

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

POTENCIAL METANOGÉNICO DE *Lolium perenne* y *Dactylis glomerata*  
Y SUS COMBINACIONES CON NIVELES CRECIENTES DE GRANOS DE  
CEBADA O SORGO CON DIFERENTE CONTENIDO DE TANINOS

por

Libia Carolina BARRIOS TABELLA  
Tatiana Gisel NÚÑEZ BARRIOS

TESIS presentada como uno de  
los requisitos para obtener el título  
de Ingeniero Agrónomo

MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2017

Tesis aprobada por:

Director: -----  
Ing. Agr. (MSc.) María del Jesús Marichal

-----  
Ing. Agr. (PhD.) Laura Astigarraga

-----  
DVM. Alejandro Britos

Fecha: 14 de julio de 2017

Autores: -----  
Libia Carolina Barrios Tabeira

-----  
Tatiana Gisel Núñez Barrios

## AGRADECIMIENTOS

A Mariquita por su apoyo durante todo el trabajo

Alejandra Borges, por su apoyo en el análisis estadístico.

A las diferentes instituciones que nos brindaron apoyo para llevar a cabo el trabajo: SUL y FAGRO

A Gabi, Ana y Shirley por estar a nuestro lado durante todo el trabajo referido al laboratorio.

A nuestros amigos y nuestras FAMILIAS por su apoyo incondicional.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	VI
1. <u>INTRODUCCIÓN</u> .....	1
1.1 OBJETIVOS GENERALES .....	1
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	2
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u> .....	3
2.1 <u>CARACTERÍSTICAS DE LAS PASTURAS</u> .....	3
2.1.1 <u>El dactylis (<i>Dactylis glomerata</i>)</u> .....	3
2.1.2 <u>El raigrás (<i>Lolium perenne</i>)</u> .....	3
2.2 <u>VALOR NUTRITIVO DEL DACTYLIS Y EL RAIGRÁS</u> .....	3
2.3 <u>CARACTERÍSTICAS DE LOS GRANOS DE CEREALES</u> .....	6
2.3.1 <u>Características de los granos de cebada</u> .....	7
2.3.2 <u>Características de los granos de sorgo</u> .....	8
2.3.2.1 <u>El sorgo y los taninos</u> .....	8
2.3.3 <u>Diferencias entre cebada y sorgo</u> .....	11
2.4 <u>GASES DE EFECTO INVERNADERO</u> .....	15
2.4.1 <u>Metano</u> .....	16
2.5 <u>HIPÓTESIS</u> .....	18
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u> .....	19
3.1 <u>UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO</u> .....	19
3.2 <u>TRATAMIENTOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL</u> .....	19
3.3 <u>ALIMENTOS</u> .....	20
3.3.1 <u>El raigrás y el dactylis: localización y muestreo</u> .....	20
3.3.2 <u>Suplementos energéticos</u> .....	20
3.4 <u>ANÁLISIS QUÍMICOS</u> .....	21
3.5 <u>ANIMALES</u> .....	21
3.6 <u>PRODUCCIÓN DE GAS TOTAL Y METANO</u> .....	21
3.7 <u>CINÉTICA DE DEGRADACIÓN</u> .....	23
3.8 <u>CÁLCULOS</u> .....	24
3.8.1 <u>Cinética de la producción de gas</u> .....	24
3.8.2 <u>Gramos de materia orgánica desaparecida</u> .....	24
3.9 <u>ANÁLISIS ESTADÍSTICOS</u> .....	25
4. <u>RESULTADOS</u> .....	27
4.1 <u>ALIMENTOS</u> .....	27
4.1.1 <u>Forrajes</u> .....	27
4.1.2 <u>Suplementos energéticos</u> .....	28
4.1.3 <u>Mezclas</u> .....	29

4.1.3.1 Efecto de la combinación del dactylis o raigrás con niveles crecientes de grano de cebada, sorgo alto o bajo en taninos, en la producción total de gas y en la producción de metano acumulado a las 48 hrs. de incubación.....	29
4.1.3.2 Comparación de la producción total de gas y de metano acumulado a las 48 hrs. de incubación, de dactylis o raigrás combinados con iguales niveles de grano de cebada, grano de sorgo alto en taninos y grano de sorgo bajo en taninos .....	34
5. <u>DISCUSIÓN</u> .....	37
5.1 CARACTERIZACIÓN NUTRICIONAL DE LAS PASTURAS .....	37
5.2 PRODUCCIÓN DE GAS ACUMULADO Y METANO .....	37
6. <u>CONCLUSIONES</u> .....	39
7. <u>RESUMEN</u> .....	40
8. <u>SUMMARY</u> .....	42
9. <u>BIBLIOGRAFÍA</u> .....	44

## LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Comparación de la fibra detergente neutra (FDN), fibra detergente ácida (FDA), proteína cruda (PC) y energía metabolizable (EM), para el dactylis y el raigrás perenne de distintas fuentes. ....	4
2. Degradabilidad ruminal in situ de la materia seca de sorgos altos y bajos bajos en taninos, cosechados seco.....	10
3. Producción de gas in vitro de granos de sorgo bajos y altos en taninos cosechados secos .....	11
4. Contribución relativa (%) de los componentes de los granos. ....	12
5. Digestibilidad aparente y sitio de digestión del almidón de diferentes granos.....	13
6. Composición de la solución buffer y de la solución reductora.....	22
7. Caracterización química, producción de gas y metano in vitro de las pasturas empleadas.....	28
8. Caracterización química de los granos de sorgo alto y bajo en taninos y del grano de cebada. ....	29
9. Efecto de la combinación de dactylis o raigrás con niveles crecientes de grano de cebada, sorgo alto o bajo en taninos, en la producción total de gas y en la producción de metano acumulado a las 48 hrs. de incubación... ..	32
10. Producción de gas y de metano, de dactylis o raigrás combinados con iguales niveles de grano de cebada, grano de sorgo alto en taninos y grano de sorgo bajo en taninos.....	35

Figura No.

1. Emisión de metano del sector pecuario y participación por tipo de ganado.. 16

Gráfico No.

1. Tasa de desaparición de almidón de los diferentes granos..... 15
2. Producción de gas total (mICH4/gMOD) a las 96 horas de dactylis en combinación con niveles incrementales de inclusión de los granos de sorgo alto y bajo en taninos y del grano de cebada. .... 33
3. Producción de gas total (mICH4/gMOD) a las 96 horas de raigrás en combinación con diferentes granos en niveles incrementales de inclusión..... 33

## 1. INTRODUCCIÓN

La producción agropecuaria debido a los procesos de intensificación, han desencadenado el uso de nuevas tecnologías, como es el caso de praderas sembradas y suplementos proteicos y/o energéticos en la alimentación de los rumiantes, donde el dactylis (*Dactylis glomerata*) y el raigrás (*Lolium perenne*) son especies comúnmente utilizadas para crear la base forrajera de la alimentación.

Ambas especies, son gramíneas perennes invernales de hábito cespitoso con baja persistencia productiva. El raigrás comparado con otras gramíneas invernales perennes utilizadas en el país, presenta mayor vigor inicial (Carámbula, 2002). Estas pasturas pueden ser limitantes en el aporte de energía para distintas categorías de rumiantes, por esta razón los granos de cereales son utilizados como complemento del componente fibroso de la dieta y así cubrir los requerimientos energéticos de los animales, dos granos comúnmente utilizados en la alimentación de rumiantes son el grano de cebada (*Hordeum vulgare*) y el grano de sorgo (*Sorghum spp.*), los cuales son clasificados como concentrados energéticos. Esta categoría de alimentos se caracteriza por presentar bajos niveles de fibra y proteína, alta palatabilidad, y a diferencia de los forrajes son fermentados rápidamente en el rumen.

En rumiantes los procesos de fermentación microbiana de los componentes de la pared celular que se llevan a cabo en el rumen e intestino grueso, van asociados con la producción de gases de efecto invernadero y una pérdida de energía por parte del animal. Uno de ellos es el metano y por este motivo es que se considera que los rumiantes son responsables del 25 % del total de las emisiones antropogénicas de gases (Soliva y Hess, 2007).

La inclusión de alimentos concentrados en la dieta de rumiantes probablemente reduzca la emisión de metano entérico por unidad de producto animal, particularmente cuando se incluyen alrededor de 40% de la materia seca consumida (Hristov et al., 2013).

### 1.1 OBJETIVOS GENERALES

Evaluar el potencial metanogénico de especies forrajeras y su combinación con granos de cereales, que difieren en el período de suministro de energía una vez ingresado al rumen.



## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Se medirá la producción de gas total y metano *in vitro* de:

- Dos especies forrajeras cultivadas, en su combinación con granos de sorgo y cebada en proporciones crecientes.
- Evaluar el potencial metanogénico de la combinación de las pasturas con los granos de sorgo que difieren en los contenidos de taninos.

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CARACTERÍSTICAS DE LAS PASTURAS

Las gramíneas forrajeras ocupan un lugar muy importante en las pasturas cultivadas del Uruguay, como verdeos anuales y como componente de praderas de corta o larga duración en asociación con leguminosas.

#### 2.1.1 El dactylis (*Dactylis glomerata*)

Es una gramínea perenne invernal, cespitosa con macollos achatados. Las hojas son de color verde azulado, presentan una nervadura central marcada pero no tienen aurículas. La lígula es blanca y visible. Tanto la hoja como la vaina no presentan pelos (Langer, 1981).

#### 2.1.2 El raigrás (*Lolium perenne*)

El raigrás es una especie perenne, con ciclo de producción invernal (otoño-invierno-primavera) y hábito de crecimiento cespitoso, de gran adaptación al pastoreo, debido a su facilidad de rebrote, resistencia al pisoteo y elevada agresividad (Carámbula, 2002). Es una especie de fácil establecimiento, muy macolladora y precoz (Langer, 1981). Según Betín (1975), el buen establecimiento del raigrás perenne es debido a la rapidez de la germinación y a su rápida brotación.

### 2.2 VALOR NUTRITIVO DEL DACTYLIS Y EL RAIGRÁS

El valor nutritivo es función del consumo de nutrientes, su digestión y la eficiencia de conversión de los nutrientes ingeridos en producto animal. El valor nutritivo de un forraje, debe reflejar su capacidad de satisfacer los requerimientos de un animal para un objetivo de producción particular, y la mejor manera de expresarlo es a través de la producción animal obtenida o "respuesta animal".

El consumo de nutrientes absorbibles es el producto de la cantidad de forraje consumido y la concentración de nutrientes en ese forraje. La eficiencia de conversión de nutrientes en producto animal, comprende las eficiencias en los procesos digestivos y metabólicos (Hodgson, 1990). Entonces a igual disponibilidad de forraje la productividad animal por hectárea será tanto más alta cuanto mayor sea el valor nutritivo de la pastura (Dumestre y Rodríguez, 1995).

En el cuadro No.1 se muestran algunos valores de composición química de las pasturas bajo estudio, como se puede apreciar se observan algunas diferencias en los resultados obtenidos, cabe destacar que hay valores nacionales, y otros internacionales.

Cuadro No. 1. Comparación de la fibra detergente neutra (FDN), fibra detergente ácida (FDA), proteína cruda (PC) y energía metabolizable (EM), para el dactylis y el raigrás perenne de distintas fuentes.

Especie	Fuente	FDN%	FDA%	PC%	EM(Mcal/kgMS)
Dactylis	Mieres et al. (2004)	60,55	36,57	15,49	2,4
	Fulkerson et al. (2006)	59,4	32,3	22,8	2,31
	Turner et al. (2006)	58,51	22,81	21,2	2,58
Raigrás	Mieres et al. (2004)	55,32	40,09	17,11	2,28
	Fulkerson et al. (2006)	51,5	31,3	22,1	2,36
	Turner et al. (2006)	53,74	25,72	12,9	2,74

Los valores obtenidos por Mieres et al. (2004), son promedios de muestras colectadas durante 8 años, las cuales eran distintas variedades y provenían de distintas zonas geográficas del país. Estos materiales diferían en manejo de fertilización, riego y método de muestreo.

En INIA, el contenido de PC, se realizó a través del contenido de nitrógeno total del alimento. La energía metabolizable se calculó a través de la digestibilidad de la materia orgánica (DMO), utilizando las tablas del NRC (1988,1989).

En el trabajo realizado por Fulkerson et al. (2006), se utilizó raigrás perenne cultivar Bronsyn y el cultivar Kara para el dactylis, se realizó riego, cuando fue necesario, también se fertilizó de acuerdo a las necesidades del cultivo y al estado nutricional del suelo. Los cortes, se realizaron en verano, para el caso del raigrás, se realizaron cuando se encontraban 3 hojas totalmente desarrolladas, y para el dactylis 4-5 hojas totalmente desarrolladas, la altura de corte variaba de 5 a 8 cm. En este ensayo se obtuvo el nitrógeno

total mediante combustión. La obtención de FDA se hizo siguiendo a (973.18; AOAC, 1990) y la FDN a través de una adaptación de Van Soest et al. (1991). La EM se calculó a partir de la digestibilidad de la materia seca (DMS).

