkar, H.P.S., Sen, S., Blümmel, M., Becker, K., 1998. Effects of Fractions Containing Saponins from *Yucca schidigera*, *Quillaja saponaria*, and *Acacia auriculoformis* on Rumen Fermentation. *J. Agric. Food Chem.* 46, 4324–4328.
- Martin, C., Morgavi, D.P., Doreau, M., 2010. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal.* 4:3, 351–365.
- McAllister, T.A., Bae, H.D., Jones, G.A., Cheng, K.J., 1994. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *J. Anim. Sci.* 72, 3004–3018.
- McCrabb, G.J., Hunter, R.A., 1999. Prediction of methane emissions from beef cattle in tropical production systems. *Aust. J. Agric. Res.* 50, 1335 – 1340.
- McGinn, S.M., Beauchemin, K.A., Coates, T., Colombatto, D., 2004. Methane emissions from beef cattle: Effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumaric acid. *J. Anim. Sci.* 82, 3346–3356.
- McL. Dryden, G., 2008. Secondary substances in concentrates and roughages, in: *Animal Nutrition Science*. CAB International, London, England, pp. 74–84.
- McLeod, M.N., 1974. Plant tannins - their role in forage quality. *Nutr. Abstr. Rev.* 44, 803–815.
- Mcnabb, W.C., Aerts, R.J., Brand, A., Peters, J.S., Foo, Y.L., Waghorn, G.C., 1997. Effect of Condensed Tannin in *Lotus Corniculatus* and *Lotus Pedunculatus* on Digestion of Rubisco in the Rumen, in: *International Congress Series*. pp. 9–10.
- Mcsweeney, C.S., Palmer, B., Kennedy, P.M., Krause, D., 1998. Effect of Calliandra Tannins on Rumen Microbial Function, in: *Proceedings of Australian Society of Animal Production*. p. 4068.
- McSweeney, C.S., Palmer, B., McNeill, D.M., Krause, D.O., 2001. Microbial interactions with tannins: Nutritional consequences for ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.* 91, 83–93.
- Menke, K.H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D., Schneider, W., 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. *J. Agric. Sci.* 93, 217.
- Menke, K.H., Steingass, H., 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Dev.* 28, 7–55.
- Min, B.R., Attwood, G.T., Reilly, K., Sun, W., Peters, J.S., Barry, T.N., McNabb, W.C., 2002. *Lotus corniculatus* condensed tannins decrease in vivo populations of proteolytic bacteria and affect nitrogen metabolism in the rumen of sheep. *Can. J. Microbiol.* 48, 911–921.

- Minson, D.J., 1990. Energy utilization by ruminants, in: *Forage in Ruminant Nutrition*. Academic Press Inc., New York, USA, pp. 150–161.
- Moe, P.W., Tyrrell, H.F., 1979. Methane production in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 62, 1583–1586.
- Molina Botero, C.I., Cantet, J.M., Montoya, S., Correa Londoño, G.A., Barahona Rosales, R., 2013. Producción de metano in vitro de dos gramíneas tropicales solas y mezcladas con *Leucaena leucocephala* o *Gliricidia sepium*. *Rev. CES Med Vet y Zoot* 8, 15–31.
- Morgavi, D.P., Forano, E., Martin, C. and Newbold, C.J., 2010. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Anim.* 4:7, 1024–1036.
- Moss, A.R., Givens, D.I., Garnsworthy, P.C., 1995. The effect of supplementing grass silage with barley on digestibility, in sacco degradability, rumen fermentation and methane production in sheep at two levels of intake. *Anim. Feed Sci. Technol.* 55, 9–33.
- Moss, A.R., Jouany, J.P., Newbold, J., 2000. Review article Methane production by ruminants : its contribution to global warming. *Ann. Zootech.* 49, 231–253.
- Mould, F.L., 2003. Predicting feed quality - Chemical analysis and in vitro evaluation. *F. Crop. Res.* 84, 31–44.
