

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

PRODUCCIÓN DE GAS INVITRO Y POTENCIAL METANOGENICO
DE CAMPO NATURAL ESTIVAL Y SUPLEMENTOS PROTEÍNICOS

por

Raúl COMESAÑA CROSTA
Emiliano GÓMEZ DE CASTRO

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

MONTEVIDEO

URUGUAY

2016

Tesis aprobada por:

Director:

Ing. Agr. MSc. María del Jesús Marichal

Ing. Agr. PhD. Lucía Piaggio

Ing. Agr. PhD. Laura Astigarraga

Fecha: 22 de noviembre de 2016

Autores:

Raúl Comesaña Crosta

Emiliano Gómez de Castro

AGRADECIMIENTOS

En especial queremos agradecer a nuestras familias, por su constante apoyo a lo largo de toda nuestra formación académica.

A las personas, amistades y profesores que siempre contamos con su apoyo incondicional.

A nuestra tutora, Mariquita por el apoyo y guía en esta última instancia de la carrera.

Al personal de laboratorio de nutrición animal, Gabriela, Shirley, Ana, Susana y Pablo en lo que respecta al cuidado de los animales.

Por último, agradecer a Fripur y a Cousa por responder a nuestro pedido y brindarnos algunos de los suplementos proteicos del ensayo

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN	II
AGRADECIMIENTOS	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES	VI
1. <u>INTRODUCCIÓN</u>	1
1.1 OBJETIVOS.....	2
1.1.1 <u>Objetivos generales</u>	2
1.1.2 <u>Objetivos específicos</u>	2
2. <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</u>	3
2.1. MERCADO.....	3
2.2. REQUERIMIENTOS DE LOS CORDEROS.....	6
2.3. SUPLEMENTOS PROTEÍNICOS.....	11
2.4. DIGESTIÓN Y METABOLISMO PROTEÍNICO.....	14
2.5. GAS METANO.....	15
2.5. HIPÓTESIS.....	18
3. <u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	19
3.1. UBICACIÓN DEL EXPERIMENTO.....	19
3.2. TRATAMIENTOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL.....	19
3.3. ALIMENTOS.....	20
3.3.1. <u>Campo nativo: localización y muestreo</u>	20
3.3.2. <u>Suplementos proteínicos</u>	21
3.4. ANÁLISIS QUÍMICOS.....	21
3.5. CINÉTICA DE LA DEGRADACIÓN DEL N Y DIGESTIBILIDAD INTESTINAL DEL N NO DEGRADADO.	22
3.6. PRODUCCIÓN DE GAS TOTAL Y METANO.....	23
3.7. CÁLCULOS.....	26
3.7.1. <u>Cinética y degradabilidad efectiva del N</u>	26
3.7.2. <u>Cinética de producción de gas</u>	26
3.7.3. <u>Digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia orgánica</u>	27
3.7.4. <u>Cálculo de energía metabolizable</u>	27
3.7.5. <u>Digestibilidad intestinal de la proteína no degradable en el rumen</u>	28
3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	28
4. <u>RESULTADOS</u>	30

4.1.	ALIMENTOS.....	30
4.1.1.	<u>Campo natural</u>	30
4.1.2.	<u>Suplementos</u>	30
4.1.3.	<u>Mezclas</u>	33
4.2.	CINÉTICA.....	34
4.2.1.	<u>Producción de gas del campo natural y las combinaciones evaluadas</u>	34
4.2.2.	<u>Producción de metano</u>	38
5.	<u>DISCUSIÓN</u>	40
5.1.	CARACTERIZACIÓN NUTRICIONAL DEL CAMPO NATURAL.....	40
5.2.	CARACTERIZACIÓN NUTRICIONAL DE LOS SUPLEMENTOS PROTEÍNICOS.....	41
5.3.	CARACTERIZACIÓN NUTRICIONAL DE LAS MEZCLAS.....	41
5.4.	PRODUCCIÓN DE GAS Y METANO.....	41
6.	<u>CONCLUSIONES</u>	44
7.	<u>RESUMEN</u>	45
8.	<u>SUMMARY</u>	47
9.	<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	49