Turner et al. (2006), utilizaron para su experimento el mismo cultivar de dactylis que Fulkerson et al. (2006) y para raigrás el cultivar Impact. Se realizaron fertilizaciones durante el cultivo, en distintos momentos de su desarrollo. Los cortes de la pastura se hicieron por encima de los 4,5 cm teniendo en cuenta el estado fenológico de las plantas, siendo el criterio de corte 3-4 hojas totalmente desarrolladas para el raigrás y 4-5 para el caso de dactylis, cabe destacar que en este ensayo no se realizaron riegos durante el cultivo. Los valores que se reportaron en el ensayo son producto de la recolección de datos de todo un año.

Las determinaciones de FDA, FDN Y N, se realizaron mediante el método “near infra-red” (NIR), utilizando el equipo con el mismo nombre.

Los valores de energía metabolizable se calcularon a partir de los valores de digestibilidad de la materia seca (DDM) y la concentración de PC se calculó multiplicando la concentración de N por 6,25.

A modo de discusión del cuadro No.1 se pueden apreciar valores similares entre los tres autores como por ejemplo la FDN y EM, sin embargo para FDA y PC hay mayor variabilidad entre los autores.

Para el caso de la FDA, Turner et al. (2006) mostraron valores obtenidos de una colecta anual, no siendo así para los casos de Mieres et al. (2004), Fulkerson et al. (2006) los cuales presentaron valores de colectas de verano. Comparando los valores de Mieres et al. (2004), Fulkerson et al. (2006), las diferencias estarían dadas por el criterio de corte que se aplicó, siendo para Fulkerson et al. (2006) 3-4 hojas en raigrás y 4-5 en dactylis dejando un remanente de 5-8 cm, esto implica que el material cosechado sea fotosintéticamente activo en su gran mayoría, con una mayor proporción lamina/vaina. Lo que se traduce a un menor contenido de FDA de la muestra debido al menor contenido de vaina. En cambio para Mieres et al. (2004) no se conocen criterios de corte, ni remanentes por lo que se pueden atribuir las diferencias de FDA al método de muestreo.

Para el caso de la PC entre Mieres et al. (2004), Fulkerson et al. (2006), las diferencias se explican por el mismo argumento que para la FDA. Las diferencias entre especies reportadas por Turner et al. (2006), es explicada por la mayor proporción de tallos reproductivos en el raigrás durante el periodo de estudio.

## 2.3 CARACTERÍSTICAS DE LOS GRANOS DE CEREALES

La base de cualquier ración es la energía, si ésta es deficiente, las proteínas y otros nutrientes serán utilizados en forma deficiente por el animal. Los rumiantes pueden utilizar la energía de carbohidratos tales como la celulosa y hemicelulosa (componentes fibrosos del alimento), gracias a los procesos de fermentación que ocurren en el rumen. Estos animales exigen determinada cantidad de fibra en su dieta. Dependiendo del animal, nivel de producción e ingredientes utilizados en la ración, tendrán que ser incluidos concentrados energéticos para cumplir con los objetivos de producción. Los alimentos energéticos proporcionan la energía a través de su contenido de carbohidratos fácilmente digestibles, como son los azúcares y el almidón, o contenidos variables de grasa (Cozzolino, 2000).

El aporte energético de las dietas puede estar dado por la presencia de granos de cereales, los cuales se pueden agrupar por su crecimiento estacional, por un lado los cereales de invierno, trigo, cebada o avena y los cereales de verano, sorgo, maíz o soja. La fuente de energía de los granos es obtenida principalmente por la reserva de almidón que presentan, la resistencia que presente éste a los procesos de fermentación y digestión en el animal, se va a transcribir en la forma y tiempo en que el animal disponga de dicha energía. El origen y calidades de éstos determinan significativamente los resultados productivos, una cuestión importante para decidir la fuente a utilizar.

Huntington (1997) señaló que la estructura de los granos refleja su función biológica, la protección y el transporte del embrión, complementado con una fuente de energía para ayudar a la germinación y el crecimiento temprano. El pericarpio encierra el embrión o germen, así como el endospermo, que contiene la mayor parte del almidón (Huntington, 1997). El almidón se dispone en forma de gránulo dentro del endospermo, estructura anatómica que posee al menos dos capas bien diferenciadas, una periférica, compuesta de gránulos embebidos en una matriz proteica (endospermo vítreo o córneo), y otra central, con mayor concentración de almidón, sin matriz proteica (endospermo harinoso). La participación de los dos tipos de endospermo es diferente en cada grano de cereal, predominando el endospermo córneo en maíz y sorgo y harinoso en trigo y cebada. El almidón contenido en el endospermo harinoso es mucho más susceptible a la digestión así como a la acción de diferentes procesamientos, por lo tanto, su abundancia relativa es una de las principales razones del mayor valor nutritivo de algunos cereales (Huntington, 1997).

La degradabilidad ruminal y la digestión post-ruminal del almidón puede variar con el genotipo, condiciones de crecimiento, y la aplicación de métodos

físicos y químicos de procesamiento (Nocek y Tamminga, 1991). Los almidones de trigo, cebada y avena procesados con el mismo método, son más degradables que el de maíz, y la digestibilidad del almidón del sorgo es la más baja entre los cereales utilizados comúnmente (Herrera-Saldana et al., 1990).

### 2.3.1 Características de los granos de cebada

La cebada es una gramínea perteneciente a la familia Poaceae, de la tribu Triticeae, género *Hordeum*. La cebada cultivada (*Hordeum vulgare*) es el cuarto cultivo de cereales más grande producido mundialmente y el cereal mayormente utilizado en términos de consumo humano (Bhatty, 1993).

La cebada posee una cáscara que protege al pericarpio, al endospermo y al germen. Esta cáscara está formada por la lema y la pálea. Se utiliza para la alimentación humana, como materia prima para la alimentación animal, la obtención de la malta y la fabricación de cerveza y elaboración de whisky. Debajo de la glumilla se encuentran los verdaderos tegumentos del grano, el tegumento exterior denominado pericarpio, y el interior o testa, ambos tegumentos están formados por varias capas de células. La testa es semipermeable, permite que se difunda el agua, pero no deja pasar ninguna sal. Las dos partes esenciales del grano son el embrión y el endospermo. El endospermo está formado por una masa de células de pared delgadas que contienen los granos de fécula envueltos en una sustancia plasmática y adherida unas a otras por una sustancia aglutinante que es el carbohidrato.

La cebada es una excelente fuente de carbohidratos complejos, los cuales constituyen alrededor del 80% del peso del grano de cebada (Szczodrak y Pomeranz 1992, Czuchajowska et al. 1998).

En la nutrición animal, el almidón aporta una valiosa fuente de energía tanto para rumiantes como para monogástricos. Los polisacáridos de la pared vegetal pueden también ser degradados o alterados por la acción microbiana en el rumen (Alexander et al., 1993). El almidón es el mayor componente simple en el grano de cebada, representando hasta un 65% del peso seco del grano (Lia, 2001). La mayoría del almidón de la cebada como el de otros granos, contiene dos componentes principales, amilosa y amilopectina. La amilosa es el menor componente en el almidón de la mayoría de los granos de cereales y consiste en largas cadenas de  $\alpha$ -(1-4)- ligadas a residuos de D- glucosa.

La amilopectina es el principal componente del almidón y está compuesta por cadenas de  $\alpha$ -(1-4) ligadas a residuos de glucosa interconectados mediante enlaces  $\beta$ -(1-6), Alexander et al., 1996).

### 2.3.2 Características de los granos de sorgo

El sorgo es una gramínea perteneciente a la familia Poaceae, de la tribu Andropogoneae, género Sorghum (Carrasco, s.f.) El sorgo es uno de los cereales que más se produce en el mundo, ocupa el quinto lugar en volumen producido después del trigo, maíz, arroz y cebada (Morales, 1997).

Huntington (1997) describe la composición del grano de sorgo, destacando que dentro del endospermo está la capa de la aleurona, debajo de la cual está el endospermo periférico y córneo que contiene gránulos de almidón incluidos en una matriz rica en proteína. Debajo de todas estas capas se encuentra el endospermo harinoso, que tiene la mayor concentración de gránulos de almidón los cuales no están incrustados en una matriz de proteínas. El almidón que se encuentra en el endospermo harinoso, es el más susceptible a procesos químicos, físicos y enzimáticos. Los gránulos de almidón se componen principalmente de amilopectina (enlaces  $\alpha$ 1-4 y enlaces  $\beta$ 1-6) y amilosa (enlaces  $\alpha$ 1-4). También están presentes cantidades relativamente pequeñas de pectinas y azúcares, que, con el almidón, componen los carbohidratos no estructurales (Nocek y Tamminga, 1991). Rooney y Pflugfelder (1986) señalan que la digestibilidad del almidón es generalmente inversamente proporcional al contenido de amilosa.

#### 2.3.2.1 El sorgo y los taninos

Los taninos comprenden un grupo de compuestos fenólicos hidrosolubles los cuales se clasifican taninos condensados (pronto-antocianidinas), taninos hidrolizables y oxitaninos. Las evidencias sugieren que los taninos del sorgo son del tipo condensado (Butler, 1984).

Los taninos disminuyen el valor nutritivo de los alimentos, principalmente por la reducción de la disponibilidad de las proteínas y la actividad de las enzimas digestivas, como consecuencia ocurre una disminución del consumo de alimentos; en este sentido la retención de nitrógeno y la disponibilidad de aminoácidos disminuyen al reducirse la proteína digestible (Morales et al., 1998).

Curbelo et al. (2007) realizaron un ensayo donde el objetivo fue evaluar el efecto del contenido de los taninos del grano de sorgo en diferentes ensilaje, así como la interacción entre ambos, sobre la composición química, los parámetros de la cinética de degradabilidad

ruminal, degradabilidad efectiva *in situ*, la digestibilidad intestinal *in situ*, la digestibilidad *in vitro* y la fermentescibilidad *in vitro* de granos de sorgo. En el trabajo citado Curbelo et al. (2007) comprobaron que la degradabilidad de la materia seca fue más alta en los genotipos bajos en taninos comparados con los altos, lo que indica el efecto negativo de los taninos en la degradabilidad ruminal de algunos componentes de la materia seca (Hibbered et al., 1982), dichos datos se encuentran disponibles en el cuadro No. 2.

Por mucho tiempo, el efecto de los taninos sobre la degradación de la fibra fue visto como un efecto anti-nutricional secundario. Luego de varios estudios se mostró que la degradación de la fibra en el rumen fue drásticamente reducida en animales consumiendo alimentos ricos en taninos (Hervás et al., 2004).

Cabe destacar que sorgos con concentraciones mayores a 1% son considerados como altos en taninos (Hahn y Rooney, 1986).

Los mecanismos por los cuales los taninos reducen la degradación de los diferentes componentes de la dieta no están del todo claros. Las teorías más aceptadas son la disminución del sustrato (Scalbert 1991, McAllister et al. 1994, McMahan et al. 2000), inhibición enzimática (Barry y Manley 1984, Hervás et al. 2004) y acción directa sobre los microorganismos del rumen (Hervás et al., 2004).

Con respecto al primero de los mecanismos, varios autores reportaron que los taninos impiden (o interfieren) el traslado de los microorganismos del rumen a la pared celular de las plantas, y es bien conocido que el papel de ese traslado es esencial para que la degradación ocurra. Además, la formación de complejos con proteínas y carbohidratos, deja estos nutrientes inaccesibles para los microorganismos (Mangan 1988, Mueller-Harvey y McAllan 1992). Los taninos también son agentes quelantes (describe una forma particular que los iones y moléculas se unen a iones metálicos), y esto puede reducir la disponibilidad de ciertos iones metálicos necesarios para el metabolismo de los microorganismos ruminales (Scalbert, 1991).

Con respecto a la inhibición enzimática, los taninos pueden reaccionar con enzimas microbianas, inhibiendo su actividad (Makkar et al. 1988, Mueller-Harvey y McAllan 1992, McAllister et al. 1994, McSweeney et al. 2001). Hervás et al. (2004) indicaron que los taninos alteran la actividad de las bacterias proteolíticas, celulolíticas y otras enzimas, es importante anotar que los enlaces de taninos a las enzimas -ya sean bacteriales o endógenas- no necesariamente implica su inhibición. Con respecto a las enzimas fibrolíticas,



los taninos condensados inhiben de manera más fácil la actividad de las hemicelulasas que las celulasas. Esto es posiblemente debido al hecho de que estas últimas están asociadas con las paredes celulares bacterianas mientras que las hemicelulasas son extracelulares y por lo tanto más sensibles (Van Soest, 1994). Esto explicaría por qué la mayoría de los investigadores reportan una mayor reducción de la degradabilidad de la hemicelulosa en presencia de taninos (Barry y Manley 1984, Hervás et al. 2004). Sin embargo, esto puede variar dependiendo del tipo de tanino en cuestión. El grado de tolerancia es específico del microorganismo en cuestión, explicando la diferente sensibilidad de las variedades bacterianas. Esto también depende de las diferencias entre taninos condensados y los hidrolizables.