- Mould, F. L. and E. R. Ørskov. 1984. Manipulation of rumen fluid pH and its influence on cellulolysis in sacco, dry matter degradation and the rumen microflora of sheep offered either hay or concentrate. *Anim. Feed Sci. Technol.* 10:1-14.
- Mould, F.L., Kliem, K.E., Morgan, R., 2005a. Alternative methodologies – stretching the in vitro box. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124, 501–515.
- Mould, F.L., Kliem, K.E., Morgan, R., Mauricio, R.M., 2005b. In vitro microbial inoculum: A review of its function and properties. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124, 31–50.
- Mould, F.L., Morgan, R., Kliem, K.E., Krystallidou, E., 2005c. A review and simplification of the in vitro incubation medium. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124, 155–172.
- Nagadi, S., Herrero, M., Jessop, N.S., 2000. The influence of diet of the donor animal on the initial bacterial concentration of ruminal fluid and in vitro gas production degradability parameters. *Anim. Feed Sci. Technol.* 87, 231–239.
- Nagadi, S., Herrero, M., Jessop, N.S., 1999. Effect of frequency of ovine ruminal sampling on microbial activity and substrate fermentation, in: *Proc. Br. Soc. Anim. Sci.* p. 154.
- Nagajara, T.G., Newbold, C.J., Van Nevel, C.J., Demeyer, D., 1997. Manipulation of Ruminal Fermentation, in: Hobson, P.N., Stewart, C.S. (Eds.), *The Rumen Microbial Ecosystem*. Blackie Academic & Professional, London, England, pp. 523–632.
- NRC, 2001. *Nutrient Requirement of Dairy Cattle*, 6th ed. ed. National Academy of Sciences, Washington, DC, USA.
- Odongo, N.E., Bagg, R., Vessie, G., Dick, P., Or-Rashid, M.M., Hook, S.E., Gray, J.T., Kebreab, E., France, J., McBride, B.W., 2007. Long-term effects of feeding monensin on methane production in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90, 1781–8.
- Ørskov, E.R., McDonald, I., 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *J. Agric. Sci.*
- Patra, A.K., Saxena, J., 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry* 71, 1198–1222.
- Patra, A.K., Saxena, J., 2009. Dietary phytochemicals as rumen modifiers: a review of the effects on microbial populations. *Anton. van Leeuwen* 96, 363–375.
- Payne, J.S., Hamersley, a R., Milligan, J.C., Huntington, J. a, 2002. The affect of rumen fluid collection time on its fermentative capacity and the stability of rumen conditions in

- sheep fed a constant diet ., in: Proceedings of British Society of Animal Production. p. 165.
- Pell, A.N., Schofield, P., 1993. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion in vitro. *J. Dairy Sci.* 76, 1063–1073.
- Pellikaan, W.F., Stringano, E., Leenaars, J., Bongers, D.J.G.M., Schuppen, S.V.L.V., Plant, J., Mueller-Harvey, I., 2011. Evaluating effects of tannins on extent and rate of in vitro gas and CH₄ production using an automated pressure evaluation system (APES). *Anim. Feed Sci. Technol.* 166-167, 377–390.
- Pinares-Patiño, C.S., Ulyatt, M.J., Waghorn, G.C., Lassey, K.R., Barry, T.N., Holmes, C.W. and Johnson, D.E., 2003. Methane emission by alpaca and sheep fed on lucerne hay or grazed on pastures of perennial ryegrass/white clover or birdsfoot trefoil. *J. Agr. Sc.* 140, 215-226.
- Piwonka, E.J., Firkins, J.L., 1993. Effect of Glucose on Fiber Digestion and Particle-Associated Carboxymethylcellulase Activity In Vitro. *J. Dairy Sci.* 76, 129–139.
- Preston, T.R., Leng, R.A., 1980. Utilization of tropical feeds by ruminants, in: Ruckebusch, Y., Thivend, P. (Eds.), *Digestive Physiology and Metabolism in Ruminants*. AVI Publishing Company, Inc., Westport, Connecticut, p. 854.
