

**PRODUCCIÓN *In Vitro* DE METANO (CH₄) EN DIETAS COMPUESTAS DE
COLOSUANA (*Bothriochloa Pertusa*), ANGLETON (*Dichantium Aristatum*),
FRIJOL MUNGO (*Vigna Radiata*), ENSILAJE DE MAÍZ (*Zea Mays*) Y
CONCENTRADO COMERCIAL**

GUIOMAR STEFANY DÍAZ CRISPÍN
Trabajo de tesis para optar al título de
Médico Veterinario Zootecnista

Asesores:

JAIRO RICARDO MORA D.
Zoot. Msc. PhD
Departamento de ciencias
Pecuarias Universidad del Tolima

LUIS ALFONSO GIRALDO V.
Zoot. MgSc. PhD
Profesor Titular
Departamento de Producción Animal
Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín

UNIVERSIDAD DEL TOLIMA
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
IBAGUÉ – COLOMBIA

2014

	UNIVERSIDAD DEL TOLIMA	ACTA No. 003
	FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA	Fecha: 12 de abril de 2014
	ACTA SUSTENTACIÓN TESIS DE GRADO	Página 1 de 1

TESIS DE GRADO DIRIGIDA


Siendo las 12:00 horas del día sábado 12 de abril de 2014, se reunieron en la sala de internet de la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad del Tolima, el jurado calificador integrado por los doctores ROMÁN DAVID CASTAÑEDA SERRANO Y JESÚS HEMBERG DUARTE VARGAS con el Director de Tesis JAIRO RICARDO MORA DELGADO, para dar su concepto sobre el Trabajo de Grado Titulado: "PRODUCCIÓN *In Vitro* DE METANO (CH₄) EN DIETAS COMPUESTAS DE COLOSUANA (*Bothriochloa Pertusa*), ANGLETON (*Dichanthium Aristatum*), FRIJOL MUNGO (*Vigna Radiata*), ENSILAJE DE MAÍZ (*Zea Mays*) Y CONCENTRADO COMERCIAL", presentado y sustentado por la estudiante del programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia **GUIOMAR STEFANNY DÍAZ CRISPÍN**.

Luego de las correcciones y deliberaciones, el jurado asignó la calificación de:

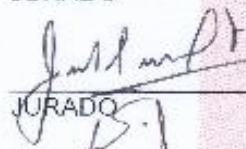
4,3 (cuatro tres) SOBRESALIENTE.

En constancia de lo anterior, firman:


ROMAN DAVID CASTAÑEDA SERRANO


JURADO

JESUS HEMBERG DUARTE VARGAS


JURADO

JAIRO RICARDO MORA DELGADO


DIRECTOR

COPIA SUSTENTACIÓN

DEDICATORIA

A Dios, Creador y Señor de todo cuanto existe, quien le plació en su infinita misericordia, proveer el conocimiento, la ciencia, la tecnología y los recursos necesarios para el desarrollo del presente trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitirme estudiar tan maravillosa carrera. En el transcurso de la misma, y en toda mi vida, no puedo más que reconocer su gracia y favor para conmigo.

A mis padres Graciela Crispín Martínez y Alberto Díaz Ospina, por su respaldo y amor incondicional.

A mi Facultad de Medicina Veterinaria y zootecnia de la Universidad del Tolima, por su apoyo moral y económico.

A las profesoras Indira Isis García y Vilma A. Holguín, por su colaboración en la contextualización del proyecto.

A la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, por permitirme el privilegio de usar sus instalaciones.

Al profesor Luis Alfonso Giraldo, por brindarme la oportunidad, de realizar la parte experimental del proyecto, y su tutoría constante en el desarrollo del mismo.

A los investigadores Alejandra Marín Gómez, Wilyer García, Diana Valencia y Paula Giraldo, por su apoyo constante en el desarrollo de la investigación.

Al grupo de investigación de Biotecnología Ruminal (BIORUM). Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.

A mi familia por sus oraciones y afecto fraterno, y a todo aquel que llegó a mí con una palabra de aliento, con una idea, o que se dejó usar por Dios, para establecer conexión con quienes me respaldaron en el desarrollo de este proyecto.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	10
2. JUSTIFICACIÓN	12
3. OBJETIVOS	13
3.1.GENERAL	13
4. MARCO TEÓRICO	14
4.1.EL CALENTAMIENTO GLOBAL	14
4.2.FERMENTACIÓN RUMINAL	16
4.3.DETERMINACIÓN DE GASES MEDIANTE LA TÉCNICA DE GASES	25
5. METODOLOGÍA	27
5.1.LOCALIZACIÓN.....	27
5.2.MATERIALES.....	27
5.3.CARACTERIZACIÓN BROMATOLÓGICA DE LOS SUSTRATOS UTILIZADOS... 31	
5.4.DETERMINACIÓN DE LA DIGESTIBILIDAD <i>In Vitro</i>	32
5.5.EXTENSIÓN DE LA FERMENTACIÓN RUMINAL <i>In Vitro</i> , USANDO LA TÉCNICA DE GASES.....	33
5.6.CINÉTICA DE LA FERMENTACIÓN RUMINAL <i>In Vitro</i>	34
5.7.MEDICIÓN DE pH.....	36
5.8.DETERMINACIÓN DE AMONIO.....	36
5.9.ANÁLISIS ESTADÍSTICO	37
6.RESULTADOS	38
6.1.PARÁMETROS DE LA FERMENTACIÓN RUMINAL <i>In Vitro</i> – TÉCNICA DE GASES 38	
6.2.DETERMINACIÓN DE GAS CH ₄ Y AGVS, EN LA TÉCNICA DE GASES	40
7.DISCUSIÓN	43

7.1.EXTENSIÓN DE FERMENTACIÓN RUMINAL	43
7.2.DETERMINACIÓN DE AGVS Y CH ₄	46
7.3.PARÁMETROS DE LA CINÉTICA DE FERMENTACIÓN RUMINAL <i>In Vitro</i>	48
8.CONCLUSIONES	51
9.RECOMENDACIONES	52
10.REFERENCIAS.....	53

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Caracterización nutricional de los alimentos usados para conformar las dietas.....	29
Tabla 2. Composición nutricional de las dietas en prueba.....	30
Tabla 3. Valores promedios de los parámetros de fermentación ruminal <i>in vitro</i> a las 48 y 60 horas de fermentación de los tres tratamientos evaluados.....	39
Tabla 4. Estimación de la producción de gas CH ₄ y AGVs, a las 48 y 60 horas pos-fermentación ruminal <i>in vitro</i> , en los tres tratamientos utilizados para el experimento.....	41
Tabla 5. Parámetros de la cinética de fermentación ruminal <i>in vitro</i> de los tres tratamientos evaluados en el experimento.....	42

RESUMEN

Se evaluaron tres dietas utilizadas comúnmente para alimentación de bovinos en el Departamento del Tolima, con la finalidad de estimar la emisión de metano a través de la fermentación ruminal *in vitro*. Se utilizó la técnica de digestibilidad *in vitro* mediante incubación en un equipo DaisyII® y la prueba de fermentación ruminal *in vitro* con cultivos no renovados de microorganismos ruminales (CNRMR). Así mismo se realizó una cinética de fermentación ruminal a ocho tiempos. En la incubación con el equipo DaisyII®, se encontró, que al incluir frijol mungo en la dieta (10% -Tto 2), mejora la DIVMS, y al ofrecer una dieta a base de *Dichantium aristatum* más *Bothriochloa pertusa*, habrá una menor DIVMS. El tratamiento con gramíneas (Tto 1) posee altas cantidades de fibra, lo cual afectó negativamente la degradabilidad de la pared celular. Se sometieron las tres dietas, a la prueba de fermentación ruminal *in vitro* (técnica de gases), con incubaciones de 48 y 60 horas. Los resultados, revelan que no hubo diferencias significativas ($p>0,05$) en la producción de gas a las 48 horas y a las 60 horas. A las 48 horas de medición, el tratamiento con inclusión de *Vigna radiata*, mostró una mayor producción de amonio ($P<0,05$). Además, no hubo diferencias entre los tratamientos en cuanto a la producción de metano. Contrario a esto, hubo diferencias ($P<0,05$) entre los AGVs totales, evidenciando mayor proporción acetato:propionato el tratamiento 1 ($P<0,05$). La cinética de producción de gas, no mostró diferencias entre los tratamientos, en cuanto a los parámetros evaluados.

Palabras clave: Emisión de metano, fermentación ruminal, DIVMS (digestibilidad *in vitro* de la materia seca), CNRMR (cultivos no renovados de microorganismos ruminales).

ABSTRACT

Three diets had been tested, commonly used to feed cattle in Tolima province, with main purpose to estimate Methane emission through rumen fermentation *in-vitro*. Technic of digestibility *in vitro* through hatching in a Daysi II equipment and the rumen fermentation *in vitro* test with non-cultured renew rumen microorganisms, likewise a kinetic rumen fermentation on eight stages was made. During hatching with Daysi II was found that including mungo bean on dietary (10%-2Tto) improves the DIVMS and offering a diet based on *Dichantium aristatum* plus *Bothriochloa pertusa*, there will decrease DIVMS. Treatment with grasses (Tto 2) was rich in fiber, which negatively affects cell wall degradability. The three diets were submit to the rumen fermentation *in vitro* test (gas technic) with 48 and 60 hours periods of hatching. Results reveal that wasn't any relevant differences on gas production between 48 hours to 60 hours ($P < 0,05$). To the 48 hours measurement, treatment including *Vigna radiata* indicates higher ammonium production ($P < 0,05$), beside there wasn't any differences among treatments as methane production. On the other hand there was a difference of ($P < 0,05$) among AGVs total, proving a higher portion of acetate, approving treatment 1 ($P < 0,05$), Kinetic gas production did not reveal differences among treatments, and tested patterns.

Key words: *Methane emission, Rumen fermentation, DMDIV (dry matter digestibility in vitro), NCRRM(Non-cultured renew rumen microorganisms).*

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, las proyecciones de los estándares climáticos pronostican un aumento de la temperatura media anual en la superficie del planeta de 1 – 3,5 °C para dentro de unos 90 años, un incremento medio mundial del nivel del mar de entre 15 y 95 cm, y un cambio en espacio y tiempo de las precipitaciones (Watson et al., 1997). Así mismo, se presagia que la rapidez del calentamiento global, será mayor que la experimentada desde hace alrededor de 10mil años y se considera que será evidente la variabilidad natural, y a nivel regional los cambios podrían diferir marcadamente del valor medio mundial (Watson et al., 1997).

Por estas razones, resulta importante comprender el origen de los agentes que producen estos fenómenos de manera que permitan proponer posibles cambios que ayuden a solucionar la problemática tan evidente hoy en día como el cambio climático, tema el cual infieren las actividades agrícolas y ganaderas, contribuyendo a través de una serie de procesos (Berra & Finster, 2002).

En particular, la ganadería contribuye a emitir CH₄ a través de la fermentación entérica, mediante la degradación de los alimentos consumidos, y excreciones (Berra & Finster, 2002), procesos que realizan una serie de microorganismos trabajando en un complejo sistema simbiótico formado por diferentes grupos microbiales, los cuales se encuentran a lo largo del tracto digestivo del rumiante, fundamentalmente en el rumen (Van Soest, 1994). El trabajo principal de estos microorganismos es metabolizar los carbohidratos administrados en la dieta del rumiante, y convertirlos principalmente en ácidos grasos volátiles AGVs, dentro los cuales, los más importantes son el acetato, propionato y butirato (Zavaleta, s.f.). En este proceso además se producen hidrógeniones, los cuales junto a los AGVs, deben ser retirados del rumen, para evitar efectos nocivos en el animal; es así, que los AGVs pasan a través de las paredes ruminales por un sistema de absorción y los H⁺ son eliminados mediante la formación de CH₄ (Vargas et al., 2012). Este gas (CH₄) y el CO₂, son producidos diariamente por el bovino, y así mismo

deben ser eliminados, proceso que sucede principalmente por eructación, ya que solo la fracción de la dieta que no pudo ser digerida, pasa al sistema digestivo y elimina esos gases a través del tracto posterior (Relling & Mattioli, 2008).

A través del presente estudio se planteó estimar la emisión de gas CH₄ *In Vitro*, de origen ruminal en bovinos, mediante el uso de la técnica de gases, empleando tres tipos de dietas, compuestas de colosuana (*Bothriochloa Pertusa*), angleton (*Dichantium Aristatum*), frijol mungo (*Vigna Radiata*) y ensilaje de maíz (*Zea Mays*), utilizadas frecuentemente en alimentación de bovinos, en el Departamento del Tolima.