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro No.	Página
1. Requerimiento diarios de energía metabolizable, proteína cruda y proteína degradable en rumen de corderos en crecimiento.....	7
2. Respuesta en comportamiento productivo postdestete de corderos de entre 20 y 30 kg. de peso vivo pastoreando campo natural suplementados con distintos niveles y tipos de alimentos proteínicos	9
3. Antecedentes de la caracterización proteínica y digestibilidad in vitro de la materia orgánica de la harina de soja, la harina de girasol y la harina de pescado.....	13
4. Composición química del silo de raigrás y la harina de soja usada en el experimento 1 y 2.....	19
5. Composición química del total de la dieta ofrecida a ovejas del experimento 1 y 2.....	19
6. Precipitaciones promedio registradas en el CIEDAG en los períodos 1986-2010, 2011-2014 y en 2014.....	21
7. Composición de la solución buffer y de la solución reductora.....	24
8. Caracterización química, producción de gas y metano in vitro de los alimentos empleados	31
9. Caracterización química de las mezclas.....	33
10. Producción total de gas y cinética de fermentación del forraje de campo natural y de las mezclas en estudio.....	34
11. Producción total de gas metano, en gas acumulado dentro de las 48 horas.....	38
12. Relación proteína degradable en rumen: energía metabolizable requerida por ovinos y presente en el campo natural y en las mezclas evaluadas.....	43
Figura No.	
1. Producción mensual de materia seca en el período 1984-2001 en campos de cristalino.....	5
2. Evolución mensual de la digestibilidad de la materia orgánica en la materia seca (DMOMS) en el período 1984-2001 en campos de cristalino.....	5
3. Evolución mensual del contenido de proteína cruda en el período 1984-2001 en campo de cristalino.....	6

4. Respuesta a niveles crecientes de suplementación con harina de soja en la recría de corderos sobre campo natural en verano.....	10
5. Metabolismo proteínico.....	15
6. Emisiones antropogénicas de metano.....	16
7. Producción de gas de la combinación de CN con HG.....	36
8. Producción de gas de la combinación de CN con HS.....	37
9. Producción de gas de la combinación de CN con HP.....	37

1. INTRODUCCIÓN

La ganadería en el Uruguay históricamente es el rubro de mayor importancia, esto está dado por la adaptación de sus suelos, su importancia económica y su cultura en el rubro.

Uruguay está posicionado como uno de los principales productores cárnicos del mundo, es reconocido por ser exportador de productos de excelente calidad. Esto se debe a que el sistema de producción se caracteriza por utilizar como base forrajera las pasturas naturales, y gran abundancia de agua generada en sus numerosos ríos y arroyos, asegurando el bienestar de los animales y la calidad de carne. Esas pasturas naturales presentan en el período estival, una reconocida deficiencia proteínica respecto a los requerimientos de ovinos y bovinos que las consumen. Esto ha conducido a evaluar la respuesta productiva de los animales a la suplementación proteínica.

Hoy día no solo es de gran importancia mantener la producción en cantidad y en calidad, sino también darle un gran énfasis en la preservación de los recursos naturales y el medio ambiente. Es sabido que el rumiante como tal contribuye a dicha contaminación ya sea por sus excreciones como sus grandes producciones de gas del rumen y su eructación, siendo las emisiones de metano de particular importancia.

El proceso de fermentación microbiana de los componentes de la pared celular que se llevan a cabo en el rumen e intestino grueso, van asociados a la producción de gases de efecto invernadero y una pérdida de energía por parte del animal, dicha pérdida es entre el 4% y el 12% de EB consumida (Johnson y Johnson, 1995). Uno de estos gases es el metano y por este motivo es que se considera que los rumiantes son responsables del 25% del total de las emisiones antropogénicas (Soliva y Hess, 2007). Dado que no se han encontrado antecedentes que vinculen la combinación de forraje de campo natural con harina de girasol, soja o pescado en la producción de metano, se propuso realizar un experimento para evaluar dicho efecto.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo general

Evaluar el potencial metanogénico de un campo nativo y su combinación con suplementos proteínicos.