Cuadro No.2. Degradabilidad ruminal in situ de la materia seca de sorgos altos y bajos en taninos, cosechados secos.

	A	B	Kd	C
AS	9.24	84.32	0.043	6.44
BS	11.68	84.51	0.045	3.8

AS: alto taninos grano seco; BS: bajo taninos grano seco; A: fracción soluble, B: fracción potencialmente degradable no soluble; kd: tasa de degradación de la fracción potencialmente degradable; C: fracción no degradable.

Fuente: adaptado de Curbelo et al. (2007).

No hubo diferencias entre genotipos en la fracción B de los granos cosechados secos, el genotipo alto en taninos mostró una importante porción de su materia seca que estuvo disponible para su degradación en rumen (A+B). Los granos con bajo contenido en taninos fueron los que presentaron los menores valores de fracción no degradable (c).

Con respecto a la fermentabilidad de los materiales altos y bajos en taninos, los resultados obtenidos por Curbelo et al. (2007), se presentan en el cuadro No.3.

Cuadro No.3. Producción de gas *in vitro* de granos de sorgo bajos y altos en taninos cosechados secos.

	Vrf	Kdr	Vfl	Kdl	L	Vft
AS	119.7	0.134	110.4	0.033	3.493 <sup>a</sup>	230.1
BS	130	0.151	123.5	0.037	2.902 <sup>b</sup>	253.6

AS: grano de sorgo alto en taninos seco; BS: grano de sorgo bajo en taninos seco; Vrf: Volumen final de producción rápida de gas (ml/g de MS); Vfl: Volumen final de producción lenta de gas (ml/g de MS); kdr: tasa de degradación de la fracción rápidamente fermentescible (h<sup>-1</sup>); kdl: tasa de degradación de la fracción lentamente fermentescible (h<sup>-1</sup>); L: tiempo de demora en la producción de gas (h); Vft: volumen total de gas producido (ml/g de MS); ns: no significativo (P>0.05), letras diferentes en la misma columna difieren significativamente (P<0.05).

Fuente: adaptado de Curbelo et al. (2007).

El efecto del genotipo también se vio reflejado en el menor tiempo lag o de retraso al inicio de la fermentación que tuvieron los granos bajos en taninos, aunque las tasas de degradación no mostraron diferencias entre ambos genotipos. Los granos altos en taninos secos fueron los que tuvieron un mayor retraso en el comienzo de la fermentación.

Otros trabajos reportan mayor producción de gas en genotipos bajos en taninos o cuando se realizan tratamientos para inactivarlos. Cabral et al. (2005) midieron el efecto de la adición de polietilenglicol en la producción de gas de 8 cultivares de grano de sorgo con diferente contenido en taninos (0 a 0.32%). El incremento en la producción de gas posterior al agregado del agente ligante estuvo positivamente correlacionado con el contenido en taninos (R<sup>2</sup> 0.55).

Saba et al. (1972) determinaron un 50% menos de producción de gas en granos secos de un genotipo alto en taninos frente a uno bajo en taninos, aunque esta diferencia no se verificó cuando ambos genotipos fueron procesados ("steamflacked"). Estos autores midieron la producción de gas durante 3 horas, lo que puede explicar la importante diferencia encontrada. Al igual que Curbelo et al. (2007) que demostraron que las mayores diferencias entre genotipos se verificaron en el volumen de rápida producción.

### 2.3.3 Diferencias entre cebada y sorgo

Los granos están formados por el pericarpio y la semilla propiamente dicha. A su vez la semilla, está compuesta por la testa, el endospermo y el germen (cuadro No.4). La parte esencial de los granos, desde el punto de vista de la nutrición animal es el endospermo ya que en este se encuentra al

componente energético, el almidón. Existen granos vestidos o envueltos como la cebada y la avena cuyas envolturas aunque no forman parte del grano, representan entre el 13 y 25 % de sus pesos respectivamente. El pericarpio, la testa y las aleuronas representan entre el 7 y el 15%. Finalmente el germen representa entre un 2 y 12% del total del grano siendo más importante en los granos de maíz y sorgo (Santini y Elizalde, 1993)

Cuadro No. 4. Contribución relativa (%) de los componentes de los granos.

Componentes (% del total del peso del grano)	Cebada (%)	Sorgo (%)
Envolturas	13	-
Pericarpio, testa y aleurona.	8	6*
Endospermo	76	82
Germen	3	10

Fuente: Santini y Elizalde (1993).

La diferencia en la arquitectura de los granos se ve reflejada en la dinámica (digestibilidad y degradabilidad) dentro del animal, ya sea en el rumen o en el intestino delgado (cuadro No.5). Por ejemplo, la presencia de envolturas (celulosa y hemicelulosa) en cebada y avena coincide con un menor contenido de almidón y un mayor contenido de pared celular (FDN) respecto al maíz.

Theurer (1986), encontró que la digestibilidad total de almidón fue más alta en las dietas de cebada que en dietas de grano de sorgo suministradas a los animales. En el cuadro No. 5. se resumen los valores de digestibilidad de almidón y proteína de la cebada, del maíz y del sorgo. Los valores de digestibilidad aparente del almidón y de la proteína son más bajos para el grano de sorgo, seguido por el maíz y por último la cebada. La digestibilidad de la proteína y del almidón parece estar directamente relacionadas.

Cuadro No.5. Digestibilidad aparente y sitio de digestión del almidón de diferentes granos.

		Sorgo	Maíz	Cebada
Proteína	Digestión total en el tracto (% del total de proteína consumida)	55	68	72
Almidón	Digestión total en el tracto	92	96	99
	Digestión ruminal (%del total de almidón consumido)	66	73	93
	Escape ruminal (% del total del almidón que ingresa al rumen)	34	27	7
	Digestión intestinal (% del almidón que escapa del rumen)	79	82	78

Fuente: Theurer (1986).

También es interesante observar que los granos que presentan elevada degradación ruminal parecen exhibir mayor digestibilidad del almidón en general (cuadro No.5). Así, cuanto menor es el escape ruminal, mayor es la utilización de almidón total. Theurer (1986) llegó a la conclusión de que la cantidad de almidón que escapa a la fermentación ruminal parece ser un factor importante para explicar las diferencias en la digestibilidad total de almidón y la digestibilidad total de la proteína entre los diferentes granos.

Uno de los principales factores que afecta la productividad de los rumiantes alimentados con dietas con alta proporción de granos, es la digestión ruminal del almidón (Huntington, 1997), por lo que se han desarrollado diversos procesos para incrementarla y consecuentemente aumentar su valor energético (Owens et al., 1986).

Orskov (1986b) planteó que la digestibilidad del almidón tiene ciertas limitaciones fisiológicas, basándose en que en el proceso de fermentación del

almidón en el rumen ocurren inevitables pérdidas de calor y metano, que ascienden a valores entre 12 y 20% de la ingestión de energía (Orskov, 1986a).

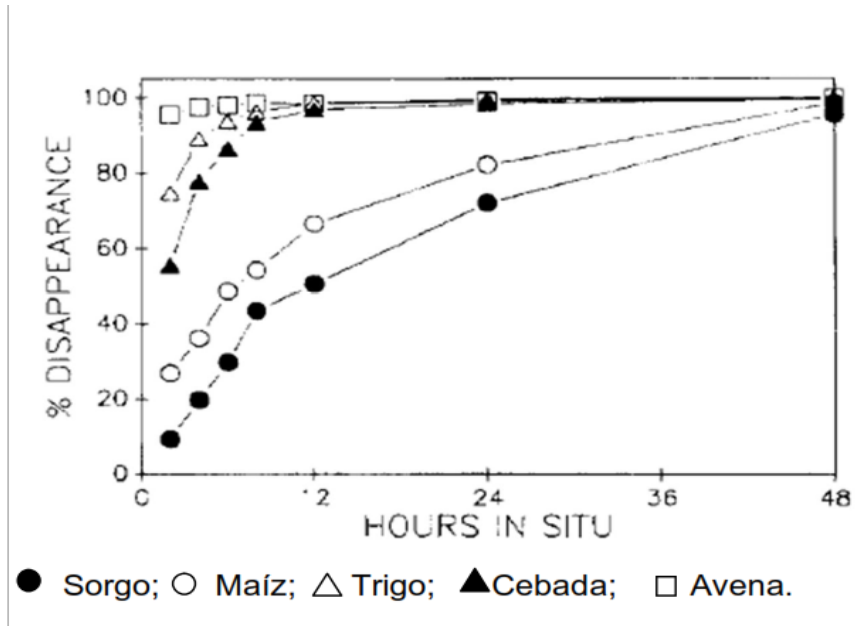
Los granos de trigo y cebada poseen un almidón de mayor degradabilidad ruminal que el sorgo y el maíz (Herrera- Saldana et al., 1990). Estos últimos tienen los gránulos de almidón incrustados en una matriz proteica la cual impide la rápida exposición al líquido ruminal y retarda el ataque microbiano (Rooney y Pflugfelder, 1986).

Esta mayor degradabilidad que presentan los granos de trigo y cebada también fue reportada por Ferraretto et al. (2013) quienes observaron una degradabilidad 17% superior en trigo y 25% superior en cebada, ambos con respecto al grano de maíz. Dichos autores mencionan que estos resultados concuerdan con los reportados por Theurer (1986), Huntington (1997), y sostienen que está relacionado a las diferencias en la matriz de almidón-proteína que presentan los granos de cereales (Ferraretto et al., 2013).

En orden de degradación, en un lapso de 60 minutos, para el ensayo realizado por Herrera-Saldana et al. (1990), los resultados fueron: sorgo, maíz, cebada, trigo y avena. Herrera-Saldana et al. (1990) afirman que la degradabilidad de la proteína y el almidón mostraron tendencias similares a la de materia seca.

Como se ilustra en el gráfico No. 1, se puede observar que a las 48 horas de incubación los granos evaluados alcanzaron una desaparición total, diferenciándose así la tasa de desaparición entre los mismos.

Gráfico No.1. Tasa de desaparición de almidón de los diferentes granos.



Fuente: Herrera-Saldana et al. (1990).

## 2.4 GASES DE EFECTO INVERNADERO

Los principales gases con efecto invernadero (GEI), son el vapor de agua, el dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), el metano ( $\text{CH}_4$ ), el óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) y los halo-carburos (Fernández et al., 2009).

Estos gases absorben parte de la radiación infrarroja reflejada en la superficie terrestre y la emiten en todas direcciones lo que provoca el calentamiento de la superficie terrestre y de las capas bajas de la atmósfera. Sin este "efecto invernadero" natural, las temperaturas en la tierra serían menores que las actuales y la vida no sería posible tal como la conocemos. Así mismo existe preocupación internacional debido al aumento creciente en la concentración de GEI, este incremento adicional de temperatura podría ocasionar un cambio climático (Fernández et al., 2009).

Si bien Uruguay tiene una baja emisión y se considera al sector agropecuario como sumidero importante de  $\text{CO}_2$ , este sector es el principal emisor de  $\text{CH}_4$  y  $\text{N}_2\text{O}$ , gases con mayor efecto invernadero que el  $\text{CO}_2$  (Fernández et al., 2009).

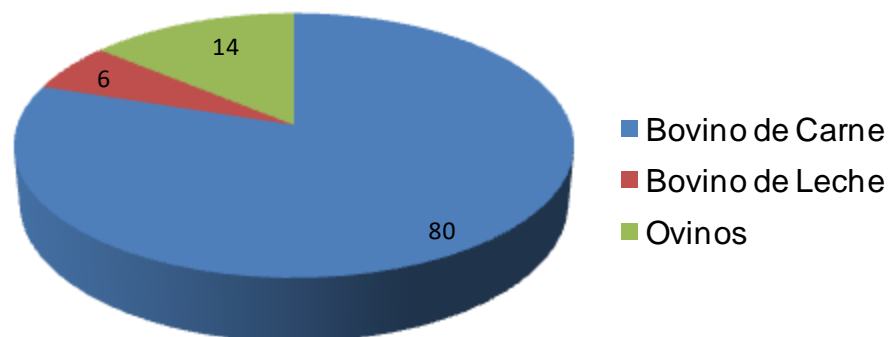
### 2.4.1 Metano

El metano se origina de la descomposición anaerobia de la materia orgánica. El CH<sub>4</sub> es el compuesto orgánico gaseoso más abundante en la atmósfera y es el segundo en abundancia en los GEI (Fernández et al., 2009). Se estima que este gas contribuye unas 21 veces (más o menos) más que el CO<sub>2</sub> al cambio climático.

La producción de metano durante la fermentación ruminal representa una pérdida de 2-12% de la energía bruta consumida por los rumiantes, y además es un gas de la atmósfera que se encuentra implicado en la contribución al calentamiento global (Fernández et al., 2009).