2. JUSTIFICACIÓN

Uno de los principales problemas en la actualidad, es el calentamiento global, siendo importante principalmente, por la manera y rapidez en que se viene presentando. En la manifestación de este fenómeno interfieren principalmente los gases de efecto invernadero GEI, los cuales durante los últimos años se han venido incrementando (Semarnat, 2009).

Según la FAO (2009), “La ganadería bovina representa una importante fuente de GEI, principalmente por las emisiones de gas CH₄”. De tal manera, la estimación de la generación de gases producto de la actividad ganadera, se ha convertido en un reto para el sector agropecuario en general.

El departamento del Tolima es una zona de importante producción ganadera, en la cual se desconoce la generación de CH₄ a la atmosfera. En ese orden de ideas se justifica conocer la producción de CH₄ entérico, producto de la fermentación anaeróbica ruminal, a partir de las principales dietas suministradas al ganado bovino en esta región. Por lo tanto, se evaluaron tres dietas usadas en la región, compuestas por pastos Angleton, *Dichantium aristatum* y Colosuana, *Bothriochloa pertusa*, ensilaje de maíz, *Zea mays*, frijol, mungo *Vigna radiata* y concentrado comercial. Una vez conocido el grado de contaminación que generan estos sistemas y de acuerdo a la práctica de manejo nutricional bajo la cual funcionan, se pretende proponer alternativas que permitan mitigar o disminuir la producción de gases que afectan el medio ambiente, especialmente CH₄.

3. OBJETIVOS

3.1. GENERAL

Estimar la emisión *in vitro* de gas CH₄ de origen ruminal en bovinos, utilizando tres tipos de dietas compuestas de colosuana (*Bothriochloa Pertusa*), angleton (*Dichantium Aristatum*), frijol mungo (*Vigna Radiata*), ensilaje de maíz (*Zea Mays*) y concentrado comercial, utilizadas frecuentemente en alimentación de bovinos, en el Departamento del Tolima.

3.1.2. Específicos

- Determinar la composición bromatológica de Angleton (*Dichantium Aristatum*), pasto Colosuana (*Bothriochloa pertusa*), frijol mungo (*Vigna radiata*), silo de maíz (*Zea mays*) y concentrado comercial, colectados en el Departamento del Tolima.
- Evaluar el efecto de tres dietas compuestas de Colosuana (*Bothriochloa pertusa*), Angleton (*Dichantium Aristatum*), frijol mungo (*Vigna radiata*) y ensilaje de maíz (*Zea mays*), en los parámetros de la fermentación ruminal *in vitro* (Gas, DMS (degradabilidad de la materia seca), Amonio, pH, DFDN y DFDA (degradabilidad de la fibra en detergente neutro y en detergente ácido, respectivamente).
- Estimar la producción de gas CH₄ de las dietas compuestas, mediante cromatografía de gases.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. EL CALENTAMIENTO GLOBAL

FAO (2009), manifiesta que en la actualidad uno de los temas de mayor importancia, es el calentamiento global, debido a su gran impacto al medio ambiente, salud humana, economía, elevación del nivel de los mares, disminución de la capa de nieve y los cambios meteorológicos, entre los que se destaca el aumento de las precipitaciones a nivel global y cambios en la intensidad o reiteración de tormentas, inundaciones y sequías. Así mismo, existen proyecciones al respecto, donde se sugiere que la temperatura media tendrá un drástico aumento en los siguientes 90 años, sucesos, que entre más rápido ocurran, se tendrá mayor riesgo de que sobrepasen la capacidad humana para enfrentar sus consecuencias.

Según Berra & Finster (2002), se considera que para la segunda mitad del presente siglo, se incrementen las precipitaciones en las latitudes medio-altas y en la Antártida en invierno, mientras en las bajas latitudes se presentaran aumento o disminución de acuerdo a la zona.

De los principales gases de efecto invernadero se tiene un estimativo de acuerdo a su capacidad de influir en el calentamiento global, lo cual está basado en su impacto radiactivo y su subsistencia en la atmósfera. Según Berra y Finster (2002), “El potencial de calentamiento global de los principales GEI corresponde a: Dióxido de carbono (CO₂) =1, Metano (CH₄) =21, Óxido Nitroso (N₂O) =310” (p.1).

4.1.1. Gases de efecto invernadero GEI. Las Naciones Unidas (1998), mediante el Protocolo de Kyoto, vislumbran seis GEI: “CO₂, CH₄, N₂O, hidrofluorocarbonos HFC,

perfluorocarbonos PFC y hexafluoruro de azufre SF₆” (p. 22). No obstante, en agricultura y ganadería tan sólo son relevantes los tres primeros.

Uno de los principales GEI carbonado concerniente con la agricultura y la ganadería es el CH₄ (Bretsche, 2005), el cual es emitido en menores cantidades respecto al dióxido de carbono, pero con un potencial de calentamiento global muy superior, de 21 a 25 veces con respecto al del CO₂ (Berra & Finster, 2002 y Canet, 2010). El gas CH₄, producido por el rumiante, se forma mediante el proceso de degradación de la materia orgánica ingerida (Olvera et al., 2007), por acción de un complejo de microorganismos ruminales (Van Soest, 1994).

Según Montenegro y Abarca (2000); Moss y Givens (2002) y Vargas et al. (2012), alrededor del 15 al 20% de CH₄ producido en el mundo, es emitido directamente a través de la actividad ganadera. Para lo cual, lo que sucede en el bovino, es un proceso digestivo en condiciones anaerobias, donde interfieren diferentes tipos de microorganismos, principalmente bacterias, las cuales degradan la celulosa convirtiéndola en glucosa, que luego pasa por efecto de fermentación a ácido acético y el CO₂ es reducido formando finalmente CH₄. Por lo cual se estima que la emisión de CH₄ simboliza energía alimenticia, que en lugar de ser aprovechada por el animal se pierde en forma de gas (Vargas et al., 2012; Montenegro & Abarca, 2000).

Una de las vías de eliminación de CH₄, es el eructo, el cual inicia en el rumiante luego de un mes de edad, puesto que a medida que obtiene un tipo de alimentación básicamente con sólidos, habrá retención en el retículo-rumen, y a través del proceso fermentativo se producen gases. Además, los niveles de emisión de CH₄ en animales adultos, puede alcanzar los 60 a 126 kg (Carmona et al., 2005).

Además, existen otras fuentes de emisión natural de gases, en humedales, pantanos o de manera antropogénica, como por ejemplo las actividades agrícolas (Canet, 2010). A medida que transcurre el tiempo, en la atmósfera se han ido acumulando estos gases, lo cual agrava la situación en cuanto a la retención de calor en la tierra. Puesto que la

función de los gases es retener un porcentaje del calor que es irradiado de la tierra hacia el espacio, luego de llegar a ella a través del sol. Al aumentar la retención de esos gases, se evidencia un incremento en la conservación de los mismos, concomitante a la retención de calor, lo cual ocasiona el efecto invernadero (Estrada, 2001).

Como consecuencias se estima la fusión de glaciares, produciendo incremento en el nivel de los océanos entre 18 y 59 cm. Además, se predice aumento en las olas de calor lo cual causará sequías, y lluvias tenebrosas que provocarán inundaciones, y así mismo un mayor ímpetu y periodicidad de huracanes, ventiscas y tornados (Duque, 2006).

En los últimos diez años, investigadores y políticos a nivel mundial, comenzaron a dar importancia a este tema, cuando consideraron que los bovinos eran una fuente potencial de contaminación atmosférica, de los que actualmente se estima una producción alrededor de 37% del CH₄ que llega a la atmósfera, de tal manera que algunos investigadores sugieren que los bovinos están generando mayor contaminación que los autos (Díaz, 2007), Además, este gas se encarga de reducir el volumen de iones hidroxilo (OH)⁻¹, alterando de tal forma, la capacidad de la atmosfera para auto-depurarse de contaminantes (Fernández, 2007).

4.2. FERMENTACIÓN RUMINAL

Berra y Finster (2002), sugieren que “debido a que la producción de CH₄ es el resultado de procesos digestivos, la cantidad emitida varía con el tipo de animal, con la naturaleza, cantidad y digestibilidad del alimento consumido y con el nivel de producción” (p. 2).

Los alimentos que consume el rumiante, son la base de subsistencia para los microorganismos, los cuales lo ingieren añadiendo sustancias tampón y eliminan los ácidos grasos producidos, manteniendo las condiciones de pH, humedad y temperatura

necesarias para el crecimiento bacteriano. De manera que esos microorganismos dependen del rumiante, a partir del alimento fibroso que este ingiera y el rumiante dependerá de los productos de la fermentación anaerobia realizada por dichos microorganismos, para cubrir sus necesidades nutritivas (López et al., 2007).

La función principal del proceso fermentativo ruminal, realizado por los microorganismos, es producir ácidos grasos volátiles, los cuales son aprovechados por el rumiante. También, existen productos que pueden resultar nocivos como el amoníaco o inútiles como el CH₄ (Leguizamón & Carreño, 2013).

Cuadro 1. Clasificación funcional de las bacterias ruminales y principales gases generados (Relling & Mattioli, 2008, p. 23).

Clasificación funcional de las bacterias ruminales. Grupo de bacterias	Característica funcional	Principales productos finales de su metabolismo
Celulolíticas	Fermentan hidratos de carbono estructurales de la pared celular (celulosa, hemicelulosa y pectinas)	AGV (especialmente acetato)
Amilolíticas	Fermentan hidratos de carbono de reserva de granos (almidón)	AGV (especialmente propionato)
Sacarolíticas	Fermentan hidratos de carbono simples (azúcares vegetales)	AGV (especialmente butirato)
Lactolíticas	Metabolizan el lactato	AGV (especialmente propionato)
Lipolíticas	Metabolizan las grasas	Ácidos grasos libres y AGV (especialmente propionato)
Proteolíticas	Degradan las proteínas	AGV y amoníaco (NH ₃)

Metanógenas	Producen CH ₄	CH ₄ .
Ureolíticas	Hidrolizan la urea	CO ₂ y NH ₃ .

Durante los procesos de digestión y degradabilidad anaeróbica de carbohidratos, principalmente estructurales, (preponderantes en dietas ricas en forrajes), y por acción fermentativa microbiana, se produce CH₄ (Kurihara et al., 1999).

4.2.1. Factores que afectan la población de microorganismos ruminales. Respecto a este concepto, Angeles, (2003) sugiere que:

La estrategia de alimentación de los rumiantes está basada en la simbiosis establecida entre los microorganismos ruminales y el animal huésped; ya que el rumiante aporta el medio ruminal y materias primas propicias, como la acidez, anaerobiosis, temperatura, ambiente reductor, entre otros; mientras, las bacterias trabajan en la utilización parcial de los alimentos para aprovechar forrajes los cuales son indigestibles para los mamíferos, con la consecuente aportación de productos de la fermentación con valor nutritivo para el rumiante como los ácidos grasos volátiles y proteína microbiana (p. 1).

Kamande (2006), sugiere que para que exista una mejor degradación, es importante un significativo periodo de retención ruminal. Además, cuando existe un buen movimiento ruminal, también habrá una mejor tasa de degradación ruminal. Es así, que la eficiente utilización del alimento consumido por el rumiante, se ve netamente afectada por el turnover (rotación o movimiento) ruminal, la tasa de fermentación, duración de la digestión y el volumen del rumen.

Cuando el rumiante, incrementa el consumo de materia seca, habrá menor eficiencia de conversión, por lo cual es necesario comprender la tasa de pasaje de los alimentos

con los cuales se formulan las raciones, con la finalidad de obtener un adecuado aprovechamiento nutricional (Kamande, 2006).

Los hongos son microorganismos de crecimiento lento (su multiplicación varía de 5-14 horas), al igual que los protozoarios (su multiplicación varía de 24-30 horas), para lo cual se necesita permanencia del alimento dentro del rumen (48 a 72 horas), para sostener de esta manera complejos poblacionales de microorganismos, indispensables para el aprovechamiento del alimento consumido por el bovino (Arcos et al., 2000; Vargas et al., 2012).

Angeles (2003), argumenta que de cada 15 Kg de materia seca ingerida, el rumiante aprovecha 10 Kg a través del proceso de degradación y fermentación microbiana, a un ritmo de degradación determinado por las características físicas y químicas del medio, y las interacciones entre distintos microorganismos. Palladino *et al.*, (2006) sugieren que:

La reducción del tamaño de partícula, mejora la degradación ya que aumenta la superficie de ataque para los microorganismos ruminales. Por otro lado, si el tamaño de partícula es excesivamente pequeño aumenta la tasa de pasaje y en consecuencia la fibra escapa más rápido del rumen con lo cual el tiempo para degradarse es menor (p. 2).

Se infiere que de la calidad de los forrajes, dependerá su procesamiento, ya que puede variar la oportunidad de ser atacada por los microorganismos y su velocidad de paso a través del tracto digestivo (Palladino et al., 2006).