1.1.2. Objetivos específicos

Caracterizar el aporte proteínico de un campo natural.

Cuantificar la producción de metano *in vitro* del campo natural y su combinación en distintas proporciones con harina de girasol, harina de soja o harina de pescado.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. EL RUBRO OVINO

Uruguay se ubica entre los primeros 10 países exportadores de carne en el mercado ovino mundial, con el 3% del volumen mundial exportado. Los principales países exportadores son, Nueva Zelanda (35%), Australia (26%), Reino Unido (11%) e Irlanda (5%). A nivel de América Latina, Uruguay es el primer país exportador con aproximadamente 36 % del volumen y 42 % del valor exportado (FAO, 2011).

En el ejercicio 2013-2014, el país exportó un total de 17.283 toneladas de peso embarque, lo que generó un total de 9.347.000 dólares. Los valores mencionados al ser comparados con el ejercicio 2012-2013 muestran un decrecimiento en exportación de producto, pero, se observa un crecimiento en ingreso de la divisa dado por el aumento del valor monetario del mismo (INAC, 2014).

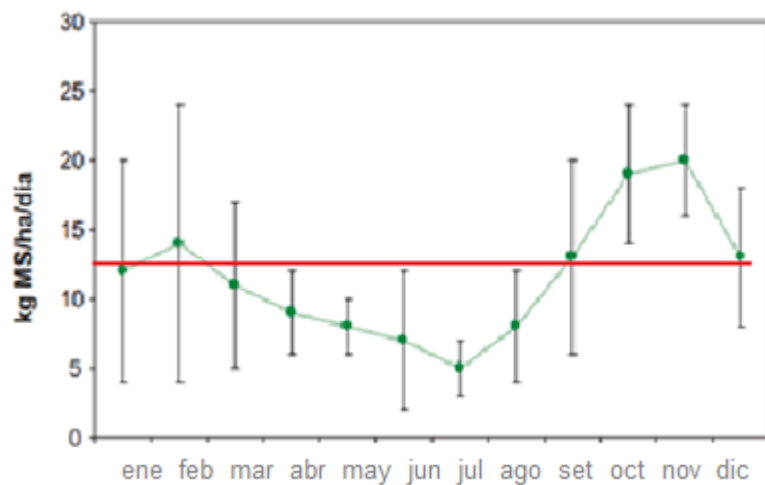
Se ven perspectivas muy alentadoras para la carne de calidad uruguaya, aunque se tienen deberes para hacer en la búsqueda de la consolidación de una corriente exportadora de carne a EEUU, Canadá y México y ampliar la cuota asignada en la Unión Europea (Recalde, 2013).

A pesar de las buenas perspectivas y los buenos precios de la carne ovina, existen una serie de factores que están influyendo negativamente en el mantenimiento o crecimiento del stock uruguayo. En el año 1991, se registró un máximo histórico de 26 millones de cabezas de ovinos, para ubicarse en 2002 en 10.9 millones. Desde 2002 hasta el cierre del año agrícola 2012-2013 el stock osciló entre 8 y 11 millones de cabezas ovinas, para finalmente cerrar en el ejercicio 2013-2014 en 7.4 millones de cabezas (INAC, 2014). Esta disminución se está dando debido a que el rubro ha sido desplazado por el crecimiento de la forestación, la agricultura y también la lechería y ganadería para carne vacuna; esta tendencia es muy clara en la última década (Recalde, 2013).

La producción ovina en el Uruguay se concentra en su mayor proporción en la zona del norte del país (53%), concentrándose la restante en las regiones del este (22%) y del centro (cristalino céntrico, 17%), MGAP. DIEA (2013). Este cristalino céntrico ocupa unos 2.5 millones de hectáreas de suelos formados directo sobre el cristalino más o menos alterado, o a partir de sedimentos cuaternarios (Lodolitas) depositados sobre el basamento (Risso et al., 2001), siendo la principal formación (46.5%) unidad san gabriel-guaycurú (1.164.560 has, MGAP.DIEA, s.f.).