Se estima que las actividades agrícolas contribuyen en un 65% a las emisiones totales de CH<sub>4</sub> antropogénico (Fernández et al., 2009). En el caso de Uruguay se estima que del total de CH<sub>4</sub> emitido, el 90% proviene del sector agropecuario, correspondiendo el 84 % a la fermentación ruminal del ganado, un 2% al manejo del estiércol y solo un 4% generado por cultivos como arroz (MVOTMA. DINAMA, 2006, figura No.1).

Figura No.1. Emisión de metano del sector pecuario y participación por tipo de ganado.



Fuente: MVOTMA. DINAMA (2002).

Los rumiantes tienen la capacidad de utilizar fuentes de energía fibrosas que no pueden ser aprovechadas por los animales monogástricos y

transformarlas en alimentos de alto valor nutritivo (carne, leche). Esto es posible, debido a que poseen un sistema digestivo especializado para la fermentación pre-gástrica del alimento en el retículo-rumen, a través de la asociación simbiótica con microorganismos capaces de degradar carbohidratos estructurales, como celulosa y hemicelulosa, utilizar el nitrógeno no proteico (amonio) para la síntesis de proteína microbiana, la cual se considera de alto valor nutritivo, que el animal puede utilizar de manera eficiente (Van Soest, 1994).

En la fermentación ruminal, que se realiza en condiciones anaeróbicas, los alimentos son transformados a ácidos grasos volátiles (AGV), amonio, metano, CO<sub>2</sub>, calor, hidrógeno y ácido láctico. El animal utiliza los AGV como fuente de energía y la proteína microbiana como fuente de aminoácidos, mientras que el amonio y el metano que no son utilizados por los microorganismos ruminales, son considerados residuos (Fernández et al., 2009).

El tiempo de permanencia de los alimentos en el rumen va a depender de si las dietas presentan alta o baja digestibilidad de la fibra. En el caso de dietas con alto contenido de fibra de baja digestibilidad, el tiempo de retención es considerablemente mayor que con dietas concentradas.<sup>1</sup>

La población microbiana del rumen es sumamente diversa, incluye más de 200 especies y cepas diferentes de bacterias y protozoarios, pero solamente predominan algunas de ellas (Van Soest, 1994). El mayor o menor grado de desarrollo de unas frente a otras depende de la fuente de energía aportada en la dieta animal, lo que determina el tipo de fermentación y parámetros del ambiente ruminal como el pH y la tasa de pasaje, cantidades de AGV y metano producidas (Fernández et al., 2009). El metano es eliminado por el animal a través de las fosas nasales y en menor proporción, por la boca (Fernández et al., 2009).

Las bacterias metanogénicas constituyen el grupo más sensible a cambios en parámetros ambientales del rumen (Van Soest, 1994). Estas bacterias dependen de otros microorganismos que les aporten sustratos tales como el CO<sub>2</sub> y el H<sub>2</sub>, entre ellos los protozoarios a los cuales se adhieren para captar el H<sub>2</sub> metabólico que estos les transfieren. Al actuar como sumideros del H<sub>2</sub> ruminal los organismos metanogénicos cumplen una importante función en el proceso de digestión de la fibra, porque mantienen el pH en valores adecuados (6,5 - 6,7) para el crecimiento de las bacterias que degradan estructuras moleculares complejas como la celulosa, a estructuras carbonadas

---

<sup>1</sup> Marichal, M. J. 2012. Com. personal.



simples como los ácidos grasos volátiles que pueden ser absorbidas por el animal y posteriormente utilizadas como fuentes de energía o como esqueletos carbonados para la síntesis de proteínas (Van Soest, 1994).

## 2.5 HIPÓTESIS

La combinación de pasturas sembradas con proporciones variables de granos afectará la fermentación de la materia orgánica y la producción de metano *in vitro* y la producción de gas.

La producción de metano y gas, variará según las características de los almidones de los granos usados.

La producción de metano y gas, se verá afectada según la concentración de taninos que presenten los sorgos utilizados.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO

El trabajo se realizó en el laboratorio de nutrición animal de la facultad de agronomía (Sayago, Montevideo) y comenzó en el mes de octubre de 2015 con la medición de gas *in vitro*, finalizándose la fase experimental en febrero de 2016. Todos los procedimientos que implicaron el uso de animales, fueron realizados de acuerdo a las normas del CHEA (Comisión Honoraria de Experimentación Animal).

#### 3.2 TRATAMIENTOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Se midió y comparó la fermentescibilidad de la materia orgánica y la producción de metano *in vitro* de dos gramíneas raigrás y dactylis en combinación con niveles crecientes de tres suplementos energéticos.

Se evaluaron 24 tratamientos en un diseño completamente aleatorizado con un arreglo factorial de los tratamientos (2 pasturas x 3 granos x 4 niveles de suplementos energéticos) con tres repeticiones por tratamiento. Se realizaron mezclas de las pasturas con tres suplementos energéticos (granos de cebada, granos de sorgo con bajo contenido en taninos y grano de sorgo con alto contenido en taninos). Las combinaciones de las pasturas con los diferentes suplementos energéticos definió el siguiente esquema para los distintos tratamientos.

- T1: dactylis con 20% de grano de cebada.
- T2: dactylis con 40% de grano de cebada.
- T3: dactylis con 60% de grano de cebada.
- T4: dactylis con 80% de grano de cebada.
- T5: dactylis con 20% de grano de sorgo alto en taninos.
- T6: dactylis con 40% de grano de sorgo alto en taninos.
- T7: dactylis con 60% de grano de sorgo alto en taninos.
- T8: dactylis con 80% de grano de sorgo alto en taninos.
- T9: dactylis con 20% de grano de sorgo bajo en taninos.
- T10: dactylis con 40% de grano de sorgo bajo en taninos.
- T11: dactylis con 60% de grano de sorgo bajo en taninos.
- T12: dactylis con 80% de grano de sorgo bajo en taninos.
- T13: raigrás con 20% de grano de cebada.
- T14: raigrás con 40% de grano de cebada.
- T15: raigrás con 60% de grano de cebada.
- T16: raigrás con 80% de grano de cebada.
- T17: raigrás con 20% de grano de sorgo alto en taninos.

T18: raigrás con 40% de grano de sorgo alto en taninos.  
T19: raigrás con 60% de grano de sorgo alto en taninos.  
T20: raigrás con 80% de grano de sorgo alto en taninos.  
T21: raigrás con 20% de grano de sorgo bajo en taninos.  
T22: raigrás con 40% de grano de sorgo bajo en taninos.  
T23: raigrás con 60% de grano de sorgo bajo en taninos.  
T24: raigrás con 80% de grano de sorgo bajo en taninos.  
T25: raigrás 100%  
T26: dactylis 100%

### 3.3 ALIMENTOS

#### 3.3.1 El raigrás y el dactylis: localización y muestreo

Los cultivares utilizados fueron Horizontón para el raigrás y Oberón para el dactylis, los cuales fueron sembrados el 14/08/2009. Para cada especie se sembraron tres parcelas de 2m<sup>2</sup>, se utilizó el método de siembra lineal, con una densidad de 27kg/há y 15kg/há, respectivamente, al momento de la implantación se utilizó un fertilizante binario (20:40), con una dosis de 100kg/há.

Las muestras de las pasturas utilizadas para el presente estudio fueron tomadas en el centro de investigación y experimentación “Dr. Alejandro Gallinal” (CIEDAG), perteneciente al Secretariado Uruguayo de la Lana (SUL), ubicado en Cerro Colorado, Florida en el km. 140 de la ruta 7( 33° 52´ latitud Sur, 55° 34´ longitud Oeste). El raigrás se muestreo el 13/10/2009 y el dactylis el 11/11/2009.

Se cortó toda la parcela con tijera, de manera manual al ras del suelo. Luego de cortado el forraje, se separó los restos secos del material verde, conservándose este último para evaluación. El material verde fue secado a 60° por 48 horas y procesado en un molino Wiley con una malla de 1 mm y almacenado para su posterior análisis.

#### 3.3.2 Suplementos energéticos

Se utilizaron tres granos (sorgo alto en taninos, sorgo bajo en taninos y cebada) cosechados en el año 2014, los sorgos fueron obtenidos de la empresa ALUR ubicada en Paysandú y para el caso de la cebada las muestras de grano fueron donadas por un productor del departamento de San José, las cuales fueron procesadas en un molino.

### 3.4 ANÁLISIS QUÍMICOS

Tanto para el caso de los suplementos energéticos, como para las pasturas, se determinó materia seca a 105 °C por la técnica No. 934,01 descrita por AOAC (2012) y los compuestos nitrogenados se calcularon como N total por la técnica No. 984.13 de Kjeldahl (AOAC, 1990). La proteína cruda (PC) fue calculada como N total por el factor 6.25. El contenido de cenizas de los suplementos y el forraje se determinó colocando el material en una mufla entre 550 y 600 grados centígrados durante 4 horas según la técnica No. 942,05 descrita por AOAC (1990). La materia orgánica (MO) se calculó por diferencia (% MO = 100 -% de cenizas). La fibra detergente neutro (FDNmo), fibra detergente ácido (FDAmo), y el contenido de lignina (Ligas), fueron analizadas para las pasturas, grano de sorgo alto en taninos, grano de sorgo bajo en taninos y cebada y se determinó según la técnica descrita por Van Soest et al. (1991). En la solución detergente neutro se omitió el sulfito de sodio y se incluyó  $\alpha$ -amilasa termoestable. Los resultados de FDNmo y FDAmo se expresaron en base materia orgánica (FDNmo y FDAmo).

### 3.5 ANIMALES

Fueron utilizados tres capones de raza Corriedale con fístulas ruminales, alojados en bretes individuales, en el galpón de pruebas de producción animal de la facultad de agronomía. Los capones presentaban un peso vivo de 40 kg en promedio, consumían 1, 250 kg de heno de alfalfa suministrados en dos oportunidades, con una diferencia de 12 horas entre comidas (8 y 20hrs.) y contaban con libre disponibilidad de agua.

### 3.6 PRODUCCIÓN DE GAS TOTAL Y METANO

Para el estudio de la fermentescibilidad de la materia orgánica y la producción de metano de las pasturas, los suplementos energéticos y sus mezclas, se empleó la técnica de producción de gas *in vitro* (Theodorou et al., 1994). En viales galeno de 125 ml, se pesaron e introdujeron 0,5 gramos de muestra. Doce horas antes de su incubación, se les colocó 12 ml. de agua desionizada y refrigeró a 4°C para la hidratación del sustrato. A primera hora de la mañana del día de la medición de gas, los viales con las muestras se retiraron de la heladera y se colocaron en un baño de agua a 39°C con agitación. Una vez estabilizada su temperatura en 39°C, en cada vial se adicionó inóculo ruminal (10 ml), solución buffer (28 ml) y solución reductora (2 ml). La solución buffer fue una combinación de 2 soluciones (A y B, cuadro No.6, Ankom, 2005).

Cuadro No.6. Composición de la solución buffer y de la solución reductora.

Solución A (c.s.p 1000 ml)	
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	4 g
NaHCO <sub>3</sub>	35 g
Agua destilada	Hasta llegar a 1000 ml total
Solución B	
Solución macromineral (c.s.p 1000 ml)	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	14.4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6.2 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.6 g
Agua destilada	Hasta llegar a 1000 ml total
Solución micromineral (c.s.p 100 ml)	
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	13.2 g
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	10 g
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1 g
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	8 g
Agua destilada	Hasta llegar a 100 ml total
Solución reductora (c.s.p 100 ml)	
Resazurina (indicador redox)	0,1 g
Agua destilada	Hasta llegar a 100 ml total

El inóculo ruminal se obtuvo de los tres ovinos utilizados en la técnica in situ los cuales se mantuvieron en las mismas condiciones de alojamiento y alimentación. El contenido ruminal (sólidos y líquidos) se colectó dos horas luego de la comida de la mañana y en el laboratorio se procesó en una licuadora (Punktal, PK-500SS) durante 1 minuto y se filtró a través de cuatro capas de gasa, llevándose a cabo todo el manipuleo bajo un flujo continuo de CO<sub>2</sub>. Luego de inoculados, los viales se taparon con septos de goma butilo y sellaron con precintos de aluminio, empleando un flujo continuo de CO<sub>2</sub> durante todo el procedimiento. En cada incubación se incluyeron tres viales que contienen todo lo mencionado anteriormente menos la muestra (blancos) y tres viales muestras de heno alfalfa estándar. Se realizaron seis incubaciones (“corridas”) separadas una semana entre sí.