El grado de dilución bacteriano, se relaciona directamente con la eficiencia de crecimiento bacteriano, que realizan, mediante su asociación al líquido ruminal, sólidos ingeridos y a la pared del rumen (Aguilera, 1988). De esta forma, el aumento en la tasa de dilución, favorece la fermentación microbiana, mejorando la producción.

4.2.2. Bacterias metanogénicas. El hidrógeno producido a través del proceso fermentativo en el rúmen, es eliminado principalmente mediante la formación de CH_4 , donde los principales microorganismos encargados son los metanogénicos (*Archaea*), destacándose principalmente: “*Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobacterium formicicum* y *Methanomicrobium mobile*, quienes reducen el dióxido de carbono usando el hidrógeno como fuente de energía” (Vargas et al., 2012, p. 3). De igual manera, Madigan et al., (1998), señalan que:

Las bacterias metanogénicas son las responsables de la formación de CH_4 a partir de sustratos monocarbonados o con dos átomos de carbono unidos por un enlace covalente: acetato $[\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2]^-$, H_2 , CO_2 , formato (CH_2O_2), metanol (CH_4O) y algunas metilaminas. Los organismos metanogénicos se clasifican dentro del dominio *Archaea*, y morfológicamente, pueden ser bacilos cortos y largos, cocos de varias ordenaciones celulares, células en forma de placas y metanógenos filamentosos, existiendo tanto Gram positivos como Gram negativos. Todas las bacterias metanogénicas que se han estudiado poseen varias coenzimas especiales, siendo la coenzima M, la que participa en el paso final de la formación de CH_4 (p. 1).

Para la formación de CH_4 , intervienen microorganismos en función del sustrato, lo cuales se presentan en dos grupos uno que consume hidrógeno y fórmico y otro grupo que consume metilos del acetato, metanol CH_4O y algunas aminas llamados metilotrópicos o acetoclásticos (Cairó & París, 1988).

Cuadro 2. Principales bacterias metanogénicas identificadas en rumen y sus características (UPRM [S.N], 2007, p. 3).

Familia	Características
Metanobacteriaceae	Bacilos largos o cortos; utilizan H ₂ y CO ₂ y algunas formato o alcoholes (OH) como substratos para metanogénesis; cocos que utilizan sólo H ₂ o CH ₄ O, la mayoría son Gram positivos; contienen pseudomureína; no mótiles; contenido de GC, 23-61%.
Metanotermaceae	Bacilos; los substratos para metanogénesis son H ₂ y CO ₂ ; Gram positivos; contienen pseudomureína; no mótiles; termofílicos extremos; contenido de GC, 33-34%.
Metanococcaceae	Cocos irregulares; los substratos para metanogénesis son H ₂ + CO ₂ y formato; Gram negativos; mótiles; contenido de GC, 29-34%.
Metanomicrobiaceae	Bacilos, espirilos, placas o cocos irregulares; utilizan H ₂ y CO ₂ algunas formato o alcoholes como substratos para metanogénesis; Gram negativos; mótiles y no mótiles; contenido de GC, 39-61%.
Metanocorpusculaceae	Pequeños, cocos irregulares; utilizan H ₂ y CO ₂ y algunas Usan formato o alcoholes como substratos para metanogénesis; Gram negativos; mótiles y no mótiles; contenido de GC, 48- 52%.
Metanosarcinaceae	Pseudosarcina, cocos irregulares; utilizan H ₂ y CO ₂ , acetato, compuestos metílicos como substratos para metanogénesis, nunca formato; cocos que utilizan sólo H ₂ o metanol; la mayoría son Gram positivos o negativos; frecuentemente no mótiles; contenido de GC, 36-52%.

4.2.3. Metanogénesis. Los microorganismos ruminales dependen del proceso de glucólisis para obtener energía, produciendo AGV, ATP y NADH⁺ H⁺. Hacen uso del

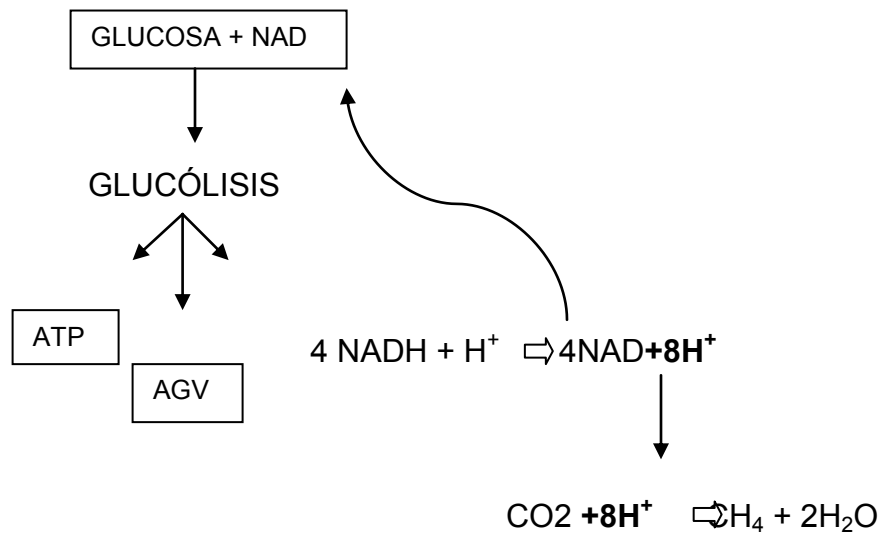
ATP como fuente de energía y luego eliminan producto de desecho, que son los ácidos grasos volátiles. AGV como un producto de desecho. Es necesario que el $\text{NADH} + \text{H}^+$, sea oxidado a NAD para poder degradar otra molécula de glucosa (Relling & Mattioli, 2003).

Mediante el proceso metabólico anaeróbico, los hidrogeniones producidos deben ser transferidos a diferentes aceptores de hidrógeno, donde, uno de los más importantes es el carbono, facilitando la formación de CH_4 . Compuesto que se elimina principalmente por eructación, con pérdidas de energía que alcanzan hasta el 18% de la energía suministrada a través de la dieta, pero que no puede ser aprovechado por el rumiante. Según la vía metabólica, y de acuerdo al AGV producido, el balance de hidrogeniones es el siguiente (Relling & Mattioli, 2003):

- a) glucosa \rightarrow 2 acetatos + 2 CO_2 + 8 H^+
- b) glucosa \rightarrow butirato + 2 CO_2 + 4 H^+
- c) glucosa + 4 H^+ \rightarrow 2 propionatos + 2 H_2O

Por ende, se sugiere que para formar un CH_4 , se necesitan 8 H^+ (tomados de 4 $\text{NADH} + \text{H}^+$ o FADH_2 que deben oxidarse).

Figura 1. Formación CH_4 (Carrillo, 2003).



Cada uno de los AGV producidos, durante su ruta metabólica demuestra que para la síntesis de propionato se consumen hidrogeniones, mientras que para la producción de acetato y butirato se eliminan hidrogeniones (principalmente en la formación de acetato) favoreciendo la formación de CH₄. De esto se infiere que administrando almidón en la dieta, habrá un buen aporte de energía, incrementando también la producción total de AGV (Relling & Mattioli, 2003).

4.2.4. Relación de la dieta con la producción de CH₄. Manipular la dieta, es una de las principales estrategias para mitigar la formación de metano. Carmona et al. (2005), sugieren que esta opción es creada principalmente para producciones en el trópico, donde las pasturas en general, son de baja calidad, lo cual se relaciona con bajo consumo, baja tasa de pasaje, bajos rendimientos en el animal, e incremento de las emisiones de CH₄.

Según Berra y Finster (2002), al mejorar la composición nutricional del forraje e implementar sistemas de suplementación como algunos estratos vegetales y los sistemas silvopastoriles, habrá mejor calidad fermentativa en el rumen, mayor productividad y disminución en las emisiones de CH₄.

Carmona et al. (2005), sugiere que “el 87% de la producción de CH₄ se da en el rumen, y 13% en el tracto digestivo posterior, del cual el 89% es absorbido hacia la sangre y expirado a través de los pulmones” (p. 4). Por tanto, el 98% del CH₄ producido por el rumiante, se elimina mediante eructación y se expira por los orificios nasales

Según Vargas et al. (2012), actualmente existen múltiples revisiones sobre la producción de CH₄ por los rumiantes (Carmona et al., 2005; Johnson & Johnson, 1995; Vargas et al., 2012). Algunas de ellas orientadas a determinar estrategias de alimentación que permitan reducir las emisiones de CH₄, reconociendo factores del animal (tasa de pasaje, consumo residual), de la dieta (composición, relación forraje:

concentrado), inclusión de aditivos (ácidos grasos, taninos purificados) y modificadores de las poblaciones ruminales (ionóforos) (p. 2).

La formación de bacterias, (especialmente metanogénicas) está afectada por la temperatura y humedad, por tanto, cuando el estiércol es depositado en un ambiente que favorezca la anaerobiosis, habrá producción de este gas. De lo contrario, se producirá poco o nada de CH₄ (Berra & Finster, 2002).

Vargas et al. (2012), en los reportes *in vitro* de la producción de CH₄, encontraron que por unidad de MS incubada, contrastando trébol *Trifolium pratense* respecto a *Ryegrass* perenne, disminuyó 7% de las emisiones de CH₄; además, mediante estudios *in vivo*, demostraron reducción del 25% por energía bruta ingerida, al comparar una dieta de gramínea *Bromus biebersteinii* versus una asociación de gramínea: leguminosa *Bromus biebersteinii*: *Medicago sativa*.

Vargas et al. (2012), sugieren que:

La inclusión de leguminosas en la dieta puede disminuir la producción de CH₄ por unidad de MS consumida hasta en un 53%. Esto se ha relacionado con un menor contenido de fibra en las dietas con leguminosas, una reducción en el pH, aumento del amonio, ácidos grasos volátiles y relación propionato: acetato en el rumen, mayor tasa de pasaje y la presencia de algunos metabolitos secundarios (p. 5).

Hunter (2007) identificó que las emisiones de CH₄, disminuyen en bovinos alimentados con gramíneas. Aunque, no todos los estudios aprueban ese concepto. Por ejemplo, estudios reportados por Vargas et al. (2012), indican que “hay aumentos en las emisiones de CH₄ al incluir una leguminosa en la dieta, debido a un mayor consumo voluntario, aumento en la digestibilidad y modificación de los patrones de fermentación asociados a la inclusión de la leguminosa” (p. 5).

Así mismo, el amoníaco, destacado como el principal compuesto nitrogenado que utilizan los microorganismos ruminales para la síntesis de aminoácidos y proteínas, se utiliza además para la formación de diversos componentes nitrogenados de la pared celular y ácidos nucleicos. Este compuesto es absorbido a la sangre, conducido al hígado en donde se forma urea, la cual puede llegar a la saliva o eliminarse a través de la orina (Brandan & Aispuru, 2005).

4.3. DETERMINACIÓN DE GASES MEDIANTE LA TÉCNICA DE GASES

Con la finalidad de simular procesos digestivos, se creó la técnica *in vitro*, que representa especialmente la digestión (Tilley & Terry, 1963) o también se usa la incubación del alimento *in situ* (en el rumen) (Keuren & Heineman, 1962).

La inversión económica y tiempo para realizar una técnica *in vitro*, es menor que la usada para realizar técnica *in vivo*, y además con esta técnica se favorecen las condiciones para el desarrollo experimental. “Sin embargo, para que un método de laboratorio sea eficiente debe ser fácilmente reproducible y estar altamente correlacionado con los indicadores *in vivo*” (Martínez et al., 2011, p. 2).

Según la técnica de Tilley y Terry (1963), el método de incubación depende de animales canulados como donantes de inóculo. Luego de montar el método para incubación, la evolución de la fermentación puede seguirse fácilmente hasta el final del periodo de control, sin necesidad de interrumpir el proceso.

Es así, que mediante la técnica *in vitro* para la producción de gases, se puede determinar la cinética y extensión de degradación de la dieta, usando el volumen de gas producido a través del proceso de fermentación ruminal (Theodorou et al., 1994).

En la técnica de gases, la incubación se lleva a cabo en botellas de vidrio provistas de un tapón de goma y selladas herméticamente. Las botellas se llenan con 1 g de sustrato y 90 ml de solución de incubación sin

inóculo. Previo a su sellado, son gasificadas con CO₂, y en un plazo no superior a 24 horas se inoculan al inyectar 10 ml por botella de líquido ruminal mezclado con un mismo volumen de solución de incubación. Luego de la inoculación, se igualan las presiones internas de las botellas, y los controles se realizan con un transductor de presión mediante punción a través del tapón. La sonda del transductor y la aguja están conectadas por una válvula en .T. que, tras cada pinchazo, permite la salida del gas para eliminar el efecto de una presión acumulada en sucesivas lecturas. Para efectuar las correcciones necesarias, la presión se relaciona con el volumen de gas extraído, o bien se determina paralelamente la relación entre presión y volumen en las condiciones experimentales por regresión. Por su simplicidad, este sistema permite la valoración simultánea de un amplio número de muestras (Fondevila & barrios, 2001, p. 3).