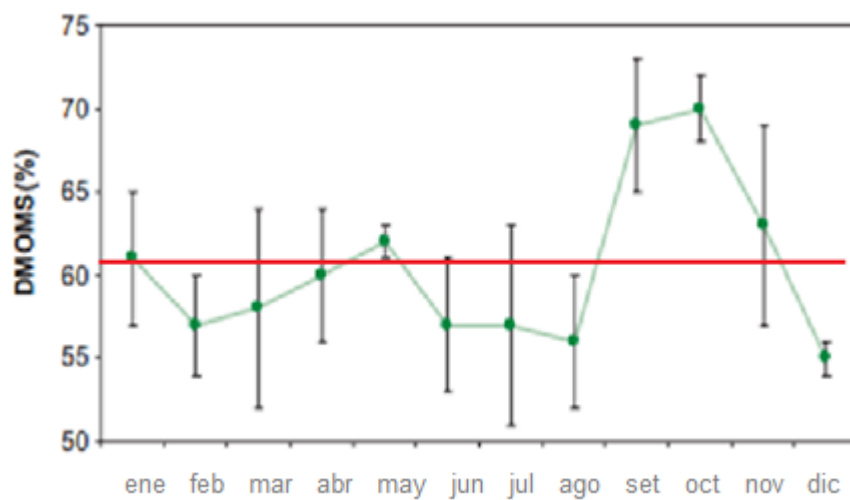
En la región del cristalino, en todas las regiones la producción ovina se realiza principalmente sobre campo natural siendo su forraje la principal fuente de nutrientes para los animales. La producción de forraje de estos campos es de baja a media (3.1 a 4.1 tt. MS/ha/año), con una importante variación anual (CV 29.8%) y entre estaciones, con un mínimo en el invierno (Risso y Morón 1990, Formoso 2005). En el Centro de Investigación y Experimentación Dr. Alberto Gallinal (CIEDAG), se ha observado para el período 1984 – 2001 se ha observado una producción promedio de 4218 kg MS/ha/año, con un máximo y un mínimo de 6061 y 2314 kg MS/ha/ año respectivamente (Formoso, 2005). Para el mismo período se registra promediamente una variación mensual importante, observándose un máximo de producción en primavera (octubre-noviembre) y un mínimo en los meses invernales (junio – agosto), lo que es explicado por las especies que componen el campo natural que son la gran mayoría de producción estival (figura 1). A su vez se puede observar una variación importante en la producción diaria de materia seca en los meses de mayores temperaturas (enero-febrero) y menor variación en los meses más fríos (mayo-junio-julio) (Formoso, 2005). En estos campos, se registró un total de 285 especies, de las cuales las principales especies pertenecen a la familia *Poaceas* (32%) y a la familia *Asteráceas* (20%). Las especies de mayor ocurrencia son *Paspalum notatum*, *Alophia lahue*, *Bothriochloa laguroides*, *Dichondra seríceas* y *Briza minor* (Formoso, 2005). Por último los géneros más importantes en números de especies son *Stipa*, *Aristida*, *Baccharis* y *Paspalum* (Formoso, 2005). En general, las gramíneas que componen la flora de este tipo de campo tienen un alto contenido de fibra lo cual se evidencia en el valor promedio de la digestibilidad (60.4%) de la materia orgánica (DMO). A lo largo del año, no existe una variación importante en el período enero-agosto con los valores más bajos de DMO (58-63 %) que responderían a la acumulación de restos secos y encañados de verano y por la ausencia de especies productivas invernales. En los meses setiembre-octubre se observa un aumento considerable (70-75%) de la digestibilidad del forraje, que se asocia al crecimiento de especies productivas y que las mismas se encuentran en etapas vegetativas con baja fibra (figura 2). A su vez, las variaciones mensuales que se observan en la figura son variables, en los meses de febrero y setiembre se observa gran variación mientras que en los meses de mayo-octubre-diciembre no se ve. El contenido de proteína cruda, marca un promedio de 9.3% (figura 3), observándose dos períodos de incremento, los mismos son marzo-abril y setiembre-octubre, en el primer período el incremento se asocia a la presencia de determinadas especies (dicotiledóneas) que comienzan a brotar a medida que disminuye la competencia de las especies estivales, en tanto el incremento primaveral se asocia al rebrote de las gramíneas (Formoso, 2005). Respecto a la variación en el mes se observan meses de gran variación como ser febrero, abril y noviembre, frente a meses de variaciones bajas mayo, junio y julio.