Las mediciones de gas se realizaron a las 1,2,3,4,6,8,10,12,16,24,48, 72 y 96 horas de incubación, midiendo la hora, la presión atmosférica, la presión dentro de la botella y el volumen de gas en los tiempos pre establecidos. Luego de medida la presión se dejaba insertada una aguja para permitir el escape de gas hasta equilibrar con la presión atmosférica y se agitaba suavemente para mezclar el contenido de los viales. La presión generada por el gas acumulado en la parte superior de los viales de incubación, se midió con un transductor de presión tipo RZ-68601-00 conectado a un lector

digital (Bailey Mackey Ltd., Birmingham, UK) y el volumen de gas con una jeringa de 10 o 20 ml. graduada al ml. El volumen de gas (ml) acumulado en cada horario de medición fue luego estimado de acuerdo a las ecuaciones de regresión generadas en cada "corrida" a partir de los datos de presión y volumen medidos. Para la evaluación de los tratamientos se consideró la cinética de la producción de gas (mediciones de 0 a 96 horas) y la producción de metano acumulado hasta las 8 hrs., entre las 8 y 24 hrs. y entre las 24 y 48 hrs. de incubación, períodos que abarcaron 8, 16 y 24 hrs. de incubación respectivamente. También se evaluó la producción de metano entre las 0 y las 48 horas de incubación. Este último resultado surgió de la suma de las producciones parciales en los períodos indicados previamente. Para obtener estos últimos valores, se emplearon por cada muestra incubada, tres juegos de viales de 125 ml. tapados con septos de butilo, sellados con precinto de aluminio e identificados. En uno de los viales fue transferido, en forma inmediata, el gas generado en cada momento de medición realizada desde las 0 a las 8 hrs. de incubación (inclusive), en el segundo y tercer frasco se procedió de la misma forma para las mediciones de las 8 a las 24 hrs. de incubación (inclusive) y de las 24 a las 48 horas de incubación.

En el gas acumulado en cada uno de los frascos se midió la concentración de metano en un cromatógrafo de gases Agilent modelo 7890B modificado especialmente para la determinación de gases de efecto invernadero, equipado con detector "feed" (detector de ionización de llama) y columna HAYESEP Q 80-100 Mesh de 12 pies de largo. Las condiciones cromatográficas fueron temperatura de inyector 200°C, temperatura del detector 250°C, temperatura del horno isoterma a 60°C, el gas "carrier" utilizado fue nitrógeno de alta pureza a presión constante de 12.3 psi. Se utilizó un estándar de metano de concentración conocida para calcular los miligramos de metano obtenidos para cada muestra.

### 3.7 CINÉTICA DE DEGRADACIÓN

La cinética de degradación ruminal de la materia orgánica se estudió usando la técnica de las bolsas de nailon (Ørskov y McDonald, 1979). Se tomaron 3 gramos de cada muestra (las muestras incluían, los alimentos puros y las mezclas descriptas anteriormente) las cuales se colocaron individualmente en bolsas (ANKOM Technology) de 5 x 3 cm. confeccionadas con tela polyester de monofilamento con un tamaño de poro de 45 µm. Se incubaron las bolsas dentro del rumen por 2, 4, 8, 12, 16, 24, 72 y 96 horas en cada uno de los ovinos. También se incubó muestras de alfalfa como estándar de referencia en todas las horas. Previo a la incubación, las bolsas fueron sumergidas en agua tibia (39°C) durante 15 min. Las bolsas se colocaban simultáneamente en el rumen, inmediatamente luego de la primera comida, fueron retiradas

secuencialmente en los tiempos designados. Después de retiradas las bolsas del rumen, se enjuagaban con agua fría y se almacenaban a -20°C. Una vez descongeladas, fueron lavadas en un lavarropas hasta que el agua saliera limpia, se secaban en un horno de aire forzado y se pesaban.

### 3.8 CÁLCULOS

#### 3.8.1 Cinética de la producción de gas

Para describir la cinética de producción de gas se emplearon modelos logísticos con 1 o 2 fases (Schofield et al., 1994).

Modelo 1: bifásico con tiempo lag.

$$V(t) = \frac{V1}{1 + e^{(2-4k1)(t-L)}} + \frac{V2}{1 + e^{(2-4k2)(t-L)}} + \varepsilon$$

Modelo 2: bifásico sin tiempo lag.

$$V(t) = \frac{V1}{1 + e^{(2-4k1)(t)}} + \frac{V2}{1 + e^{(2-4k2)(t)}} + \varepsilon$$

Modelo 3: monofásico con tiempo lag.

$$V(t) = \frac{A}{1 + e^{(2-4k)(t-L)}}$$

Donde,

Vt: (ml) producción acumulada de gas en "t"

V1 : (ml) volumen final de gas derivado de la degradación de la fracción soluble de rápida digestión cuando el "t" tiende a infinito.

V2: (ml) volumen final de gas derivado de la degradación de la fracción de lenta digestión cuando el "t" tiende a infinito.

K1: la tasa específica de producción de gas resultante de la degradación de la fracción soluble %/hrs.

K2: la tasa específica de producción de gas debido resultante de la degradación de la fracción de lenta digestión, %/hrs.

t: tiempo de incubación (hrs.)

L: tiempo de colonización (hrs.)

A: (ml) potencial de máxima producción de gas

k: tasa de producción de gas (%/hrs.)

Los parámetros de la cinética fueron calculados usando el procedimiento no lineal (PROC NLIN) de SAS.

### 3.8.2 Gramos de materia orgánica desaparecida

Para la obtención de la materia orgánica desaparecida, se realizó un cálculo por diferencia partiendo del peso de muestra incubada (valor inicial), luego de las 96 horas de incubación, esta muestra se incineraba en mufla durante 5 horas, y se obtenían cenizas (valor final), la diferencia entre el valor inicial y el valor final, dio como resultado el valor de la materia orgánica desaparecida en gramos.

### 3.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los datos fueron analizados con un diseño completo al azar (DCA) con arreglo factorial de los tratamientos (dos pasturas x tres suplementos x cuatro niveles) y se explicó mediante el siguiente modelo matemático.

$$Y_{ijkp} = \mu + P_i + G_j + D_k + (PG)_{ij} + (PD)_{ik} + (GD)_{jk} + (PGD)_{ijk} + \varepsilon_{ijkp}$$

Dónde,

Y: es la  $ijkp$ -ésima observación del  $i$ -ésimo del nivel A y  $j$ -ésimo del factor del nivel B

$\mu$ : media poblacional

$P_i$ : efecto del  $i$ -ésimo nivel A

$G_j$ : efecto del  $j$ -ésimo nivel B

$D_k$ : efecto del  $k$ -ésimo nivel C

$PG_{ij}$ : interacción del efecto del  $i$ -ésimo nivel A con el efecto del  $j$ -ésimo nivel B.

$(PD)_{ik}$ : interacción del efecto del  $i$ -ésimo nivel A con el efecto del  $k$ -ésimo nivel C.

$(GD)_{jk}$ : interacción del efecto del  $j$ -ésimo nivel B con el efecto del  $k$ -ésimo nivel C.

$(PGD)_{ijk}$ : interacción del efecto del  $i$ -ésimo nivel A con el efecto del  $j$ -ésimo nivel B con el efecto del  $k$ -ésimo nivel C.

$\varepsilon_{ijkp}$ : error experimental

Dónde,

Nivel A: tipo de pastura (dactylis, raigrás)

Nivel B: tipo de grano (cebada, sorgo alto en taninos, sorgo bajo en taninos)

Nivel C: nivel de inclusión del suplemento energético (20, 40, 60, 80%)

El análisis estadístico se realizó utilizando el procedimiento mixto (PROC MIXED) del paquete estadístico SAS con los grados de libertad ajustados por el método de Kenward – Roger. El modelo incluyó suplementos y



niveles como efectos fijos. Las medias de los efectos significativos fueron comparadas usando el test de Tukey, considerándose diferencias significativas con  $P < 0.05$ . Diferencias entre medias con valores de  $P$  entre 0.05 y 0.15 se aceptaron como presentando tendencias a diferir.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 ALIMENTOS

#### 4.1.1 Forrajes

Las muestras de las pasturas evaluadas correspondían al primer corte de ambas, cuyo estado fenológico era de 1.5 y 1.6 MSC (*mean stage by count*) y una altura de 17.4 y 18.9 cm., en raigrás y dactylis respectivamente. En el cuadro No.7, se puede apreciar la caracterización química, la producción total de gas y la producción de gas y de metano acumulados a las 48 de fermentación.

El raigrás y el dactylis presentaron, respectivamente, 16.3 y 20.6 % de materia seca, con valores de la materia orgánica similares (9.8 y 9.0% de cenizas, para raigrás y dactylis, respectivamente). Las concentraciones porcentuales en base seca de PC, FDNmo, FDAmo y lignina en raigrás y dactylis fueron, 24.1 y 20.1, 44.6 y 49.0, 19.1 y 23.6, y 0 y 1.9 respectivamente. Los valores de hemicelulosa y celulosa, base seca, respectivamente, 25.5 y 19.1% en el raigrás y 25.9 y 21.7% en dactylis, estos valores se obtuvieron realizando cálculos por diferencia. La producción de gas total en raigrás fue mayor ( $p < 0.003$ ) que en dactylis, 622 y 441.3 ml/g MOd respectivamente, observándose 2.4 h de retardo en la fermentación (tiempo lag) en dactylis, lo cual no se observó en el raigrás. Tanto la producción de metano acumulado de 0 a 48 horas así como el gas acumulado en el mismo periodo, fueron similares ( $p > 0.111$ ) en ambas pasturas.

Cuadro No.7. Caracterización química, producción de gas y metano *in vitro* de las pasturas empleadas.

Especie	<i>Lolium perenne</i>	<i>Dactylis glomerata</i>
Caracterización química (% base seca)		
MS 105 <sup>o</sup>	15.2	18.8
Cen	9.8	9.0
PC	24.1	20.1
aFDNmo	44.6	49.4
FDAmo	19.1	23.6
Ligas	0.0	1.9
EM (Mcal/kgMS)*	2.67	2.54
Producción de metano y gas <i>in vitro</i> acumulados (ml/ g MOd)		
Prod. total de gas (0 a 96 hrs.)	622b	441.3 a
Tiempo Lag (horas)	0	2.4
Metano (0 a 48 hrs.)	13.7	14
Gas (0 a 48 hrs.)	461.4	442.9

a, b: P-valor = 0.003

MS: materia Seca, aFDNmo: fibra detergente neutro en la materia orgánica analizada con alfa amilasa, FDAmo: fibra detergente ácido en la materia orgánica, Ligas: lignina analizada con ácido sulfúrico, PC: proteína cruda, Lag: tiempo de inicio de la fermentación. EM: Energía metabolizable.

\* EM=3.20-0.028\*%FDA

#### 4.1.2 Suplementos energéticos

En el cuadro No.8 se presenta la caracterización química, la producción total de gas y la producción de gas y de metano acumulados a las 48 de fermentación de los granos evaluados.

Cuadro No.8. Caracterización química de los granos de sorgo alto y bajo en taninos y del grano de cebada.

	Grano de sorgo		Grano de cebada
	Alto en taninos	Bajo en taninos	
	%, en base seca		
MS	88.79	81.91	87.47
C	1.5	1.39	2.17
MO	98.5	98.61	97.83
PC	7.83	7.19	10.01
AFDNmo	15.35	11.63	21.06
FDAmo	5.97	3.04	4.14
Ligas	2.93	0.56	0.92
EM (Mcal/kgMS)*	3.29	3.39	3.35
Producción de metano y gas <i>in vitro</i> acumulados (ml/ g MOd)			
Prod. total de gas (0 a 96 hrs.)	428.0	415.2	455.3
Tiempo Lag (hrs.)	15	7.04	2.03
Metano (0 a 48 hrs.)	9.7	9.5	10.4
Gas (0 a 48 hrs.)	360.2	373	392.3

MS: materia Seca, aFDNmo: fibra detergente neutro en la materia orgánica analizada con alfa amilasa, FDAmo: fibra detergente ácido en la materia orgánica, Ligas: lignina analizada con ácido sulfúrico, PC: proteína cruda

\*EM (Mcal/kgMS) = 3,50-0,035x%FDA

La concentración de taninos en los sorgos corresponde a 0.06% y 0.2% para sorgos con baja y alta concentración, respectivamente.

#### 4.1.3 Mezclas

4.1.3.1 Efecto de la combinación de dactylis o raigrás con niveles crecientes de grano de cebada, sorgo alto o bajo en taninos, en la producción total de gas y en la producción de metano acumulado a las 48 hrs. de incubación

En el estudio de la producción total de gas, cuando los forrajes se incubaron solos se observó la presencia de un tiempo entre que la muestra fue incubada y comenzó a fermentar (tiempo lag) de 2.36 hrs. en el dactylis, no observándose una demora en el inicio de la fermentación en el raigrás. En todas las combinaciones de dactylis o raigrás con los tres granos evaluados se observaron tiempos lag crecientes ( $p < 0.001$ ) al aumentar la proporción de granos en las mezclas. Los mayores tiempos lag se observaron en las mezclas con 80% de grano (3.92, 8.08 y 6.46 hrs. para las combinaciones de dactylis con grano de cebada, grano de sorgo alto en taninos y grano de sorgo bajo en taninos, respectivamente y 3.50, 7.50 y 6.15 hrs. para las respectivas combinaciones con raigrás, cuadro No.9).