5. METODOLOGÍA

5.1. LOCALIZACIÓN

El trabajo de investigación fue realizado en instalaciones del Laboratorio BIORUM (Biotecnología ruminal) y el inóculo utilizado fue recolectado de bovinos Holstein (4 vacas) pastoreando la granja Paysandú, ambas unidades pertenecientes a la Universidad Nacional de Medellín. Esta granja, se encuentra ubicada en el corregimiento de Santa Elena, a 18 km de distancia hacia el oriente de la ciudad. La zona de vida es bosque muy húmedo montano bajo (bmh – MB), con una temperatura y precipitación media anual de 14°C y 2.500 mm respectivamente (Rios et al., 2004).

5.2. MATERIALES

5.2.1. Sustratos. Las muestras de los forrajes utilizados se colectaron en el Departamento del Tolima. La muestra de pasto Colosuana (*Bothriochloa pertusa*) se colectó en el municipio de Lérída, caracterizado por poseer una zona de vida bosque seco tropical según Holdridge, con temperatura promedio de 26°C, altitud 366 msnm y 100mm de precipitación anual (Decreto N° 086, 2008), con edad promedio de 30 días, el Angleton (*Dichantium Aristatum*) se tomó de heno proveniente de Armero (Granja la Reforma –U.T), (altitud 500 msnm), con una edad promedio de 40 días. El ensilaje de maíz (*Zea mays*) con edad de cosecha de 60 días y 20 días de fermentación, se colectó en la hacienda la Estrella del municipio de Alvarado - (altitud 412 msnm), el concentrado comercial y frijol mungo (*Vigna radiata*), se obtuvieron a través de un distribuidor para el Departamento del Tolima.

Estas muestras fueron empacadas en lonas de fibra, y llevadas al laboratorio de ecofisiología de la Universidad del Tolima, donde seguidamente fueron pesadas y

empacadas en sobres de papel, para someterlas al proceso de determinación parcial de materia seca (MS) (Masson, 2007).

Posteriormente, las muestras se trituraron en un molino tipo Willey y fueron tamizadas en una criba de 2 mm de diámetro. Después, se empacaron en bolsas de papel y se reembolsaron en bolsas plásticas y cerradas herméticamente, fueron trasladadas a la ciudad de Medellín.

5.2.2. Caracterización nutricional de los sustratos. La caracterización química y la digestibilidad de los sustratos, se detalla en la tabla 1. En esta se evidencia un alto contenido de fibra en los pastos Colosuana *Botriochloa pertusa* y Angleton *Dichantium aristatum*. Además, el frijol Mungo *Vigna radiata*, fue el único sustrato que estuvo siempre con valores menores en los parámetros evaluados, aunque presenta un mayor contenido de materia orgánica respecto a los otros.

Tabla 1. Caracterización bromatológica de los alimentos usados para conformar las dietas

Alimento	%FDN	% FDA	% Lig	% EE	% cenizas	% MO
Colosuana	74,89	38,41	4,49	1,81	8,92	91,08
Angleton	75,83	40,96	6,33	1,47	10,85	89,15
Ensilaje	58,00	31,56	4,67	3,50	6,56	93,43
Frijol Mungo	15,19	8,45	1,86	1,06	4,72	95,28
Concentrado	31,22	11,67	2,94	6,68	9,22	90,77

Evidencia los componentes nutricionales de las materias primas usadas en las dietas a evaluar. FDN (fibra en detergente neutro), FDA (fibra en detergente ácido), Lig (Lignina), MO (materia orgánica), cenizas, E.E. (extracto etéreo), PC (proteína cruda) y DIVMS (digestibilidad *in vitro* de la materia seca).

El concentrado y el ensilaje de maíz, evidenciaron un valor relevante respecto a su contenido de grasa, frente a los demás alimentos. De igual manera, el aporte mineral, fue bajo en el frijol mungo *Vigna radiata*, a diferencia de los otros sustratos.

5.2.3. Composición nutricional de las dietas. La composición nutricional y digestibilidad *in vitro* de las dietas, se presenta en la Tabla 2. En general se pueden apreciar un mayor contenido de proteína cruda y mayor digestibilidad en el tratamiento 2 el cual, a diferencia de los otros tratamientos, tiene inclusión de leguminosa. Así mismo, se evidencia menor digestibilidad en el tratamiento 1 frente a los otros tratamientos, lo cual pudo presentarse a causa de su alto contenido de fibra. De igual manera, el tratamiento 3, revela un aporte bajo de fibra y un alto porcentaje de energía, en lo que pudo inferir la inclusión de concentrado comercial, el cual contiene 6,68% (tabla 1) de extracto etéreo.

Tabla 2. Composición nutricional de las dietas en prueba

Tratamiento	%FDN	% FDA	% Lig	% EE	% cenizas	% MO	%PC	% DIVMS
T1	75,06	39,78	37,12	2,15	9,84	90,15	4,0	50,76
T2	62,38	34,46	33,94	2,39	8,30	91,69	7,8	58,20
T3	65,58	33,41	16,70	2,98	9,47	90,52	7,2	54,16

T1 Control, Pasto angleton 50% + colosuana 50%; T2 Pasto angleton y colosuana 60% + silo de maíz 30% + Frijol mungo 10%; T3 Pasto angleton y colosuana 70% + silo de maíz 10% + Concentrado 20%

Es evidente que al combinar los diferentes sustratos, el aporte mineral se presenta de manera muy similar para los tratamientos.

Para el tratamiento 2, se logró obtener un porcentaje de materia orgánica, lo que se relaciona especialmente a su contenido de proteína ya que además de pastos y silo, a diferencia de los otros tratamientos, contiene leguminosa.

5.2.4. Medios de cultivo. Las incubaciones *in vitro* se hicieron usando cultivos no renovados de microorganismos ruminales (CNRMR), mediante la técnica de gases referenciada por Theodorou et al. (1994). Para ello se usaron frascos con capacidad de 110 ml, en cada uno de los cuales se pesaron 0,5 g de MS de la dieta correspondiente. Para las incubaciones se utilizó líquido ruminal diluido en un medio de cultivo en proporción 1:4 respectivamente, (no limitante para el crecimiento microbiano).

El medio de cultivo se usó para medir digestibilidad *in vitro*, utilizando el incubador DaisyII®, el cual posee un sistema con agitación circular y una temperatura constantes, de $39 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ (Giraldo et al., 2007).

5.2.4.1. Preparación de los medios de cultivo. Para la preparación del medio de cultivo se añadió sucesivamente (por cada litro de medio de cultivo) 527,5 ml de agua destilada, 237,5 ml de una disolución mineral, 1,2 ml de una disolución de oligoelementos, 237,5 ml de una disolución amortiguadora, 1,2 ml de una disolución de resazurina y 50 ml de una disolución reductora. Esta mezcla se hizo para las pruebas de digestibilidad *in vitro* usando el incubador DaisyII® y la técnica extensión de fermentación ruminal (Theodorou et al., 1994). Teniendo presente que todos los medios de cultivo fueron preparados en el laboratorio de Biotecnología Ruminal siguiendo los protocolos dispuestos por Goering & Van Soest (1970).

Durante la preparación del medio de cultivo fue necesario colocar agitación, temperatura de 39°C y gaseo con CO_2 permanentes. Una parte importante durante la preparación es agregar rezarsurina, luego de la adición de la solución reductora, lo cual marca el paso de oxidación a reducción. Finalmente, se prepararon 1.600 ml de medio de cultivo para cada jarra, siendo cuatro jarras en total. En cada una de ellas se adicionó 400 ml de líquido ruminal (previamente mezclado y filtrado) (Giraldo et al., 2007).

Luego de preparar el medio para montar la extensión de fermentación ruminal *in vitro*, se vertió 50 ml a cada frasco.

Durante el desarrollo experimental de la técnica de fermentación ruminal *in vitro* se empleó un transductor de presión de tipo T453CEPA (Bailey y Mackey Ltd., Inglaterra), al cual fue necesario acoplarle una válvula de tres vías para controlar la medición y muestra de gas. La válvula tenía una primera salida conectada a una aguja (0,6 mm), la siguiente, conectada al transductor de presión y la tercera a una jeringa plástica de 20 ml. Además, se usó una balanza analítica de precisión, planchas de calentamiento con

agitación, termómetros digitales y microcentrífuga marca Hettich®, modelo MIKRO 200R.

5.2.5. Líquido ruminal. Se usó líquido ruminal colectado de cuatro vacas de raza Holstein, canuladas al rumen y alimentados con una dieta a base de Kikuyo (*Penisetum clandestinum*), de la granja Paysandú en Santa Elena, de la Universidad Nacional de Colombia (sede Medellín).

Para la colecta de líquido ruminal, fue necesario que los animales estuvieran previamente en un ayuno prolongado de 5 horas. Al momento de tomar las muestras fue necesario disponer de 4 termos con el fin de regular la temperatura del líquido a 39°C durante el transporte desde la granja hacia el laboratorio de Biotecnología Ruminal, donde al llegar, fue inmediatamente filtrado para eliminar residuos de pasto y material grueso, y se procedió a usarlo en las pruebas de fermentación ruminal.

5.3. CARACTERIZACIÓN BROMATOLÓGICA DE LOS SUSTRATOS UTILIZADOS

Para determinar el fraccionamiento de las fibras (fibra detergente neutra (FDN), fibra detergente acida (FDA) y lignina), se usó un analizador de fibras, marca ANKOM²⁰⁰⁰ (ANKOM Technology Corporation, Fairport, USA). Así mismo, para estimar la digestibilidad *in vitro*, de la MS se usó incubador DaisyII®, (ANKOM Technology Corporation, Fairport, USA). La FDN, FDA y lignina se determinaron siguiendo la técnica secuencial descrita por Van Soest et al., (1991) y Goering y Van Soest (1970), respectivamente. La digestibilidad *in vitro* de la MS, se determinó mediante los procedimientos de Goering & Van Soest (1970), para lo cual se usó un incubador DaisyII®.

EL extracto estéreo se estimó usando el equipo ANCOM XT Extraction System y Para determinar cenizas, se hizo por incineración directa, usando una mufla (500°C durante dos horas), según el método descrito por Van Soest et al. (1991).

5.4. DETERMINACIÓN DE LA DIGESTIBILIDAD *In Vitro*

La digestibilidad *in vitro* de la materia seca (MS), se determinó con el procedimiento recomendado por el fabricante para el incubador DaisyII®, (ANKOM Technology, Fairport, NY-USA). Se usaron bolsas FN N° 57 con un tamaño de poro de 25 µm y dimensiones de 5 x 4 cm, fabricadas de poliéster/polietileno con filamentos extruidos en una matriz de tres dimensiones. En cada bolsa, se colocó 0,5 g de muestra, obteniendo un área efectiva por bolsa de 36 cm² lo que corresponde a una relación tamaño de la muestra y superficie de la bolsa de 14,4 mg/cm². Seguidamente se prosiguió a sellarlas con calor (Giraldo et al., 2007) y así mismo, colocarlas dentro de las jarras de digestión. En cada una de las cuatro jarras se incubó una réplica de cada dieta.

Para los procedimientos de digestión ruminal *in vitro*, y estimación de la digestibilidad *in vitro* de la MS, se usaron soluciones descritas por Goering y Van Soest (1970).

De la manera en que se mencionó anteriormente, el inóculo ruminal utilizado durante los procedimientos, se recolectó de cuatro animales bovinos hembras de raza Holstein, canuladas al rumen, las cuales eran alimentadas en pastoreo libre con pasto kikuyo (*Penisetum clandestinum*). La preparación de las soluciones tampón (1600 ml/jarra) se realizó en condiciones anaerobias permanentes, mediante el gaseo permanente de CO₂, a las cuales se le agregó 400 ml (a cada una) de líquido ruminal (Proporciones 4:1, de medio de cultivo y líquido ruminal respectivamente).

Las muestras se incubaron durante 48 horas en el incubador DaisyII® a una temperatura de 39 ± 0,5°C, y agitación circular permanente. Luego de la incubación, las bolsas se lavaron con agua fría homogéneamente, se secaron de nuevo en una estufa de aire forzado a 60°C durante 48 horas y se pesaron las muestras de las bolsas en cada tratamiento y repetición, para determinar la degradabilidad de la materia seca (DMS).