Figura 1. Producción mensual de materia seca en el período 1984-2001 en campos de cristalino.



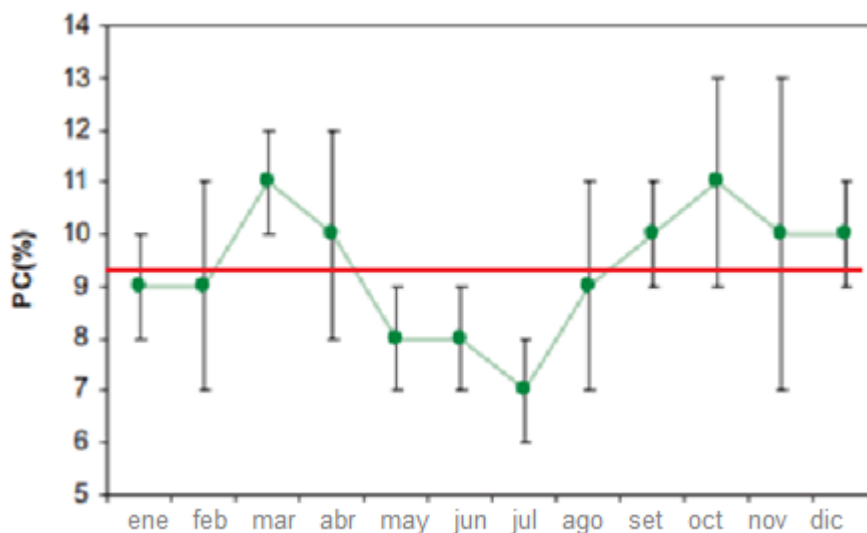
Fuente: adaptado de Formoso (2005).

Figura 2. Evolución mensual de la digestibilidad de la materia orgánica en la materia seca (DMOMS) en el período 1984-2001 en campos de cristalino.



Fuente: adaptado de Formoso (2005).

Figura 3. Evolución mensual del contenido de proteína cruda en el período 1984-2001 en campos de cristalino.



Fuente: adaptado de Formoso (2005).

2.2. REQUERIMIENTOS DE LOS CORDEROS

La cantidad y la diversidad de nutrientes requeridos por los tejidos de los animales son función del estado de crecimiento del mismo, su historia nutricional y su capacidad genética para crecer. La metabolización de los nutrientes absorbidos será modificada por el suministro de dichos nutrientes en relación a los requerimientos de los tejidos en ese momento. La mayor demanda para los tejidos del animal en crecimiento es de energía y aminoácidos, necesarios para impulsar la síntesis de proteína. En la medida que los corderos se desarrollan, la cantidad de proteína por kg de peso ganado disminuye, mientras que la proporción de lípidos se incrementa, por lo cual, cada kg de peso vivo sucesivo contiene más energía que el anterior (Jones et al., 2004).

Los requerimientos de energía, incluyen las necesidades para el mantenimiento del animal y para el depósito de proteína y/o grasa. Los requerimientos energéticos para el crecimiento, reflejan el ritmo y composición del mismo, siendo mayores en la medida que se incrementan las ganancias (Byers, 1989).

Los rumiantes pueden presentar una combinación de requerimientos proteínicos, para nutrir los microorganismos y para obtener un suministro adecuado de aminoácidos esenciales digestibles en el intestino (Church, 1989).

A continuación en el cuadro 1 se presentan los requerimientos de energía y proteína de corderos en crecimiento (NRC, 2007).

Cuadro 1. Requerimientos diarios de energía metabolizable, proteína cruda y proteína degradable en el rumen de corderos en crecimiento.