Cuando las pasturas se incubaron solas, la producción total de gas del raigrás fue mayor que en dactylis (622 y 441 ml/g MOd respectivamente), ( $p < 0.003$ ). En dactylis cuando se combinó con 20% de cualquiera de los granos la producción de gas aumentó, ( $p < 0.028$ ; 560, 565 y 584 ml/g MOd para las combinaciones con grano de cebada, sorgo alto en taninos y sorgo bajo en taninos), no observándose incrementos, ( $p > 0.201$ ) al aumentar la proporciones de granos en la mezcla (gráfico No.2). En raigrás la producción de gas disminuyó al incluir granos en la mezclas, cuando se combinó raigrás con grano de cebada, esa disminución ( $p = 0.004$ ) se observó al incluir un 80% de grano (622 y 425 ml/g MOd en raigrás y raigrás con 80% de cebada), no observándose diferencias entre la producción de gas con el forraje puro, con las mezclas de 20 o 40 (544 y 580 ml/g MOd, para las mezclas respectivamente). En las mezclas con grano de sorgo alto, la menor ( $p = 0.010$ ) producción de gas se registró con un 80 % de grano (622 y 464 ml/g MOd, respectivamente), con producciones intermedias ( $p > 0.096$ ) para las demás combinaciones. Todas las combinaciones de raigrás con sorgo bajo en taninos presentaron producciones de gas similares ( $p > 0.111$ ) y ( $p < 0.05$ ) que cuando se incubo el forraje solo (622, 456, 505, 406 y 415 ml/g MOd, para raigrás puro y las mezclas con 20, 40, 60 u 80% de grano respectivamente, cuadro No.9 y gráfico No.3).

La producción de gas en el período de incubación de 0 a 48 hrs. fue similar ( $p > 0.154$ ) para los forrajes cuando se incubaron solos y sus combinaciones con los distintos granos (396 a 532 ml /g MOd). La excepción fue una tendencia en la producción de gas del dactylis puro y su mezcla con 60% de grano de sorgo alto en taninos ( $p = 0.086$ ; 443 y 551 ml/g MOd, respectivamente); así como en raigrás puro y su combinación con 80% de grano de cebada ( $p = 0.063$ ; 461 y 578 ml/g MOd, respectivamente, cuadro No.9).

En producción de metano, las respuestas difirieron según la pastura evaluada. Cuando la pastura fue dactylis, no se registraron diferencias en la

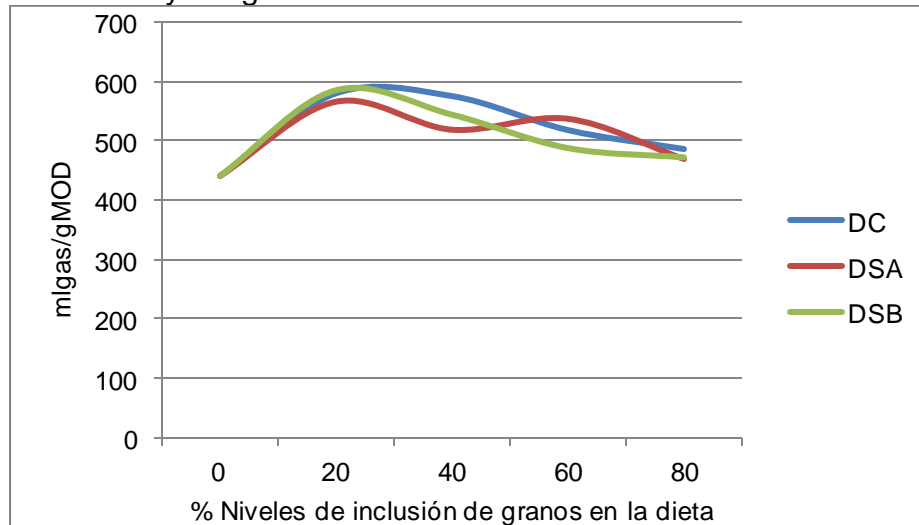
producción de metano, ( $p > 0.119$ ) cuando esta se incubó pura o en combinación con los distintos granos (14.7 ml/g MOd). En raigrás, las combinaciones que incluyeron cebada, presentaron producciones de metano similares entre sí ( $p > 0.101$ ; 12.2 ml/g MOd) y similares a la del forraje puro (13.8 ml/g MOd). Cuando el raigrás se combinó con grano de sorgo con alta concentración de taninos, se observó menor ( $p < 0.050$ ) producción de metano en la mezcla con 80% de grano que en el forraje puro (10.4 y 13.8 ml/ g MOd, respectivamente), presentando las demás mezclas valores intermedios y similares entre sí (12.3 ml/ g MOd). En las combinaciones con sorgo bajo en taninos, la mayor ( $p < 0.022$ ) producción de metano se observó en la mezcla con 40% de grano (16.1 ml / g MOd), presentando las demás combinaciones valores menores, pero similares entre sí ( $p > 0.086$ ; 11.8 ml/ g MOd, cuadro No.9).

Cuadro No. 9. Efecto de la combinación de dactylis o raigrás con niveles crecientes de grano de cebada, sorgo alto o bajo en taninos, en la producción total de gas y en la producción de metano acumulado a las 48 hrs. de incubación.

Pastura	Grano	NIVEL %					CME	P-valor
		0	20	40	60	80		
		Tiempo lag, hrs.						
<i>Dactylis glomerata</i>	C	2.36b	2.18b	2.81b	3.13ab	3.92a	0.4	<0.001
	SA	2.36c	2.85 c	3.57cd	5.28b	8.08a	0.4	<0.001
	SB	2.36c	2.57 c	3.37c	4.51b	6.46a	0.4	<0.001
<i>Lolium perenne</i>	C	0	0.95c	1.60cb	2.28b	3.50a	0.4	<0.001
	SA	0	1.46d	2.60c	5.17b	7.50a	0.4	<0.001
	SB	0	1.06c	2.03c	4.33b	6.15a	0.4	<0.001
Producción total de gas de 0 a 96 hrs. de incubación, ml/ g Mod								
<i>Dactylis glomerata</i>	C	441a	580b	575b	518ab	486ab	43.9	<0.028
	SA	441a	565b	518ab	536ab	469ab	43.9	<0.040
	SB	441a	584b	543ab	487ab	472ab	42.1	<0.019
<i>Lolium perenne</i>	C	622b	545b	580b	532ab	425a	43.9	<0.023
	SA	622b	539ab	521ab	536ab	464a	42.1	<0.010
	SB	622b	456a	505a	406 <sup>a</sup>	415a	42.1	<0.007
Producción de gas de 0 a 48 hrs. de incubación, ml/ g Mod								
<i>Dactylis glomerata</i>	C	442	459	494	481	485,7	42.3	>0.413
	SA	442	453	477	550	520	42.3	>0.086
	SB	442	474	496	491	512	55.8	>0.336
<i>Lolium perenne</i>	C	461	527	532	525	578	46.2	>0.063
	SA	461	515	517	528	504	49.7	>0.276
	SB	461	396	441	407	406	40.5	>0.297
Producción de metano de 0 a 48 hrs. de incubación, ml/ g Mod								
<i>Dactylis glomerata</i>	C	14.3	12.8	15.5	13.3	15.3	12.1	>0.119
	SA	14.3	14.8	17.2	16.8	17.3	12.1	>0.149
	SB	14.3	13.0	14.3	14.1	13.1	12.1	>0.473
<i>Lolium perenne</i>	C	13.8	10.9	13.1	12.1	12.6	12.1	>0.101
	SA	13.8a	11.4ab	12.5ab	12.9ab	10.4b	12.1	<0.050
	SB	13.8ab	11.7b	16.1a	12.0b	11.7b	12.0	<0.022

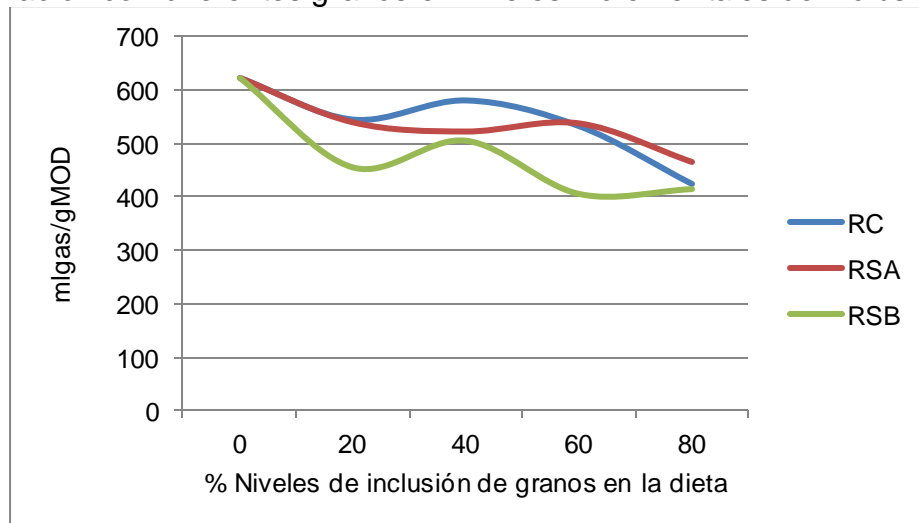
a, b, c: muestra diferencias significativas,  $p < 0.05$  (en las filas); CME: Cuadrados medios del error. C: cebada, SA: sorgo alto en taninos, SB: sorgo bajo en taninos.

Gráfico No.2. Producción de gas total (ml/gMOD) a las 96 horas de dactylis en combinación con niveles incrementales de inclusión de los granos de sorgo alto y bajo en taninos y del grano de cebada.



DC: mezclas de dactylis y cebada. DSA: mezclas de dactylis y sorgo alto en taninos. DSB: mezclas de dactylis y sorgo bajo en taninos.

Gráfico No.3. Producción de gas total (ml/gMOD) a las 96 horas de raigrás en combinación con diferentes granos en niveles incrementales de inclusión.



RC: mezclas de raigrás y cebada. RSA: mezclas de raigrás y sorgo alto en taninos. RSB: mezclas de raigrás y sorgo bajo en taninos.



#### 4.1.3.2 Comparación de la producción total de gas y de metano acumulado a las 48 hrs. de incubación, de dactylis o raigrás combinados con iguales niveles de grano de cebada, grano de sorgo alto en taninos y grano de sorgo bajo en taninos

En el estudio de la producción total de gas, cuando los forrajes se incubaron con niveles de 20 y 40% de grano de cebada se observaron tiempos lag, (2.18 y 2.8hrs. para dactylis y 0.95 y 1.57 hrs. para raigrás) donde el dactylis presentó un mayor ( $p < 0.021$ ) tiempo lag que el raigrás, para el resto de los niveles no se evidenciaron diferencias ( $p > 0.108$ ). Cuando se combinó 20% de sorgo alto en taninos con dactylis el tiempo lag fue mayor ( $p < 0.001$ ) que con raigrás combinado con 20% de grano de sorgo alto en taninos (2.84 y 1.46 hrs. respectivamente). Dactylis y raigrás con niveles de 20 y 40% de grano de sorgo bajo en taninos presentaron tiempos lag, (2.56 y 3.37 hrs. para dactylis y 1.06 y 2.03 hrs. para raigrás respectivamente) el dactylis presentó un mayor ( $p < 0.005$ ) tiempo lag que el raigrás, para el resto de los niveles no se evidenciaron diferencias ( $p > 0.554$ , cuadro No.10).

Cuando ambas pasturas se incubaron con niveles crecientes de grano de cebada y de sorgo alto en taninos la producción de gas total acumulado no mostró diferencias ( $p > 0.402$ ). La producción de gas fue mayor ( $p < 0.035$ ) cuando se combinó dactylis con 20% de grano de sorgo bajo en taninos, comparado con el raigrás con el mismo nivel de grano (584 y 456 ml/g MOd respectivamente, cuadro No.10).

La producción de gas en el periodo de 0 a 48 hrs., no presentó diferencias ( $p > 0.138$ ), cuando el dactylis y el raigrás fueron combinados con granos de cebada, granos de sorgo alto en taninos y granos de sorgo bajo en taninos con sus diferentes niveles de inclusión (cuadro No.10).

La respuesta en la producción de metano, no presentó diferencia ( $p > 0.111$ ) para el grano de cebada y el grano de sorgo bajo en taninos con igual nivel de inclusión, combinados con el dactylis y el raigrás. El grano de sorgo con alta concentración de taninos, presentó mayor ( $p < 0.0002$ ) producción de metano en todos los niveles de inclusión cuando se combinó con el dactylis, respecto al raigrás (cuadro No.10).