5.5. EXTENSIÓN DE LA FERMENTACIÓN RUMINAL *In Vitro*, USANDO LA TÉCNICA DE GASES

La incubación se realizó en botellas de vidrio con capacidad para 110 ml. Un día antes de la inoculación con el líquido ruminal a las botellas se le adicionó 0,5 gr de muestra seca del forraje, de acuerdo a los siguientes tratamientos:

T1= Control, Pasto angleton 50% + colosuana 50%

T2= Pasto angleton y colosuana 60% + silo de maíz 30% + Frijol mungo 10%

T3= Pasto angleton y colosuana 70% + silo de maíz 10% + Concentrado 20%

Se efectuaron cuatro series de incubación, cada una con un inóculo ruminal diferente, de tal forma se obtuvieron cuatro réplicas para cada dieta. En cada incubación se incluyeron dos botellas que únicamente contenían la mezcla de líquido ruminal y el medio de cultivo (sin sustrato) para corregir los valores de producción de gas para la cantidad de gas producido como consecuencia de la fermentación de los substratos añadidos con el inóculo.

Se recolectó el líquido ruminal proveniente de cuatro vacas canuladas al rumen, ubicadas la granja Paysandú de la Universidad Nacional de Colombia en las horas de la mañana. A medida que se colectaba el líquido ruminal (a través de la cánula), este se iba filtrando mediante una muselina, vertiéndose directamente dentro de termos a temperatura de 39°C. Inmediatamente después de reunir líquido ruminal de las cuatro vacas, fue trasladado al laboratorio de Biotecnología Ruminal donde se filtró nuevamente mediante bolsa de nailon con un tamaño de poro de 53 µm, con el fin de retirar los sedimentos y pequeños residuos de pasto. Desde ahí se inicia un gaseo permanentemente con CO₂, colocándolo sobre una plancha que lo mantiene a temperatura constante de 39°C y agitación. Posteriormente el medio de cultivo se mezcló con el líquido (relación 4:1 respectivamente), y se dispensó un volumen de 50 ml dentro de los frascos que contenían el sustrato, manteniendo una constante termorregulación, agitación y gaseado con CO₂. A la par, las botellas se sellaban de forma hermética usando tapones de caucho y de aluminio. Estos frascos ya listos, se

agitaban suavemente de forma manual con movimientos circulares y se colocaban de inmediato dentro de la incubadora a temperatura constante de 39°C, permaneciendo así durante la técnica de gases, con tiempos fermentación ruminal *in vitro* de 48 y 60 horas. Finalmente se montaron cuatro series de incubación, cada una con un inóculo ruminal diferente, del tal forma que se obtuvo cuatro replicas para cada dieta.

Las botellas control, con solo el medio de cultivo y el líquido ruminal, se usaron para corregir la presión generada por el gaseado con CO₂ y la presión producida por la fermentación producto de los microorganismos ruminales presentes en el líquido ruminal, en ausencia de sustrato (Theodorou et al., 1994).

El volumen de gas producido se midió transcurridas 3h, 6h, 9h, 12h, 24h, 48h y 60h de incubación utilizando un medidor de presión y una jeringuilla graduada para la medición del volumen (Theodorou et al., 1994), y se tomó una muestra del gas producido a las 48 y 60 horas, en un tubo de vacío de 10 ml (Venoject®) destinadas a determinar la concentración en gas CH₄. Luego de desmontar la técnica, haciendo stop en la fermentación, se abrieron las botellas para medir el pH de su contenido y sacar muestras del líquido para analizar la concentración en ácidos grasos volátiles (AGVs) y amonio (NH₃) siguiendo el procedimiento de Giraldo et al. (2007). Luego se filtró el contenido de cada botella, a través de un crisol Pirex®, provisto de una placa porosa (nº 1). Luego, se colocaron en la estufa de aire forzado a 60°C durante 48 horas, para estimar la DMS. Así mismo, del residuo obtenido se determinó FDN y secuencialmente FDA para determinar la degradabilidad (DFND y DFDA).

5.6. CINÉTICA DE LA FERMENTACIÓN RUMINAL *In Vitro*

La determinación de la cinética fermentativa se llevó a cabo empleando la técnica semiautomática de producción de gases propuesta por Theodorou et al. (1994), para los diferentes tratamientos sometidos a pruebas de extensión de la fermentación ruminal *in vitro*. Para ello, se procedió a medir la presión de los gases mediante un transductor de presión (T453CEPA, Bailey y Mackey Ltd., Inglaterra), y el volumen

producido durante el proceso de fermentación, utilizando para ello, una jeringa plástica con una capacidad de 20 ml.

Fue extraído el gas hasta el momento en que el monitor digital registrara cero de presión, y el volumen de gas generado correspondiente a dicha presión, según el procedimiento descrito por Theodorou *et al.*, (1994). Los horarios de lectura de presión fueron los siguientes: 6 h, 9 h, 14 h, 22 h, 31 h, 48 h, 72 h y 96 h.

Theodorou *et al.* (1994), propusieron un modelo exponencial, para estimar los parámetros de fermentación ruminal *in vitro* y ajustar los datos. Mediante esta determinación, se sugiere que el gas producido será proporcional al tamaño de la población de microorganismos ruminales y al sustrato que sea digestible. Al iniciarse el proceso fermentativo, estos microorganismos representan el factor limitante y al finalizar la fermentación, el limitante para la fermentación y producción de gas es el sustrato. Por tanto, la mayor producción de gas se presenta cuando la mitad del sustrato ha sido fermentado. Ese comportamiento se representa mediante el siguiente modelo:

$$G=A(1-e^{-c(t-lag)})$$

Dónde: G (ml) es la producción acumulada de gas después de un tiempo de incubación t, A (ml) es el volumen de producción asintótica de gas; c (h⁻¹) es el ritmo o tasa fraccional o tasa de producción de gas, y lag (h) es el tiempo de retraso en el inicio de la producción de gas o período que se demoran en colonizar las bacterias del rumen el sustrato.

El tiempo colonización (lag) y la tasa o ritmo de degradación c por hora, han sido postuladas para variar con el tiempo t. así mismo, el ajuste de datos se realizó mediante el procedimiento NLIN del programa SAS (SAS, 2001). También se calculó el ritmo medio de fermentación (ml gas/h), usando el siguiente modelo:

$$RMF=Axc/[2(\ln 2+cxlag)]$$

Este representa el ritmo promedio de producción de gas entre el inicio de la incubación y el tiempo en cual la producción acumulativa de gas alcanza el valor asintótico.

5.7. MEDICIÓN DE PH

El pH en los efluentes, producto de la fermentación ruminal, se cuantificó al final la extensión de degradación en tiempos designados para la fermentación utilizando un pH-metro (Schoot Instruments® Modelo 2006) (Giraldo et al., 2007).

5.8. DETERMINACIÓN DE AMONIO

Después de finalizar el proceso fermentativo, se tomó una alícuota de 5 ml del efluente (medio de cultivo, líquido ruminal y tratamiento) y se llevaron a un tubo Falcon ® que contenía 5 ml de ácido clorhídrico al 0,5 N (dilución 1:1). Posteriormente estas muestras fueron centrifugadas en una centrifuga refrigerada marca Biofuge Primo R Heraeus ® a 4000 rpm durante 4 minutos a una temperatura de 4°C. Luego se tomaron 8 ml del sobrenadante y fueron depositados en frascos ámbar y refrigerados a 4°C.

El proceso de determinación de amonio, se hace usando electrodo ISE-Amonio, empleando balones volumétricos, en los cuales se prepara la solución madre (a concentración de 2.000 ppm de NH₄Cl), y desde allí, se constituyen soluciones a diferentes concentraciones (15, 50, 150, 450 y 1.350 ppm), con las cuales se hace la curva de calibración.

Así mismo, se adopta el electrodo, remojándolo en solución con pH de 7, aproximadamente durante 12 horas.

Para determinar amonio, se utiliza previamente hidróxido de sodio (NaOH) a 10 M, con la finalidad de ajustar el pH del cloruro de amonio (NH₄Cl), y luego se mide en cada

una de las muestras, colocando 5 ml de la muestra en un vaso precipitado de 200 ml, luego adicionar 100 ml de agua destilada y 0,5 ml de NaOH, de esta manera se coloca el electrodo ISE- Amonio y se deja durante 5min con rotación, luego de esto, el lector registra la concentración de amonio de la muestra.

5.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó el sistema de análisis estadístico llamado SAS, para el análisis de los datos obtenidos.

Los resultados para la prueba de digestibilidad *in vitro* utilizando el sistema DaisyII® y para la extensión de fermentación usando la técnica de gases, fueron analizados mediante un diseño de bloques completos al azar usando el procedimiento GLM del programa estadístico SAS (SAS, 2001) donde se utiliza el siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \mu + f_i + b_j + \varepsilon_{ij}$$

Dónde:

Y_{ij} : es la lectura del tratamiento *i*-ésimo en el *j*-ésimo bloque

μ : Es el promedio poblacional de la variable respuesta

f_i : Es el efecto del tratamiento “*i*”, con $i = 1, 2, \dots, t$

b_j : es el efecto del bloque “*j*”, con $j = 1, 2, \dots, r$

ε_{ij} : Es el error asociado con la lectura del *i*-ésimo tratamiento en el *j*-ésimo bloque.

En la extensión de fermentación con la técnica de gases, se utilizó el procedimiento de Tukey, mediante el cual, se detectó un efecto significativo ($P < 0,05$), y la comparación de medias para la prueba de digestibilidad *in vitro* en el sistema DaisyII®. Así mismo, el ajuste de los datos y el cálculo de los parámetros de fermentación ruminal *in vitro*, se realizó con el procedimiento NLIN del programa SAS (SAS, 2001).

6. RESULTADOS

6.1. PARÁMETROS DE LA FERMENTACIÓN RUMINAL *In Vitro* – TÉCNICA DE GASES

En el estudio sobre extensión de fermentación ruminal utilizando la técnica de gases, expresada en la tabla 3, se destaca lo siguiente: el tratamiento 1, a las 48 horas post-fermentación *in vitro*, registró la menor producción de gas (ml) a diferencia de los otros tratamientos utilizados; pero, no evidenció diferencia significativa ($P>0,05$) entre los tratamientos.

Tabla 3. Valores promedios de los parámetros de fermentación ruminal *in vitro* a las 48 y 60 horas de fermentación de los tres tratamientos evaluados.

(48 horas)	Gas (ml)	DMS (%)	Amonio (mg/dL)	pH (unidades)	% Dig FDN	% Dig FDA
T1	88,05	53,25 b	87,40 b	6,50	52,07	52,50
T2	103,77	61,35 a	103,40 a	6,47	52,07	54,17
T3	90,90	59,75 a	101,17 ab	6,47	60,20	65,17
Valor p del tto	0,2656	0,0002	0,040	0,880	0,176	0,387
(60 horas)	Gas (ml)	DMS (%)	Amonio (mg/dL)	pH (unidades)	% Dig FDN	% Dig FDA
T1	195,15	57,32 b	86,55	6,47	56,65	57,87
T2	214,00	64,35 a	89,30	6,50	56,55	57,62
T3	184,80	63,0 a	88,47	6,45	59,00	56,62
Valor p del tto	0,2760	0,0009	0,930	0,244	0,0457	0,4210

T1= Pasto angleton 50% + colosuana 50%; T2= Pasto angleton y colosuana 60% + silo de maíz 30% + Frijol mungo 10%; T3= Pasto angleton y colosuana 70% + silo de maíz 10% + Concentrado 20%.

La degradabilidad de la materia seca (DMS), luego de 48 horas de fermentación *in vitro*, muestra una estrecha relación con la producción de gas (ml), lo que infiere que al haber mayor digestibilidad, también habrá mayor producción de gas, teniendo el mismo comportamiento para los tres tratamientos. El tratamiento 1, mostró diferencia ($p<0,05$)

de DMS, respecto a los tratamientos, arrojando un bajo porcentaje. Aun así, la cantidad de gas emitida no varió significativamente respecto a los tratamientos.

A las 60 horas de fermentación *in vitro*, el tratamiento 1, continúa mostrando diferencia en la DMS respecto a los tratamientos, conservando el porcentaje de degradabilidad más bajo.

La producción de amonio (mg/dL), a las 48 horas, mostró diferencias ($p < 0,05$), entre los tratamientos. Sobresale el tratamiento 2, ya que fue el que tuvo la más alta producción de amonio, destacando una diferencia significativa ($p < 0,05$) luego de 48 horas de fermentación, respecto a los tratamientos. Es importante resaltar que el tratamiento 2, contiene inclusión de leguminosa, y por tanto, mayor aporte de proteína (tabla 2) respecto a los tratamientos.

El pH no tuvo diferencias ($p > 0,05$) entre los tratamientos, los cuales conservaron una media de pH de 6,47. Así mismo, la FDN y FDA, no mostraron diferencias ($p > 0,05$).