		Requerimientos				
PV (Kg)	GMD (g/d)	CMS (Kg)	EM (Mcal/d)	EN (Mcal/d)	PC (g/d)	PDR (g/d)
Maduración tardía						
20	100	0,57	1,09	0,21	69	39
30	200	1,05	2,02	0,42	125	73
Maduración temprana						
20	100	0,63	1,51	0,21	64	55
30	200	1,2	2,86	0,91	114	103

Fuente: NRC (2007).

Los requerimientos de energía metabolizable (EM), proteína cruda (PC) y proteína degradable en el rumen (PDR) de corderos de 20 y 30 kg de peso vivo con ganancias diarias de 100 o 200 gr/día indican que la dieta de corderos en crecimiento deberían contener entre 1.91 a 2.40 mcal de EM/kg de MS, de 9 a 12 % de PC (BS) y de 6.1 a 8.7 % de PDR (BS) según su genética y ganancia de peso diaria. Barbosa y Machado (2012) observaron que el forraje de campo natural en el CIEDAG, aportaría 2.27 mcal de EM/kg de MS, 9% de PC (BS) y 2.86 % de PDR (BS). Comparando estos valores con los requerimientos, esa fuente de nutrientes podría ser limitante en orden decreciente en el aporte de PDR, PC y EM. Las deficiencias proteínicas podrían ser mayor si se considera lo reportado por Piaggio (2009), quien informa dos fases de necesidades en proteína cruda durante el engorde de corderos. Una primera fase de mayores requerimientos (16.5 % PC), entre los 20 y 35 kg PV; y una segunda fase a partir de los 35 kg PV (13.8 % PC).

Por lo antes expuesto, se han realizado experimentos a nivel nacional con el objetivo de evaluar los efectos de la suplementación proteínica en la performance de corderos pastoreando campo natural. Mieres (1997) indica que el agregado de suplemento proteínico puede resultar en cambios positivos en el consumo y la digestibilidad del forraje, que responden básicamente a:

- Corrección de una deficiencia de nitrógeno ruminal, que lleva a una mayor tasa de digestión e incrementar el consumo de forraje y energía.

- Incremento en el flujo de nitrógeno no amoniacal al duodeno, ya sea proteína microbiana o proteína alimentaria no degradable en el rumen. Esta mejora en el estatus nitrogenado podría estimular el consumo y la eficiencia en la utilización de la energía.

- Corrección de la deficiencia, o desbalance, de algún aminoácido a nivel de tejido.

Piaggio et al. (2012), Marichal (2013), Piaggio (2013) observaron que la suplementación proteínica generó mayores ganancias de peso posdestete en corderos pastoreando campo natural y que esos efectos variaban según la cantidad de suplemento consumido y el origen del suplemento (cuadro 2). En dos experimentos independientes, los autores mostraron que niveles crecientes de harina de soja resultaron en aumentos de hasta 229 % en la ganancia diaria respecto a los animales no suplementados. Estas respuestas se evidencian en la figura 4 donde se aprecia que el gran salto en respuesta se da en el primer nivel de suplementación, de 100 o 150 g de harina de soja por cordero por día (Piaggio et al., 2012). También observaron que la respuesta de los corderos variaba con el tipo de suplemento suministrado. Así, la performance postdestete de los corderos fue menor cuando estos eran suplementados con harina de girasol que con harina de soja cuando ambos suplementos se suministraban en cantidades isoproteínicas (200 o 270 g/cordero/día, respectivamente). Esta diferencia en el comportamiento de los corderos según las características de los alimentos suministrados se evidencia claramente en un experimento que evaluó distintas estrategias de suplementación. Dichas estrategias consistieron en el suministro de cantidades isoproteínicas de un bloque proteínico o harina de soja y dos estrategias de pastoreo complementario (3 h diarias o 1 día cada tres) de un campo natural mejorado con *Lotus uliginosus*.