Cuadro No. 10. Producción de gas y de metano, de dactylis o raigrás combinados con iguales niveles de grano de cebada, grano de sorgo alto en taninos y grano de sorgo bajo en taninos

Granos							
Cebada							
Tiempo lag, h							
Pasturas	Nivel	20	40	60	80	CME	P- valor
<i>Dactylis glomerata</i>		2.18a	2.81a	3.13a	3.91a	0.37	<0.021
<i>Lolium perenne</i>		0.95b	1.57b	2.28a	3.55a	0.37	
Producción total de gas de 0 a 96 h de incubación, ml/ g Mod							
<i>Dactylis glomerata</i>		580	575	518	486	43.9	>0.003
<i>Lolium perenne</i>		544	580	532	425	43.9	
Producción de gas de 0 a 48 h de incubación, ml/ g Mod							
<i>Dactylis glomerata</i>		458	493	482	486	42	> 0.138
<i>Lolium perenne</i>		527	532	526	578	46	
Producción de metano de 0 a 48 h de incubación, ml/ g Mod							
<i>Dactylis glomerata</i>		12.8	15.5	13.2	15.3	1.210	>0.110
<i>Lolium perenne</i>		10.9	13.1	12.4	12.6	1.210	
Sorgo alto en taninos							
Tiempo lag, h							
Pasturas	Nivel	20	40	60	80	CME	P- valor
<i>Dactylis glomerata</i>		2.84a	3.56a	5.27a	8.08a	0.365	< 0.001
<i>Lolium perenne</i>		1.46b	2.60a	5.17a	7.57a	0.365	
Producción total de gas de 0 a 96 h de incubación, ml/ g Mod							
<i>Dactylis glomerata</i>		565a	518a	536a	470a	43.9	>0.003
<i>Lolium perenne</i>		539a	521a	537a	464a	42.1	
Producción de gas de 0 a 48 h de incubación, ml/ g Mod							
<i>Dactylis glomerata</i>		453	478	551	520	42	> 0.360
<i>Lolium perenne</i>		515	518	529	504	50	
Producción de metano de 0 a 48 h de incubación, ml/ g Mod							
<i>Dactylis glomerata</i>		14.8a	17.2 <sup>a</sup>	16.8a	17.3a	1.21	< 0.002
<i>Lolium perenne</i>		11.4b	12.5b	12.9b	10.4b	1.21	
Sorgo bajo en taninos							
Tiempo lag, h							
Pasturas	Nivel	20	40	60	80	CME	P- valor

Continuación cuadro No.10

<i>Dactylis glomerata</i>		2.56a	3.37a	4.51 <sup>a</sup>	6.45a	0.3652	< 0.005
<i>Lolium perenne</i>		1.06b	2.03b	4.32 <sup>a</sup>	6.15a	0.3652	
Producción total de gas de 0 a 96 h de incubación, ml/ g Mod							
<i>Dactylis glomerata</i>		584a	543a	488 <sup>a</sup>	472a	42.1	>0.003
<i>Lolium perenne</i>		456b	505a	406 <sup>a</sup>	415a	42.1	
Producción de gas de 0 a 48 h de incubación, ml/ g Mod							
<i>Dactylis glomerata</i>		474	496	492	513	55.8	> 0.178
<i>Lolium perenne</i>		397	448	408	407	40.5	
Producción de metano de 0 a 48 h de incubación, ml/ g Mod							
<i>Dactylis glomerata</i>		13	14.3	14.1	13.1	1.2095	> 0.230
<i>Lolium perenne</i>		11.7	16	12	11.7	1.2095	

a, b: muestra diferencias significativas,  $p < 0.05$  (en las columnas); CME: Cuadrados medios del error. C: cebada, SA: sorgo alto en taninos, SB: sorgo bajo en taninos.

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. CARACTERIZACIÓN NUTRICIONAL DE LAS PASTURAS

Los valores obtenidos sobre la caracterización química de las pasturas corresponden al primer corte luego de la siembra, éstas se encontraban en estado vegetativo al momento del corte, lo que se refleja en los altos valores de proteína cruda, y la baja concentración de fibra. Estos valores no presentaron grandes diferencias con los reportados por Mieres et al. (2004), Fulkerson et al. (2006), Turner (2006).

### 5.2 PRODUCCIÓN DE GAS ACUMULADO Y METANO

El tiempo de demora en el inicio de la fermentación que presentó el dactylis, podría estar dado por la presencia de lignina, la cual podría retrasar el acceso de los microorganismos a los carbohidratos estructurales de la pared celular. En el caso del raigrás que no presentó lignina, los carbohidratos estructurales estuvieron disponibles para la población microbiana al inicio de la incubación con el inóculo, ya que no se mostró un tiempo lag. El aumento en el tiempo lag con el agregado de granos, pudo haber sido consecuencia de la flora microbiana que contenía el inóculo ruminal (extraído de animales alimentados con una dieta que contenía 100% de heno de alfalfa), en el cual se cree, predominaban microorganismos especializados en la fermentación de la fibra. En este caso, el agregado de concentrados con alto contenido de almidón, como es el caso de los granos, requiere un período de adaptación y proliferación de microorganismos capaces de actuar sobre el almidón.

Las diferencias observadas en la producción de gas acumulado de 0 a 96 horas, donde el raigrás mostró valores mayores que el dactylis, podría explicarse por diferencias en la estructura de la pared celular, por la presencia de lignina en el dactylis donde se cree que la disposición de los componentes, podría dificultar el acceso de los microorganismos. En el raigrás esa estructura podría ser más accesible para los microorganismos y permitir así, la fermentación continua de los diferentes componentes celulares. El aumento en la producción de gas que se evidenció en el dactylis con el agregado de un 20% de granos, se puede atribuir al aumento de energía disponible para los microorganismos, lo cual mejora la fermentación y aumenta la producción de gas. Cuando la inclusión de grano fue mayor al 20%, la producción de gas no mostró diferencias, lo que podría explicarse por un desbalance en el aporte de energía y proteína, siendo este último el limitante, (en cantidad o por el tipo de proteína presente) no modificándose la actividad microbiana.

La falta de diferencias en la producción de metano entre las pasturas puede explicarse por la composición química de las paredes celulares, la cual fue similar, aunque se sabe que el tiempo durante el cual se produjo el metano, pudo haber sido diferente, debido a la estructura de la pared, siendo más rápida la producción de metano para el raigrás, el cual presenta una pared de fácil acceso para los microorganismos, comparado con el dactylis. El raigrás combinado con un 80% de grano de sorgo, indistintamente de su concentración en taninos disminuyó la producción de metano, sin embargo con el agregado de grano de cebada en cualquiera de sus niveles este efecto no se evidenció, esta diferencia pudo darse por la arquitectura de los granos, donde la cebada es un grano vestido, en el cual las envolturas (celulosa y hemicelulosa) representan 13% de su peso, mientras que el sorgo no presenta envolturas (Santini y Elizalde, 1993). También pudo deberse al tipo de endospermo presente en los granos, según lo reportado por Huntington (1997), los granos de sorgo presentan un endospermo del tipo córneo embebido en una matriz proteica y la cebada presenta un endospermo harinoso con ausencia de la matriz, el cual es más susceptible a la digestión por parte de los microorganismos.

En la mezcla de raigrás con grano de cebada los microorganismos que estaban presentes en el inóculo ruminal degradaron las cubiertas del grano y dejaron expuesto el almidón que es del tipo harinoso el cual presenta una rápida fermentación, posibilitando que la producción de metano no se viera alterada, no fue así para la mezcla de raigrás con los sorgos, los cuales no tienen envolturas pero sí un almidón de lenta fermentación para los microorganismos, los cuales se mantienen por más tiempo en el inóculo ruminal, lo que provoca una disminución en la producción de metano.

En la producción de metano cuando se combinó el dactylis y el raigrás con sorgo alto en taninos y sorgo bajo en taninos, no se presentaron diferencias en la producción de metano, esto podría explicarse por lo que reportan Hahn y Rooney (1986), quienes consideraron que los sorgos altos en taninos son aquellos que presentan un contenido mayor al 1%, los granos utilizados en las mezclas no llegan a estos contenidos y por lo tanto no tuvieron efecto sobre la producción de metano.

## 6. CONCLUSIONES

Para las condiciones en que fue llevado a cabo este experimento se puede concluir que:

- Las pasturas de gramíneas con igual altura de corte, similar estado fenológico en la misma estación y composición química, pueden variar en su potencial de suministro energético a nivel ruminal.
- Cuando los animales están en condiciones de alimentación con este tipo de pastura, la producción de metano se puede manipular con el tipo de grano que se suplemente.
- Los taninos tienen un efecto en el ambiente ruminal, inhibiendo sustratos y enzimas, lo cual retarda el comienzo de la fermentación de la materia orgánica de la muestra inoculada. Para evidenciar efecto de los taninos en la producción de metano, se debe trabajar con materiales que presenten mayor diferencia en la concentración de los mismos.

## 7. RESUMEN

En el laboratorio de nutrición animal de la facultad de agronomía (Sayago, Montevideo) fue llevado a cabo un experimento, que tiene como objetivo evaluar variaciones en la digestibilidad de la energía y en el potencial metanogénico de especies forrajeras y su combinación con granos de cereales, que difieren en tipo de endosperma, y concentración de taninos. Se evaluaron 24 tratamientos en un diseño completamente aleatorizado con un arreglo factorial de los tratamientos (2 pasturas x 3 granos x 4 niveles de suplementos energéticos) con tres repeticiones por tratamiento. Se realizaron mezclas de las pasturas con tres suplementos energéticos (granos de cebada, granos de sorgo con bajo contenido en taninos y grano de sorgo con alto contenido en taninos). Se registró la producción *in vitro* de gas a la 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 24, 48, 72 y 96 horas de incubación, con la recolección del gas acumulado de 0 a 8, 8 a 24 y 24 a 48 horas para determinar la concentración de metano por cromatografía gaseosa. En la producción de gas de 0 a 96 horas, el dactylis presentó diferencias ( $p < 0.0019$ ) con los tres granos, en los niveles más bajos de inclusión, siendo estos volúmenes mayores comparados con lo producido por el dactylis puro. En raigrás la producción de gas disminuyó al incluir granos en la mezclas, cuando se combinó raigrás con grano de cebada, esa disminución ( $p=0.004$ ) se contempló al incluir un 80% de grano, no observándose diferencias entre la producción de gas con el forraje puro y con las mezclas de 20 o 40 %. En las mezclas con grano de sorgo alto, la menor ( $p=0.010$ ) producción de gas se registró con un 80 % de grano. Todas las combinaciones de raigrás con sorgo bajo en taninos presentaron producciones de gas similares ( $p > 0.111$ ) a diferencia del forraje puro que presento una producción mayor ( $p < 0.05$ ). Para la producción de metano *in vitro* no se registraron diferencias estadísticas en las combinaciones de dactylis con granos a medida que se incrementaban los niveles de inclusión ( $p > 0.119$ ); para la producción de metano para aquellas combinaciones de raigrás con los granos (en sus diferentes niveles), no se observaron diferencias significativas cuando el grano era de cebada ( $p > 0.101$ ). En raigrás las combinaciones que incluyeron cebada, presentaron producciones de metano similares entre sí ( $p > 0.101$ ; 12.2 ml/g MOd) y similares a las del forraje puro (13.8 ml/g MOd). Cuando el raigrás se combinó con grano de sorgo con alta concentración de taninos, se observó menor ( $p < 0.050$ ) producción de metano en la mezcla con 80% de grano que en el forraje puro (10.4 y 13.8 ml/ g MOd, respectivamente), presentando las demás mezclas valores intermedios y similares entre sí (12.3 ml/ g MOd). La respuesta en la producción de metano, no presentó diferencia ( $p > 0.111$ ) para el grano de cebada y el grano de sorgo bajo en taninos con igual nivel de inclusión, combinados con el dactylis y el raigrás. El grano de sorgo con alta concentración de taninos, presento mayor ( $p < 0.0002$ ) producción de metano en

todos los niveles de inclusión cuando se combinó con el dactylis, respecto al raigrás.

Palabras clave: Fermentación ruminal; Suplementación energética; Metanogénesis; Efecto de los taninos.