Es así, que los principales parámetros de fermentación ruminal de los tratamientos evaluados indicaron que a las 48 horas no hubo diferencias ($p > 0,05$) en la producción de gas (ml), en el pH como indicador de fermentación, ni tampoco en la degradación de la fibra representada en la DFDN y DFDA. Pero, la degradación de la materia seca y la producción de amonio si presentaron diferencias ($p < 0,05$) entre tratamientos a las 48 horas de fermentación (tabla 3).

A las 60 horas de fermentación, no hubo diferencias significativas ($p > 0,05$) en producción de gas (ml), en el pH, producción de nitrógeno amoniacal como resultado de la degradación proteica, ni tampoco en la DFDN y DFDA. Por el contrario, la degradación de la materia seca fue mayor ($p < 0,05$) en el tratamiento 1 tanto a las 48 como a las 60 horas.

6.2. DETERMINACIÓN DE GAS CH₄ Y AGVS, EN LA TÉCNICA DE GASES

En las tablas 4 y 5, se observa que la producción de gas CH₄ (ml) fue similar entre los tratamientos, tanto a las 48 como a las 60 horas. Sin embargo, al observar la producción de ácidos grasos volátiles AGVs, se evidencian diferencias ($p < 0,05$) entre los tratamientos, destacándose al tratamiento 2, ya que produjo más AGVs a las 48 y 60 horas de fermentación, respecto a los otros tratamientos.

Tabla 4. Producción de CH₄ y AGVs, a las 48 y 60 horas pos-fermentación ruminal *in vitro*.

Tratamiento				
Parámetro (48 horas)	T1	T2	T3	Valor P=
CH ₄ (ml)	6,02	5,24	4,97	0,5712
CH ₄ %	7,29	8,15	6,08	0,5476
AGV Total (mmol/L)	42,96 c	49,55 a	46,62 b	0,0004
Acético (%)	63,47 a	58,82 a	59,74 a	0,0219
Propiónico (%)	28,67 c	30,74 a	30,63 b	0,0001
Butírico (%)	7,21 c	9,04 a	8,43 b	0,0003
Isovalérico (%)	0,15 c	0,30 a	0,25 b	0,0001
Valérico (%)	0,50 b	1,10 a	0,95 a	0,0005
Acético/Propiónico	2,237 a	1,920 b	1,965 b	0,0001
Tratamiento				
Parámetro (60 horas)	T1	T2	T3	Valor P=
CH ₄ (ml)	4,23	5,86	6,49	0,1640
CH ₄ %	6,16	8,51	9,22	0,9800
AGV Total (mmol/L)	58,54 b	65,24 a	64,25 a	0,0001
Acético (%)	63,55 a	59,06 b	59,35 b	0,0025
Propiónico (%)	28,32 c	30,54 a	29,85 b	0,0001
Butírico (%)	7,45 b	8,91 a	8,25 b	0,0001
Isovalérico (%)	0,19 c	0,30 a	0,28 b	0,0001
Valérico (%)	0,50 c	1,19 b	2,27 a	0,0001
Acético/Propiónico	2,262 a	1,942 b	2,002 b	0,0001

a-c Medias con letras diferentes en el subíndice dentro de cada columna difieren significativamente ($P < 0,05$) T1= Pasto angleton 50% + colosuana 50%; T2= Pasto angleton y colosuana 60% + silo de maíz 30% + Fríjol mungo 10%; T3= Pasto angleton y colosuana 70% + silo de maíz 10% + Concentrado 20%

Dentro de los AGVs, se destaca el ácido Acético, el cual a las 60 horas de fermentación *in vitro*, presenta una mayor producción en el tratamiento 1, lo cual es explicado por la composición de la dieta, la cual es altamente fibrosa (tabla 1) (50% Angleton + 50% Colosuana).

Además, la relación Acético/Propiónico del tratamiento 1, presenta diferencia significativa respecto a los tratamientos, lo que corresponde con sus valores de AGVs y componentes nutricionales.

6.2.1. Parámetros de la cinética de fermentación ruminal *in vitro*: En los parámetros de cinética de fermentación ruminal *in vitro*, evaluados para los tratamientos, no hubo diferencias ($P > 0,05$) en la producción de gas (ml/400 mg MS).

Tabla 5. Parámetros de la cinética de fermentación ruminal *in vitro* de los tres tratamientos evaluados en el experimento.

Variable	T1	T2	T3	Valor P=
A (ml gas/400mg MS)	97,38	99,26	96,96	0,2896
c (h^{-1})	0,025	0,026	0,026	0,7553
Lag (horas)	1,03	0,52	1,24	0,4118
RMF (ml gas/hora)	1,73	1,84	1,72	0,5324

A= Volumen de producción asintótica de gas (ml);

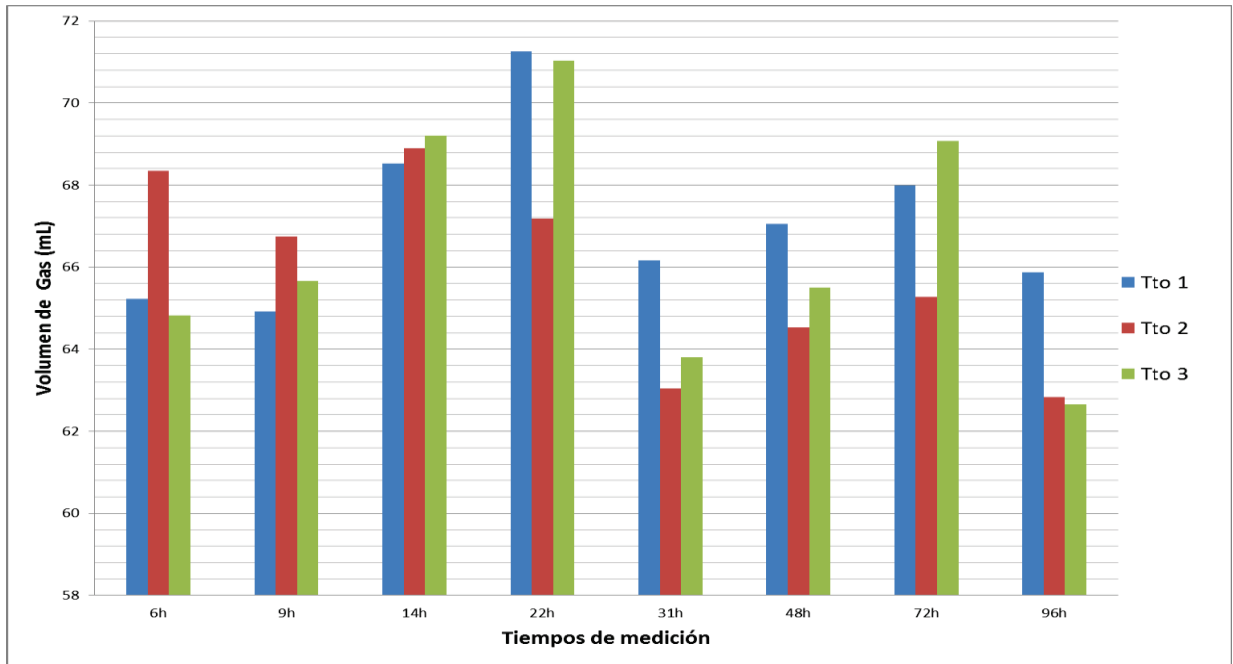
c (h^{-1})= Ritmo o tasa fraccional o tasa de producción de gas,

Lag (h)= Tiempo de retraso en el inicio de la producción de gas o periodo que se demoran en colonizar los microorganismo ruminales el substrato.

RMF (ml gas /h)= Ritmo promedio de producción de gas.

Aunque, el tratamiento 2, tuvo un valor más alto en el ritmo promedio de producción de gas (RMF), no hubo diferencias, al igual que en el tiempo de retraso de la producción de gas (Lag (h)).

Gráfico 1. Cinética de producción de gas (ml), en los diferentes tiempos de fermentación ruminal *in vitro*, correspondiente a los tratamientos.



Durante la prueba de la cinética de fermentación ruminal, los tratamientos 1 y 3, produjeron mayor cantidad de gas (ml). En contraste, el tratamiento 2, inicia con una mayor producción de gas (ml), pero así mismo comienza a disminuir, a partir de las 22 horas de fermentación *in vitro*, lo cual puede estar relacionado con el contenido de frijol mungo *Vigna radiata* para este tratamiento, lo que influyó en que su contenido de fibra fuese menor, afectando directamente la producción de gas (ml), logrando valores altos especialmente en los tiempos de medición iniciales.

7. DISCUSIÓN

7.1. EXTENSIÓN DE FERMENTACIÓN RUMINAL

En la tabla 3 se resumen los resultados de análisis estadístico obtenidos de la fermentación ruminal *in vitro*, a las 48 y 60 horas post fermentación.

Se encontró, que el porcentaje de degradabilidad fue similar en los tratamientos 2 y 3, pero difieren ($p < 0,05$) con respecto al otro tratamiento, presentándose una disminución de la degradabilidad de la MS en el tratamiento 1. Van Soest et al. (1991), sugiere que las gramíneas de avanzada madurez contienen alto contenido de fibra, tal como se presenta en la tabla 1. Pues, las plantas tropicales tienen una mayor tasa de lignificación, lo que también disminuye su digestibilidad (Van Soest et al., 1991). En esta investigación, el pasto Angleton *Dichantium aristatum* y el Colosuana *Botriochloa pertusa*, evidenciaron baja degradabilidad a causa de su compleja composición de la pared celular.

Montoya et al. (2003), evaluaron la digestibilidad de la materia seca del pasto Angleton a los 24 días de rebrote, obteniendo valores de 73,6% y 61,3% respectivamente para las épocas de lluvias y seca. En ese mismo sentido, Piñeros et al. (2011), encontraron para el pasto Colosuana, digestibilidad *in vitro* de la materia seca, valores de 60% - 70% en hojas inmaduras. Entretanto, Lascano y Argel (2011) reportaron 45% - 50% en hojas maduras del mismo pasto. La digestibilidad del tratamiento 1 (50% angleton + 50% Colosuana), a las 48 horas de fermentación ruminal *in vitro*, es de 53,25%, valor menor al obtenido en los otros tratamientos evaluados, siendo así mismo valores que se relacionan directamente a su alto contenido de fibra a causa de la edad. Puesto que, a mayor edad de rebrote de un pasto, mayor será el contenido de pared celular; por ende, este tendrá un menor porcentaje de degradación (Van Soest et al., 1991).

Así mismo, los tratamientos que contienen maíz, como el ensilaje y concentrado, y el tratamiento con inclusión de leguminosa, evidencian un mayor porcentaje de degradabilidad respecto al tratamiento 1, ya que poseen una baja proporción de pastos altamente fibrosos.

La cantidad de gas emitido a través del tiempo de fermentación, indican que a medida que transcurre el tiempo, aumenta la degradación de las dietas, y concomitantemente se incrementa la producción de gas (ml). De esta manera, se estima que a mayor degradación de la materia seca, así mismo será la cantidad de gas producido (Vargas et al., 2012), por lo cual, a las 60 horas post-fermentación, los valores de producción de gas (ml), fueron altos con referencia a los estimados luego de 48 horas post-incubación para todos los tratamientos. Observando, que el tratamiento 2, con inclusión de esta leguminosa, produjo mayor cantidad de gas (ml), durante tiempos de fermentación de 48 y 60 horas, sin demostrarse diferencias significativas frente a los otros tratamientos.

Pérez (2011), afirma que el frijol mungo *Vigna radiata* posee factores antinutricionales como taninos, fitatos, e inhibidores de anti-tripsina, lo cual puede afectar la digestibilidad de la dieta, y con ello la emisión de gases. Además, Andrade et al. (2013), afirman que los taninos, cumplen la función de inhibir el crecimiento bacteriano y por ende, la fermentación del alimento. Además, tienen la cualidad de adherirse a proteínas, las cuales al pasar al duodeno, son absorbidas y aprovechadas por el rumiante. Así mismo, Vargas et al. (2012), sugieren que al incluir de un 2 a 4% de taninos condensados en la dieta, se disminuye entre un 20 a un 60% las emisiones de CH₄. Por tanto, es necesario conocer qué tipo de metabolitos secundarios contiene la leguminosa que se quiere utilizar, y la concentración de estos en la misma.

Tiemann et al. (2008), evaluaron una dieta con inclusión de leguminosa baja en taninos *Arachis pintoi*, en proporciones crecientes (33, 66 y 100%), en la que encontraron una relación lineal creciente entre la inclusión de leguminosa y la producción de gas por unidad de FDN fermentada.

Respecto a la emisión de gas (ml), los tratamientos 1 y 3, emitieron un menor volumen a las 48 y 60 horas post fermentación *in vitro*, aunque no evidenciaron diferencias ($p>0,05$) entre tratamientos. Lo cual pudo estar influenciado por su elevado aporte de fibra, afectando negativamente la degradación del sustrato.