- Quinn, M.J., May, M.L., Hales, K.E., DiLorenzo, N., Leibovich, J., Smith D.R. and Galyean, M. L., 2009. Effects of ionophores and antibiotics on in vitro hydrogen sulfide production, dry matter disappearance, and total gas production in cultures with a steam-flaked corn-based substrate with or without added sulfur. *J. Anim. Sci.* 87 - 5, 1705-1713.
- Rearte, D., 2011. Situación actual y prospectiva de la ganadería argentina , un enfoque regional. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 19, 46–49.
- Reed, J.D., 1995. Nutritional Toxicology Polyphenols in of Tannins and Related Forage Legumes. *J. Anim. Sci.* 73, 1516–1528.
- Rittner, U., Reed, J.D., 1992. Phenolics and in-vitro degradability of protein and fibre in West African browse. *J. Sci. Food Agric.* 58, 21–28.
- Rodríguez, R., Fondevila, M., Castrillo, C., 2009. In vitro ruminal fermentation of Pennisetum purpureum CT-115 supplemented with four tropical browse legume species. *Anim. Feed Sci. Technol.* 151, 65–74.
- Rymer, C., Huntington, J.A., Givens, D.I., 1999. Effects of inoculum preparation method and concentration, method of inoculation and pre-soaking the substrate on the gas production profile of high temperature dried grass. *Anim. Feed Sci. Technol.* 78, 199–213.
- Rymer, C., Huntington, J.A., Williams, B.A., Givens, D.I., 2005. In vitro cumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124, 9–30.
- Salem, A.Z.M., Robinson, P.H., El-Adawy, M.M., Hassan, A.A., 2007. In vitro fermentation and microbial protein synthesis of some browse tree leaves with or without addition of polyethylene glycol. *Anim. Feed Sci. Technol.* 138, 318–330.
- SAS, 2002. User's Guide: Statistics Ver 9.0.
- Schofield, P., Pell, A.N., 1995a. Validity of Using Accumulated Gas Pressure Readings to Measure Forage Digestion In Vitro: A Comparison Involving Three Forages. *J. Dairy Sci.* 78, 2230–2238.
- Schofield, P., Pell, A.N., 1995b. Measurement and Kinetic Analysis of the Neutral Detergent-Soluble Carbohydrate Fraction of Legumes and Grasses. *J. Anim. Sci.* 73, 3455–3463.

- Singh, S., Anele, U.Y., Edmunds, B., Südekum, K.-H., 2014. In vitro ruminal dry matter degradability, microbial efficiency, short chain fatty acids, carbohydrate and protein fractionation of tropical grass-multipurpose tree species diets. *Livest. Sci.* 160, 45–51.
- Smith, D., 1981. Removing and analyzing total nonstructural carbohydrates from plant tissue.
- Snedecor, G.W., Cochran, W.G., 1989. *Statistical Methods*. 8th Ed. Ames: Iowa State Press.
- Soliva, C.R., Hess, H.D., 2007. Measuring methane emission of ruminants by in vitro and in vivo techniques, in: Makkar, H.P.S., Vercoe, P.E. (Eds.), *Measuring Methane Production from Ruminants*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 15–31.
- Soliva, C.R., Zeleke, A.B., Clément, C., Hess, H.D., Fievez, V., Kreuzer, M., 2008. In vitro screening of various tropical foliage, seeds, fruits and medicinal plants for low methane and high ammonia generating potentials in the rumen. *Anim. Feed Sci. Technol.* 147, 53–71.
- Stefanon, B., Pell, A.N., Schofield, P., 1996. Effect of Maturity on Digestion Kinetics of Water-Soluble and Water-Insoluble Fractions of Alfalfa and Brome Hay. *J. Anim. Sci.* 74, 1104–1115.
- Stewart, C.S., Flint, H.J., Bryant, M.P., 1997. The rumen bacteria, in: Hobson, P.N., Stewart, C.S. (Eds.), *The Rumen Microbial Ecosystem*. Blackie Academic and Professional, London, England, pp. 10–72.
- Tavendale, M.H., Meagher, L.P., Pacheco, D., Walker, N., Attwood, G.T., Sivakumaran, S., 2005. Methane production from in vitro rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124, 403–419.