## 8. SUMMARY

In the laboratory of animal nutrition of the faculty of agronomy (Sayago, Montevideo) took place an experiment whose objectives were to evaluate variations in the digestibility of the energy and the methanogenic potential of fodder species and their combination with cereal grains that differ in the type of starch and tannins concentration. Twenty-four different treatments were evaluated in a random design with a factorial arrangement (2 pastures x 3 grains x 4 levels of energetic supply) with three repetitions per treatment. Mixtures of the pastures with three energetic supplements were performed (barley grains, low tannin level sorghum (LTLS) and high tannin level sorghum (HTLS)). The *in vitro* production of gas was registered at the 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup>, 4<sup>th</sup>, 6<sup>th</sup>, 8<sup>th</sup>, 10<sup>th</sup>, 12<sup>th</sup>, 16<sup>th</sup>, 24<sup>th</sup>, 48<sup>th</sup>, 72<sup>nd</sup> and 96<sup>th</sup> hours of incubation, collecting the accumulated gas within 0 to 8, 8 to 24 and 24 to 48 hours to determine the methane concentration for each gas chromatography. For the gas production from 0 to 96 hours, the dactylis presented differences ( $p < 0.0019$ ) with the three grains, in the lower levels of inclusion, being these volumes greater compared to the produced by the pure dactylis. With ryegrass, the gas production decreased when grains were added to the mixtures, when ryegrass was combined with barley grain, this decrease ( $p = 0.004$ ) was noted when 80% of grain was included, but no difference was observed on gas production between pure forage, and mixtures of 20% or 40%. In mixtures with sorghum grain high in tannins, the lowest ( $p = 0.010$ ) gas production value was recorded with an 80% of grain. All combinations of ryegrass with sorghum low in tannins showed similar gas production levels ( $p > 0.111$ ) unlike the pure forage that showed a higher one ( $p < 0.05$ ). For the *in vitro* methane production, no statistical differences were registered in the Dactylis-grain combinations while the inclusion levels were increased ( $p > 0.119$ ); for the methane production for those combinations of ryegrass and grains (in different levels), no significant differences were registered when the grain was barley ( $p > 0.101$ ). For ryegrass, the combinations that included barley showed similar methane production levels ( $p > 0.101$ , 12.2 ml / g MOd) like those of pure forage (13.8 ml/g MOd). When the ryegrass was combined with sorghum grain with high concentration of tannins, methane production in the mixture with 80% of grain was lower ( $p < 0.050$ ) than in pure forage (10.4 and 13.8 ml / g MOd, respectively), while the other mixtures submitted intermediate values similar each other (12.3 ml / g MOd). The response in methane production did not differ ( $p > 0.111$ ) for barley grain and sorghum grain low in tannins with equal inclusion level, combined with dactylis and ryegrass. The sorghum grain with high concentration of tannins presented higher ( $p < 0.0002$ ) methane production at all levels of inclusion when combined with dactylis, compared to ryegrass.

Key words: Ruminant fermentation; Energetic supplement; Methanogenic;  
Tannin effect.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

1. Alexander, W.; MacGregor, A. W.; Bhatti, R. S. 1993. Barley chemistry and technology. 2<sup>nd</sup>. ed. St. Paul, Minnesota, American Association of Cereal Chemists. 486 p.
2. Barry, T. N.; Manley, T. R. 1984. The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep. 2. Quantitative digestion of carbohydrates and proteins. *Brit. J. Nutr.* 51: 493-504.
3. Betin, M. 1975. Perennial ryegrass and its cultivars. *Fourrages.* no. 64: 167-172.
4. Butler, L. G.; Riedl, D. S.; Lenbry, K. D. G.; Blytt, H. J. 1984. Interaction of protein with sorghum tannin; mechanism specificity and significance. *J Am. Oil Chem Soc.* 61: 916-920.
5. Cabral Filho, S. L. S.; Abdalla, A. L.; Bueno, I. C. S.; Nozella, E. F.; Rodrigues, J. A. S. 2005. Ruminal fermentation and degradability of sorghum cultivar whole crop, and grains, using and in vitro gas production technique. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123: 329-339.
6. Carámbula, M. 2002. Pasturas y forrajes; potenciales y alternativas para producir forraje. Buenos Aires, Hemisferio Sur. t. 1, pp. 111-119.
7. Carrasco, P. s.f. Sorgo granífero. Paysandú, Facultad de Agronomía. 156 p.
8. Curbelo, A.; Cajarville, C.; Melognio, E.; Ortiz, R.; Reperro, J. L. 2007. Cinética de degradación ruminal de granos de sorgo; efecto del genotipo y del ensilado. Cusco, Perú, APPA/ALPA. 4 p.
9. Cozzolino, D. 2000. Características de los suplementos utilizados en el Uruguay para su empleo en alimentación animal. Montevideo, INIA. 15 p. (Serie Técnica no. 110).
10. Czuchajowska, Z.; Klamczynski, A.; Paszczynska, B.; Baik, B.-K. 1998. Structure and functionality of barley starches. *Cereal Chem.* 75(5): 747-754.
11. Dumestre, P.; Rodríguez, N. 1995. Efecto de los niveles de suplementación con grano y frecuencia en el cambio de parcelas

de pastoreo en el comportamiento de novillos. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 83 p.

12. Fernández, A.; Irrisarri, P.; Methol, M.; Perdomo, C.; Pereyra, V.; Tarlera, S. 2009. Emisiones de metano y óxido nitroso: principales gases de efecto invernadero producidos por el sector agropecuario en Uruguay. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. 80 p.
13. Ferraretto, L. F.; Crump, P. M.; Shaver, R. D. 2013. Effect of cereal grain type and corn grain harvesting and processing methods on intake, digestion, and milk production by dairy cows through a meta-analysis. *J. Dairy Sci.* 96: 533–550.
14. Fulkerson, W. J.; Neal, J. S.; Clark, C. F.; Horadagoda, A.; Nandra, K. S.; Barchia, Y. 2006. Nutritive value of forage species grown in the warm temperate climate of Australia for dairy cows; grasses and legumen. *Livest. Sci.* 107: 253-264.
15. Ganzábal, A. 1997. Alimentación de ovinos sobre pasturas sembradas. Montevideo, INIA. 173 p. (Serie Técnica no. 84).
16. Hahn, D. H.; Rooney, L. 1986. Effect of genotype on tannins and phenols of sorghum. *Cereal Chem.* 63: 4-8.
17. Herrera-Saldana, R. E.; Hubert, J. T.; Poore, M. H. 1990. Dry matter, crude protein, and starch degradability of five cereal grains. *J. Dairy Sci.* 73: 2386-2393.
18. Hervás, G.; Frutos, P.; Giráldez, F.J.; Mantecón, A. R.; Álvarez Del Pino, M. C. 2004. Effect of different doses of quebracho tannins extract on rumen fermentation in ewes. *Anim. Feed Sci. Tech.* 109: 65-78.
19. Hibberd, C. A.; Wagner, D. G.; Schemm, R. L.; Mitchell, E. D.; Jr. Hintz, R. L.; Weilbel, D. E. 1982. Nutritive characteristics of different varieties of sorghum and corn grains. *J. Anim. Sci.* 55: 665-672.
20. Hodgson, J. 1990. *Grazing management; science into practice.* New York, Longman. 203 p.
21. Hristov, A. N.; Oh, J.; Lee, C.; Meinen, R.; Montes, F.; Ott, T.; Firkins, J.; Rotz, A.; Dell, C.; Adesogan, A.; Yang, W.; Tricarico, J.; Kebreab,

E.; Waghorn, G.; Dijkstra, J.; Oosting, S. 2013. Mitigation of greenhouse gas emissions in livestock production; a review of technical options for non-CO2 emissions. (en línea). Rome, FAO. 206 p. (FAO Animal Production and Health Paper no. 177). <http://www.fao.org/docrep/018/i3288e/i3288e.pdf>

22. Huntington, G. B. 1997. Starch utilization by ruminants; from basics to the bunk. *J. Anim. Sci.* 75: 852-867.
23. Langer, R. H. M. 1981. Las pasturas y sus plantas, establecimiento de la pastura. Montevideo, Hemisferio Sur. 514 p.
24. Lia, J. H.; Vasanthana, T.; Rosnagelb, B.; Hoover, R. 2001. Starch from hull-less barley; I. Granule morphology, composition and amylopectin structure. *Food Chem.* 74: 395–405.
25. McAllister, T. A.; Bae, H. D.; Yanke, L. J.; Cheng, K. J.; Muir, A. 1994. Effect of condensed tannins from birdsfoot trefoil on the endoglucanase activity and the digestion of cellulose filter paper by ruminal fungi. *Can. J. Microbiol.* 40: 298-305.
26. McMahon, L. R.; McAllister, T. A.; Berg, B. P.; Majak, W.; Acharya, S. N.; Popp, J. D.; Coulman, B. E.; Wang, Y.; Cheng, K. J. 2000. A review of the effects of forage condensed tannins on ruminal fermentation and bloat in grazing cattle. *Can. J. Plant Sci.* 80: 469-485.
27. McSweeney, C. S.; Palmer, B.; McNeill, D. M.; Krause, D. O. 2001. Microbial interactions with tannins; nutritional consequences for ruminants. *Anim. Feed Sci. Tech.* 91: 83-93.
28. Makkar, H. P. S.; Singh, B.; Dawra, R. K. 1988. Effect of tannin-rich of oak (*Quercus incana*) on various microbial enzyme activities of the bovine rumen. *Brit. J. Nutr.* 60: 287-296.
29. Mangan, J. L. 1988. Nutritional effects of tannins in animal feeds. *Nutr. Res. Rev.* 1: 209-231.
30. Mieres, J. M.; Assandri, L.; Cúneo, L. 2004. Tablas de valor nutritivo de alimentos. In: Mieres, J. M. ed. Guía para la alimentación de rumiantes. Montevideo, INIA. pp. 13- 66 (Serie Técnica no. 142).

31. Moore, J. E.; Brant, M. H.; Kunkle, W. E.; Hopkins D. I. 1999. Effects of supplementation on voluntary forage intake, diet digestibility, and animal performance. *J. Anim. Sci.* 77:122-135.
32. Morales, E.; López, J.; Calva, D.; González, E.; Wagner, N. 1997. Efecto de la adición de diferentes niveles de DL-Metionina en dietas con sorgos con contenido alto y bajo en taninos, sobre el comportamiento productivo de gallinas de postura. Tesis Ing. Agr. Ajuchitlán-Querétaro, México. Universidad Autónoma de Chapingo. pp. 29-33.
33. Moss, A. R. 1994. Methane production by ruminants-literature review of I. Dietary manipulation to reduce methane production and II. Laboratory procedures for estimating methane of diets. *Nutr. Abst. Rev.* 64: 785–806.
34. Mueller-Harvey, I.; McAllan, A. B. 1992. Tannins; their biochemistry and nutritional properties. *In: Morrison, I. M. ed. Advances in plant cell biochemistry and biotechnology.* London, UK, JAI. v. 1, pp. 151-217.
35. MVOTMA. DINAMA (Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente. Dirección Nacional de Medio Ambiente, UY). 2006. Inventario nacional de gases de efecto invernadero 2002. Montevideo. s.p.
36. Nocek, J. E.; Tamminga, S. 1991. Site of digestion of starch in the gastrointestinal tract of dairy cows and its effect on milk yield and composition. *J. Anim. Sci.* 74: 3598-3629.
37. Orskov, E. R.; McDonald, I. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *J. Agric. Sci.* 92(2): 492- 503.
38. \_\_\_\_\_. 1986a. Limits to starch digestion in the ruminant small intestine. *J. Anim. Sci.* 63: 1634-1648.
39. \_\_\_\_\_. 1986b. Starch digestion and utilization in ruminants. *J. Anim. Sci.* 63: 1624-1633.
40. Rooney, L. W.; Pflugfelder, R. L. 1986. Factors affecting starch digestibility with special emphasis on sorghum and corn. *J. Anim. Sci.* 63: 1607-1623.

41. Saba, W. J.; Hale, W. H.; Theurer, B. 1972. In vitro rumen fermentation studies with a bird resistant sorghum grain. *J. Anim. Sci.* 35 (5): 1076-1082.
42. Santini, F. J.; Elizalde, J. C. 1993. Utilización de granos en la alimentación de rumiantes. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 13(1): 39-60.
43. Scalbert, A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochem.* 30: 3875-3883.
44. Schofield, P.; Pitt, R. E.; Pell, A. N. 1994. Kinetics of fiber digestion from in vitro gas production. *J. Anim. Sci.* 72: 2980-2991.
45. Soliva, C. R.; Hess, H. D. 2007. Measuring methane emission of ruminants by in vitro and in vivo techniques. In: Makkar, H. P. S.; Vercoe, P. E. eds. *Measuring methane production from ruminants*. Zurich, Springer/Institute of Animal Science. pp. 15-31.
46. Szczodrak, J.; Pomeranz, Y. 1992. Starch-lipid interactions and formation of resistant starch in high-amylose barley. *Cereal Chem.* 69(3): 626-632.
47. Theodorou, M. K.; Williams, B. A.; Dhanoa, M. S.; McAllan, A. B.; France, J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 48: 185-197.
48. Theurer, C. B. 1986. Grain processing effects on starch utilization by ruminants. *J. Anim. Sci.* 63: 1649-1662.
49. Turner, L. R.; Donaghy, D. J.; Lane, P. A.; Rawnsley, R. P. 2006. Effect of defoliation management, based on leaf stage, on perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.), prairie grass (*Bromus willdenowii* Kunth.) and cookfoot (*Dactylis glomerata* L.) under dryland condition. 2. Nutritive value. *Grass Forage Sci.* 61: 175-181.
50. Van Soest, P. J. 1994. *Nutritional ecology of the ruminants*. 2nd. ed. Ithaca, USA, Cornell University. 363 p.