Otro factor importante cuando se relaciona la producción de gas con el metabolismo ruminal, es el efecto del pH. Van Kessel y Russell (1996), señalan que la tasa de producción de CH_4 , es dependiente del pH. Estos autores observaron que la producción de CH_4 disminuye drásticamente a pH menores a 6,5 e implícitamente no se produce a pH menores a 6,0. Esto indica, que los valores de pH ruminal obtenidos en las dietas puestas a prueba, se hallan dentro de los valores esperados, ya que se obtuvo el promedio de pH en 6,47, sin observarse diferencia significativa entre tratamientos y tiempos de medición durante la fermentación ($p>0,05$). Así mismo, no hubo disminución en las emisiones de CH_4 , correspondientes con el criterio de Van Kessel y Russell (1996).

El porcentaje de amonio producido en el rumen, está relacionado con la cantidad de proteína del alimento ingerido, lo cual tiene relación con el porcentaje de amonio obtenido para la presente investigación, puesto que el tratamiento 2 al poseer 10% de frijol mungo *vigna radiata*, obtuvo un porcentaje de proteína equivalente al 7,8%, siendo este valor, mayor en relación a los otros tratamientos, lo cual está directamente relacionado a la cantidad de amonio producida (Brandan & Aispuru, 2005). Esta característica se considera importante, ya que infiere en la emisión de CH_4 , puesto que es de esperarse que una alta concentración de proteína cruda disminuya las emisiones de CH_4 (Vargas et al., 2012).

Los resultados indican que la degradación de los contenidos de pared celular (DFDN) y de la fibra en detergente ácido (DFDA) no tuvieron diferencias ($p>0,05$), a pesar de la variación en la composición de las dietas, y al relacionar esta característica con la emisión de gas, no hubo diferencias entre tratamientos, respecto a la emisión de gas (ml).

7.2. DETERMINACIÓN DE AGVs Y CH₄

El metabolismo del rumiante está enfocado a aprovechar los productos de la fermentación microbiana como los AGVs. Sin embargo, no todos los productos de la fermentación microbiana son útiles para el rumiante, ya que también hay productos inútiles como el CH₄ o incluso nocivos como el amoníaco y los nitratos (Owens et al., 1998).

La producción de gas CH₄, fruto de la fermentación, en la extensión de la fermentación ruminal tras 48 y 60 horas de incubación ruminal, no mostró diferencias ($p > 0,05$) entre los tratamientos.

Como se ha referenciado, la producción de gas CH₄ de origen ruminal, está afectada principalmente por la calidad del alimento ingerido (Carmona et al., 2005). Por ende, investigadores han hecho estudios *in vitro*, evaluando la inclusión de leguminosas tropicales con baja condensación de taninos, lo cual para algunos ha resultado en aumento de las emisiones de CH₄ por unidad de materia orgánica fermentada, asociado a una mayor degradabilidad de nutrientes (Vargas et al., 2012). Estas características se relacionan con la leguminosa llevada a prueba en el presente experimento, ya que según Pérez (2011), este frijol dentro de sus metabolitos secundarios posee taninos, razón por la cual se estima una posible mitigación de CH₄ (Andrade et al., 2013).

De esta manera, se esperaba menor CH₄ en los tratamientos con suplementación, sin embargo se sugiere que eso no ocurrió debido a que el principal componente de las dietas, son pastos fibrosos (el T1= 100%, T2= 60% T3= 70%), lo cual disminuye la degradabilidad, favoreciendo la emisión de gas, sin diferencias entre tratamientos.

Las bacterias que realizan este proceso, se encargan de metabolizar los carbohidratos, convirtiéndolos principalmente en ácidos grasos volátiles, transcurso mediante el cual se liberan H⁺, los cuales al reaccionar con el CO₂ forman CH₄. Así mismo, se demostró

que no hubo diferencias ($p > 0,05$) en la degradación de FDN y FDA, destacando igualmente, que la emisión de CH_4 tampoco tuvo diferencias entre los tratamientos.

En concordancia con lo anterior, algunos análisis (Vargas et al., 2012) han mostrado aumentos en las emisiones de CH_4 por unidad de MS consumida al incluir una leguminosa en la dieta, debido a un mayor consumo voluntario, aumento en digestibilidad de la dieta y modificación de los patrones de fermentación asociados a la inclusión de la leguminosa.

Hunter (2007) comparó la producción de CH_4 en novillos Brahman que recibieron una dieta de gramíneas tropicales como *Dichanthium aristatum* y *Chloris gayana*, frente a aquellos que consumieron alfalfa *Medicago sativa*, y reportaron emisiones de CH_4 por unidad de ganancia de peso, 4 veces más altas en animales alimentados con gramíneas comparado con los de leguminosa.

Así mismo, Vargas et al. (2012), reportaron un aumento en las emisiones de CH_4 por unidad de MS consumida, asociadas a la inclusión de ensilaje de trébol o alfalfa en una dieta de Ryegrass perenne *Lolium perenne*. Sin embargo estos investigadores, referencian otros trabajos, demostrando al igual que en esta investigación, no hubo diferencias entre gramíneas y leguminosas respecto a las emisiones de CH_4 . Además, estos autores sugieren, que las leguminosas tanificadas reducen entre 12 a 60% las emisiones de CH_4 , pero al frijol utilizado en este estudio, no se estimó el contenido ni tipo de taninos. Pero, es claro que al incluir leguminosas en la dieta del rumiante, no todas las respuestas van a ser favorables respecto a la mitigación de gas CH_4 .

Otros autores, han sugerido que la respuesta puede depender de las especies asociadas (Vargas et al., 2012), por lo que resulta necesario conocer la composición de las dietas a utilizar para los diferentes sistemas de producción, y además, someterlas a análisis para estimar la emisión de gas CH_4 .

Por otra parte, se aprecia que la producción de ácidos grasos volátiles, fue mayor ($p < 0,05$) para el tratamiento 2, a las 48 y 60 horas post-fermentación ruminal *in vitro*, lo

cual sugiere que al existir una mayor degradabilidad de este (tabla 2), hubo directamente proporcional un aumento en la producción de ácidos grasos volátiles (Vargas et al., 2012).

En la literatura, se reporta que ocurre una menor proporción de acetato y mayor de propionato al incrementar el nivel de insaturación de los AG C-18, al disminuir las poblaciones de metanogénicos y protozoarios (Bonilla et al., 2012). Al estimar la relación acético/propiónico, es evidente que el tratamiento 1 difiere significativamente respecto a los otros tratamientos, logrando valores mayores, con lo cual se esperaría una mayor formación de CH₄, respecto al cual, no hubo diferencias entre los tratamientos.

Así mismo, la elevada concentración de ácido acético en el tratamiento 1, mostró estadísticamente diferencias frente a los otros tratamientos. Lo cual se sugiere, sucedió a causa de que este tratamiento está constituido completamente de pastos, los cuales poseen un alto contenido de fibra, debido a su envejecimiento y sistema de protección característico de pasturas tropicales (Zavaleta, s.f.), y por ende, la microflora ruminal más abundante es la acetogénica, por lo cual aumentan las emisiones de este AGV, el cual durante su formación elimina H⁺ utilizados para la formación de CH₄.

La implementación de sistemas estratégicos de suplementación, como la presencia de otros estratos vegetales en el área de pastoreo (sistemas silvopastoriles), pueden mejorar las características de la fermentación ruminal, reflejándose en mayor productividad y generalmente en una disminución en las emisiones de CH₄ (Vargas et al., 2012). Siendo la inclusión de plantas leguminosas, una de las principales características de los sistemas silvopastoriles.

7.3. PARÁMETROS DE LA CINÉTICA DE FERMENTACIÓN RUMINAL *In Vitro*

Al evaluar la cinética de producción de gases, al igual que los resultados obtenidos mediante la técnica de gases, el efecto de la inclusión de leguminosas sobre la

producción de gas CH₄, no tuvo diferencias ($p > 0,05$) respecto a los otros tratamientos, teniendo en cuenta que algunos autores consideran variable el efecto de las leguminosas, lo cual además está influenciado por la presencia de metabolitos secundarios como los taninos (Vargas et al., 2012). Siendo así, se observó que el frijol mungo *Vigna radiata*, no logró minimizar la emisión de gas CH₄, a pesar de poseer taninos, con los cuales se pretende lograr inhibición del crecimiento bacteriano con el fin de favorecer la disminución en las tasas de producción de CH₄ (Andrade et al., 2013).

Las condiciones ambientales en las que se desarrolla el proceso de degradación de alimento, tanto las características físicas y químicas del medio como las interacciones entre distintos microorganismos, determinan el grado y ritmo de la degradación del forraje (Angeles, 2003). Se observó que en los tres tratamientos hubo un comportamiento similar, por lo que no se aprecian diferencias significativas en el ritmo de producción de gas c (h^{-1}), en el tiempo de retraso para el inicio de la fermentación de gas Lag (h), ni para el ritmo promedio de producción de gas RMF (ml gas/h).

Así mismo, el tiempo de retraso en el inicio de la producción de gas, Lag (h), no difirió ($p > 0,05$) para ninguno de los tratamientos, indicando que el periodo en el cual los microorganismos ruminales iniciaron su colonización, fue similar para los tratamientos evaluados, lo cual pudo deberse a que las dietas fueron evaluadas *in vitro*, por lo que fue necesario llevarlas a un tamaño de partícula muy pequeño (2 mm), para todos los sustratos puestos a prueba.

El ritmo promedio de producción de gas (RMF), muestra que el tratamiento 2, produjo gas más rápidamente en comparación a los otros tratamientos, sin mostrar diferencias ($P > 0,05$) entre sí. Luego de su producción máxima de gas (ml) a las 14 horas de fermentación, muestra un evidente descenso (gráfico 1) a diferencia de los demás tratamientos, los cuales continuaron produciendo una alta cantidad de gas hasta el último tiempo de medición realizado. El comportamiento de producción de gas (vol) del tratamiento 2, puede deberse a la facilidad que se proporciona a los microorganismos

ruminales, mediante la inclusión de leguminosa y una menor proporción de pastos fibrosos, lo cual permite a la microflora ruminal adherirse fácilmente al sustrato, e iniciar el proceso de degradación del mismo. De esta manera, al inicio del proceso fermentativo, el tratamiento 2 produjo una mayor cantidad de gas (ml) obteniendo una máxima producción a las 14 horas de fermentación, luego de lo cual, comienza a descender llegando al último registro de medición (96 horas) con una baja producción de gas (ml) al igual que el tratamiento 3, el cual contenía concentrado comercial pero así mismo, un 70% de pastos fibrosos.

El tratamiento 3 (70% pastos fibrosos), al igual que el tratamiento 1 (100% pastos fibrosos), tuvo dificultad al inicio de la degradación debido a la complejidad de la pared celular, lo que dificultó la acción bacteriana al inicio de la fermentación. Pero a las 22 horas de fermentación los tratamientos 1 y 3, los microorganismos produjeron una elevada cantidad de gas (ml), que luego comenzó a descender manteniéndose siempre más elevada frente al tratamiento 2.

8. CONCLUSIONES

- ☑ Los resultados de la composición nutricional de los sustratos y dietas, evidencian que el tratamiento 1, tuvo una menor degradabilidad a causa de su alto contenido de fibra, aportado especialmente por el pasto angleton *Dichanthium aristatum*. En contraste, Se observó que el tratamiento 2, aporta el valor más alto de proteína y así mismo materia orgánica, como efecto de la inclusión de leguminosa, lo cual afecta positivamente la degradabilidad del mismo. Además, se evidenció que el tratamiento 3, obtuvo una mayor concentración de grasa gracias a que contenía concentrado comercial.

- ☑ A medida que transcurrió el tiempo de fermentación, se incrementó la producción de gas (ml), concomitante al aumento en la degradación de la materia seca. Aunque, el tratamiento 1 fue menos degradable debido a su alto contenido de fibra. El tratamiento 2, produjo mayor proporción de amonio respecto a los otros tratamientos, porque contenía un destacado aporte de proteína, proporcionado especialmente por la leguminosa incluida en esta dieta. Además, El pH se halla dentro de los valores normales para los tres tratamientos, al igual que la degradación de la fibra, sin evidenciar diferencias entre los tratamientos y tiempos de medición.

- ☑ Al estimar los parámetros que relacionan ácido acético/propiónico, es evidente que el tratamiento 1, difiere significativamente respecto a los otros tratamientos, pero sin diferir ($p > 0,05$) con los otros tratamientos respecto a la producción de CH₄. Así mismo, El tiempo de retraso en el inicio de la producción de gas, fue similar entre los tratamientos, debido a que fue necesario llevarlas a un tamaño de partícula de 2mm aumentando la superficie de ataque de microorganismos ruminales.