- Terril, T.H., Rowan, A.M., Douglas, G.B., Barry, T.N., 1992. Determination of extractable and bound condensed tannin concentrations in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains. *J. Sci. Food Agric.* 58, 321–329.
- Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McAllan, A.B., France, J., 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48, 185–197.
- Tiemann, T.T., Avila, P., Ramírez, G., Lascano, C.E., Kreuzer, M., Hess, H.D., 2008. In vitro ruminal fermentation of tanniniferous tropical plants: Plant-specific tannin effects and counteracting efficiency of PEG. *Anim. Feed Sci. Technol.* 146, 222–241.
- Tilley, J.M.A., Terry, R.A., 1963. A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops. *Grass Forage Sci.* 18, 104–111.
- Ulyatt, M.J., Lasey, K.R., Shelton, I.D., Walker, C.F., 2002. Methane emission from dairy cows and wether sheep fed subtropical grass-dominant pastures in midsummer in New Zealand. *New Zeal. J. Agric. Res.* 45, 227–234.
- Ungerfeld, E.M., 2015. Shifts in metabolic hydrogen sinks in the methanogenesis-inhibited ruminal fermentation: a meta-analysis. *Front. Microbiol.* 6:37.
- Van Soest, P.J., 1994. *The Nutritional Ecology of the Ruminant*, 2nd editio. ed. Cornell University Press, Ithaca, NY.
- Van Soest, P.J., 1967. Development of a comprehensive system of feed analyses and its application to forages. *J. Anim. Sci.* 26, 119–128.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583–3597.

- Van Soest, P.J., Wine, R.H., Moore, L.A., 1966. Estimation of the true digestibility of forages by the in vitro digestion of cell walls., in: 10th International Grasslands Congress. Finish Grassland Association, Helsinki. Finland, pp. 438–441.
- Waghorn, G.C., Clark, D.A., 2006. Greenhouse gas mitigation opportunities with immediate application to pastoral grazing for ruminants. *Int. Congr. Ser.* 1293, 107–110.
- Waghorn, G.C., Shelton, I.D., McNabb, W.C., McCutcheon, S.N., 1994. Effects of condensed tannins in *Lotus pedunculatus* on its nutritive value for sheep. 2. Nitrogenous aspects. *J. Agric. Sci.* 123, 109–119.
- Waghorn, G.C., Tavendale, M.H., Woodfield, D.R., 2002. Methanogenesis from forages fed to sheep. in: *Proceedings of the New Zealand Grasslands Association.* 64. 167-171.
- Watson, R.T., Meira Filho, L.G., Sanhueza, E., Janetos, A., 1992. Greenhouse gases: Sources and sinks, in: Houghton, J.T., Callander, B.A., Varney, S.K. (Eds.), *Climate Change 1992: The Supplementary Report to the IPCC Scientific Assessment, Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC)*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 25–46.
- Wawrzkievicz, M., 2010. Conocimientos y criterios para la evaluación de la calidad y concentración energética de los forrajes ensilados. Tesis Doctoral. EPG Alberto Soriano, Fac. de Agronomía, Universidad de Buenos Aires (FAUBA), Argentina.
- Wawrzkievicz, M., Danelón, J.L., 2004. Mejoramiento de la tecnica de produccion de gas in vitro para evaluar alimentos para rumiantes. Nuevo recipiente de incubación. *Rev. Argentina Prod. Anim.* 24, 187–197.
- Williams, B.A., 2000. Cumulative gas production techniques for forage evaluation, in: Givens, D.I., Owen, E., Axford, R.F.E., Omed, H.M. (Eds.), *Forage Evaluation in Animal Nutrition*. CAB International, pp. 189–213.
- Williams, C.M., Eun, J.S., MacAdam, J.W., Young, A.J., Fellner, V., Min, B.R., 2011. Effects of forage legumes containing condensed tannins on methane and ammonia production in continuous cultures of mixed ruminal microorganisms. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166-167, 364–372.
- Wolin, M.J., 1960. A theoretical rumen fermentation balance. *J. Dairy Sci.* 43, 1452–1459.