9. RECOMENDACIONES

- o Se sugiere realizar estudios encaminados a profundizar en la caracterización de los sustratos, especialmente la concentración de metabolitos secundarios.
- o Usar la inclusión de frijol mungo *Vigna radiata* en porcentajes crecientes.

10. REFERENCIAS

- Aguilera B. A., (1988). Evaluación del efecto de la suplementación de rastrojo amoniatizado sobre la cinética ruminal y digestibilidad en borregos pelibuey. Tesis de maestría [online]. UNAM. México.
- Andrade R.E., Castelán O.A., Martínez C.A., Estrada J. (2013). Reducción de las emisiones de metano en la fermentación ruminal *in vitro*, utilizando planta taníferas. Recuperado de: <http://www.engormix.com/MA-ganaderia-carne/manejo/articulos/amena-reduccion-emisiones-metano-t4755/124-p0.htm>.
- Angeles S. (2003). Fermentación Ruminal, tamaño de partícula y efecto de la fibra en la alimentación de vacas lecheras. Departamento de nutrición Animal y Bioquímica. [versión pdf]. Recuperado de: http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/departamentos/rumiantes/bovinotecnia/BtRq_ZooG014.pdf.
- Arcos J.L., Castrejon F.A., Mendoza G.D., Perez G.E.P. (2000). Effect of two commercial yeast cultures with *saccharomyces cerevisiae* on ruminal fermentation and digestion in sheep fed sugar cane tops. *Livestock production science*, Holanda. 63: 153-157.
- Berra G. y Finster L. (2002). Emisión de gases de efecto invernadero; influencia de la ganadería argentina. Cadena de la carne vacuna, Tecnologías Para Nuevos Escenarios. Instituto De Patobiología, INTA Cautelar. Proyecto metas de emisión. *Idia* 21(2):212-215.
- Bonilla J. A., Lemus F. Clemente, (2012). Emisión de metano entérico por rumiantes y su contribución al calentamiento global y al cambio climático. Revisión. *Rev Mex Cienc Pecu.* 18 (1) :49 – 63.
- Brandan, N. y Aispuru G. (2005). Metabolismo de compuestos nitrogenados. Universidad Nacional del Nordeste. Cátedra de Bioquímica. [versión pdf]. Recuperado de: <http://med.unne.edu.ar/catedras/bioquimica/pdf/nitro.pdf>
- Bretsche D. (2005). Agricultura orgánica y gases con efecto invernadero. San José, Costa Rica. Ed. CEDECO.
- Cairó y París, (1988). Etapa metanogénica. Recuperado de: <Http://Web.Udl.Es/Usuaris/R5213847/Metanog.Html>.
- Canet C. R., (2010). Mitigación y adaptación al cambio climático en la agricultura y la ganadería. CDAS-IVIA. Valencia - España.

- Carmona J., Bolívar D., Giraldo L.A. (2005). El gas metano en la producción ganadera y alternativas para medir sus emisiones y aminorar su impacto a nivel ambiental y productivo. Rev Col Cienc Pec Vol. 18 (1):49 – 63.
- Decreto N° 086, 2008. Por medio del cual se anula el decreto n° 154 de junio 6 de 2008, se asigna un nuevo decreto y se adopta el plan de desarrollo “gestión social y trabajo comunitario. Junio 23. [versión pdf] [online].
- Díaz F. Verónica (2007). ¿Esta vaca contamina más? Revista día siete. [online] México. 383: 22 – 27.
- Duque E. G. (2006). Nam is, garnsworthy pc. Biohydrogenation of linoleic acid by rumen fungi compared with rumen bacteria. J Appl Microbiol; 103:551-556.
- Estrada P. Manuel (2001). Cambio climático global: causas y consecuencias. Unep-Grid Arendal. Revista de información y análisis. Núm 16: 7-17.
- FAO, (2009). La larga sombra del ganado. Problemas ambientales y opciones. El papel del ganado en el cambio climático y en la contaminación atmosférica. Parte 4. Cap. 3: 86 – 139.
- Fernández M. Alex. (2007). Metano, vacas y cambio climático. Diversos estudios otorgan al metano, causado entre otros por el ganado, un mayor protagonismo en el cambio climático. Página web. Recuperado de: [Http://www.Consumer.Es/Web/Es/Medio Ambiente/Energia Y Ciencia/2007/07/30/165488.Php](http://www.Consumer.Es/Web/Es/Medio Ambiente/Energia Y Ciencia/2007/07/30/165488.Php).
- Fondevila M. y Barrios A. (2001). La técnica de producción de gas y su aplicación al estudio del valor nutritivo de los forrajes Revista Cubana de Ciencia Agrícola. Dpto. de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Universidad de Zaragoza. Maracaibo. Venezuela. Tomo 35, No. 3: 197-206.
- Giraldo, L. A., L. A. Gutiérrez, C. Rúa. (2007). Comparación de dos técnicas *in vitro* e *in situ* para estimar la digestibilidad verdadera en varios forrajes tropicales. Rev Col Cienc Pec. 20(3): 269-279.
- Goering, H. K., P. J. Van Soest (1970). Forage fiber analyses. Manual de agricultura. 379. U.S. Government Printing Office, Washington Dc, USA.
- Hunter, R.A. (2007). Methane production by cattle in the tropics. British Journal of Nutrition. Vol 98. Núm 03: 657.
- Johnson K. A. y Johnson D.E. (1995). Methane Emissions From Cattle. J Anim Sci.; 73: 2483-2492.

- Kamande G. M. (2006). DIGESTIÓN RUMINAL Y NUTRICIÓN. Congreso De Forrajes. Producir XXI, Bs. As., 15(180):52-57.
- Keuren, R.N. y Heinemann, W. (1962). Study of a nylon bag technique for in vivo estimation of forage digestibility. J. Anim. Sci., 21:340.
- Kurihara M., Magner T., Mccrabb H., y Mccrabb G. (1999). Methaneproduction and energy partition of cattle in the tropics. British Journal Of Nutrition, 81: 227-234.
- Lascano E. y Argel J., (2011). Descripción y atributos de especies y cultivares de Bothriochloa. Seminario Taller sobre *B. pertusa*. Comité de Ganaderos de Ibagué. Referenciado por: Piñeros R., Tobar V., y Mora J. 2011. Evaluación agronómica y zootécnica del pasto colosuana (*bothriochloa pertusa*) en el trópico seco del tolima. UT. Ibagué -Tolima.
- Leguizamon J., y Carreño D. (2013). Defaunacion ruminal un mecanismo favorable en la eficiencia nutricional de bovinos. Monografía. [online].
- López I., Aranda E.M., Elías A., Sánchez D.H., Osorio M.M., Ramos J.A. y Vargas L. (2007). Caracterización de la fermentación cecal en ovinos alimentados con caña de azúcar. Instituto de Ciencia Animal. Rev. Cubana de Ciencia Agrícola, vol. 41, núm. 4: 333-338.
- Madigan, (1998). Etapa metanogénica. Pág. web. Recuperado de: <Http://Web.Udl.Es/Usuaris/R5213847/Metanog.Html>.
- Martínez M., Dihigo L.E., Hernández Y., Herrera F. y Sarduy L. (2011). Digestibilidad in vitro de nutrientes de dietas que contienen harina de forraje de *Mucuna deeringiana* mediante el método del inóculo fecal del cerdo. Instituto de Ciencia Animal. Revista Computadorizada de Producción Porcina Vol. 18 (4). 297-300.
- Masson L. (2007). Métodos analíticos para la determinación de humedad, alcohol, energía, materia grasa y colesterol en alimentos. Depósito de documentos de la FAO. Capitulo 14. Recuperado de: <http://www.fao.org/docrep/010/ah833s/ah833s16.htm>.
- Montenegro J, y Abarca S. (2000). Fijación de carbono, emisión de metano y de óxido nitroso en sistemas de producción bovina en costa rica. Intensificación de la ganadería en centroamérica: beneficios económicos y ambientales. Depósito de documentos de la FAO [online].
- Montoya J., Torregroza L., Palomino M., González M., Cuadrado H., Reza S., y Gómez U., (2003). Análisis técnico y económico de un modelo de producción de carne en el valle del sinú. Universidad De Córdoba, Departamento De Zootecnia. Corpoica, Colombia. Córdoba. 8:(1): 265-272.

- Moss A.R., y Givens D. I. (2002). The effect of supplementing grass silage with soya bean meal on digestibility, in sacco degradability, rumen fermentation and methane production in sheep. *Animal Feed Science And Technology*. 97: 127-143.
- Naciones Unidas, (1998). Protocolo de Kyoto de la convención marco de las Naciones Unidas sobre el cambio climático. [online] GE.05-61712.
- Olvera D.R., García F., López E., Gutierrez A. Y Martínez E., (2007). Factibility of treat winery wastewater through anaerobic biodigestion with a from cow's waste. *Rev. Tec. Ing. Universidad Zulia. Hidalgo – Mexico*. Vol 30, N°2:128 – 135.
- Owens, F. N., Secrist D. S., Hill W. J., Y Gill D. R. (1998). Acidosis in cattle: A *Rev. J. Anim. Sci.* 76:275-286.
- Palladino A. Wawrzkievicz M. y Bargo F. (2006). La fibra. Departamento De Producción Animal, Facultad De Agronomía, Uba. Bs. As., 202:82-84.
- Pérez R. M. (2011). Evaluación de la composición nutricional y digestibilidad aparente e ileal en porcinos del frijol mungo (*vigna radiata o phaseolus aureus*) con y sin tratamiento térmico. Tesis pregrado. Universidad del Tolima. Ibagué – Tolima.
- Piñeros R., Tobar V., y Mora J. (2011). Evaluación agronómica y zootécnica del pasto Colosuana (*bothriochloa pertusa*) en el trópico seco del tolima. Grupo De Investigación Sistemas Agroforestales Pecuarios. Universidad Del Tolima. *Rev. Col. C. Anim.* Vol. 4, No. 1: 36-40.
- Relling, A. E. y Mattioli, G. A., (2008). Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes. Corresponde a una actualización de los autores del libro "fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes" De Editorial EDULP (Ediciones 2002 Y 2003) Fac. Cs. Veterinarias – UNLP.
- Rios J., Gallego A., Vélez L., Otalvaro J., Toro L., Lema A. y Acevedo L. (2004). Caracterización y evaluación de agrosistemas a escala predial. Un estudio de caso: centro agropecuario Paysandú (Medellín – Colombia). *Rev Fac. Nal. Agr. Medellín*. Vol. 57. N°2.
- Semarnat, 2009. Cambio climático. Ciencia, evidencia y acciones serie. México. [online] ISBN 978-968-817-925-3.
- Theodorou, M. K., B. A. Williams, M. Dhanoa, A. Mcallan, J. France. (1994). A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science And Technology* 48: 185-197.

- Tiemann T., Lascano E., Wettstein R., Mayer C., Kreuzer M. y Hess D. (2008). Effect of the tropical tannin-rich shrub legumes calliandra calothyrsus and flemingia macrophylla on methane emission and nitrogen and energy balance in growing labs. *The Animal Consortium*. 2(5): 790–799.
- Tilley, J.A. y Terry, R.A. (1963). A two stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *J. Br. Grassl. Soc.*, 18:104.
- UPRM [S.N.], (2007). Fermentaciones y metanogenesis. Recinto universitario de Mayagüez. UPRM. Biology. Puerto Rico. [versión pdf]. Recuperado de: <Http://Www.Uprm.Edu/Biology/Profs/Massol/Manual/P4-Metanogenesis.Pdf>.
- Van Kessel J. y Russell J. (1996). The effect of ph on ruminal methanogenesis. *Fems Microbiology Ecology*, 20:205-210
- Van Soest, J., Robertson J. y Lewis, B.A., (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74-3583-3597.
- Van Soest, P.J. (1994). *Nutritional ecology of the ruminant*. 2ª Edition. Cornell University Press. USA. Pp. 253-316.
- Vargas, E. Cárdenas, M. Pabón y J. Carulla, (2012). Emisión de metano entérico en rumiantes en pastoreo. Grup.Invest. Nutrición Animal. Dpto Producción Animal. Facultad De MVZ. [Versión pdf]. Universidad Nacional De Colombia. Bogotá.
- Watson R., Zinyowera M., Moss R. y Dokken D. (1997). Impactos regionales del cambio climático: evaluación de la vulnerabilidad. Informe especial del IPCC. Grupo Intergubernamental De Expertos Sobre El Cambio Climático. [Versión pdf]. ISBN: 92-9169-310-3. Recuperado de: <http://www.ipcc.ch/pdf/special-reports/spm/region-sp.pdf>.
- Zavaleta L., s.f. Los ácidos grasos volátiles, fuente de energía en los rumiantes. Departamento de nutrición y bioquímica. UNAM. Ciencia veterinaria. [Versión pdf]. 223-240.