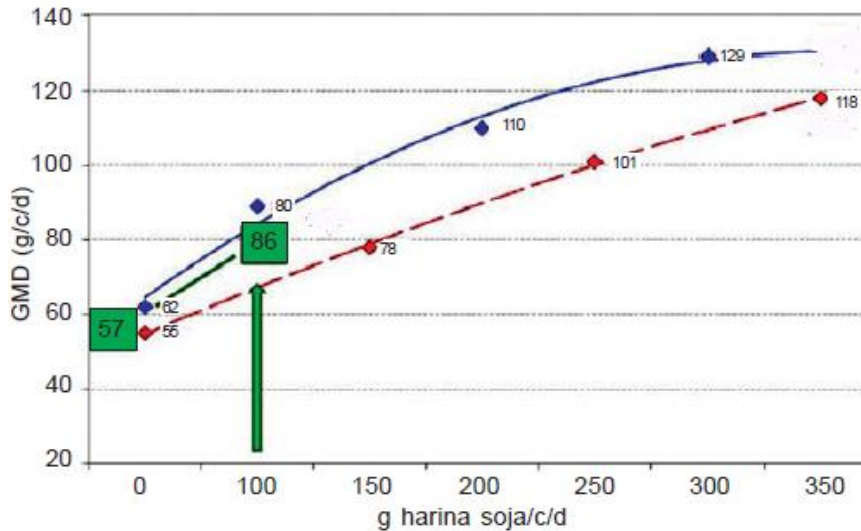
Cuadro 2. Respuesta en comportamiento productivo postdeste de corderos de entre 20 y 30 kg de peso vivo pastoreando campo natural suplementados con distintos niveles y tipos de alimentos proteínicos.

Biografía	Período de estudio	Forraje	PC del CN	Suplemento	Tratamiento	GMD (gr/d)
Piaggio et al. (2012)	17/01 - 27/04	Campo natural SUL	8,8	Harina de Soja	Control (CN)	56 c
					150 gr/c/d	78 b
					250 gr/c/d	101 b
					350 gr/c/d	127 a
Marichal (2013)	14/01 - 28/04	Campo natural SUL		Harina de Soja - Harina de Girasol	Control (CN)	58 d
					100 gr HS/c/d	104 bc
					200 gr HS/c/d	112 ab
					300 gr HS/c/d	133 a
Piaggio (2013)	26/01 - 28/04	Campo natural SUL	7,25	Block Proteínico (BP) Harina de Soja CN mejorado*	Control (CN)	46 b
					PB	51 b
					3hr/d	71 ab
					(SP 1)	87 a
					mejorado* 1 dia cada 3 (SP 2)	62 ab

GMD: Ganacia media diaria

*Campo natural mejorado con *Lotus makú*

Figura 4. Respuesta a niveles crecientes de suplementación con harina de soja en la recría de corderos sobre campo natural en verano.



Fuente: adaptado de Piaggio et al. (2012)

En los experimentos presentados, para corderos de 20 kg y con ganancias diarias de 100 gr, la ingesta de PC obtenida del forraje del campo natural habría sido insuficiente y podría haber limitado el crecimiento de los mismos dado que los valores de PC (7.5 +/- 0.8 % PC) de estos pastos fueron más bajos que los requeridos por los corderos (12% CP; NRC, 2007). La suplementación con cantidades isoproteínicas de alimentos evidenciaron respuestas diferentes que responderían a las formas en que se encuentra el N en esos alimentos (N proteínico vs. no proteínico, estructuras proteínicas diferentes) lo cual habría implicado diferencias en la nutrición proteínica a nivel ruminal e intestinal. Así, en el bloque proteínico la fuente principal de N fue urea mientras que en la harina de soja, los antecedentes (Jarrige et al. 1995, Borucki et al. 2007) indicaban que 90% del N se encontraba integrando proteínas siendo 42% de esta proteína no degradable en el rumen. El pastoreo controlado de campo mejorado con *Lotus uliginosus* habría resultado en un mayor consumo de PC ya que esa leguminosa presentó 29% de PC así como un aporte de proteína no degradable de 43 a 62 % (Quirama et al., 2011). Esto significa que ambos alimentos (harina de soja y *Lotus uliginosus*) habrían complementado el aporte de proteína microbiana con proteína no degradable en rumen contribuyendo a satisfacer los requerimientos de los corderos dado que en el postdestete se recomienda que 33-37 % del N requerido debería ser suministrado en forma de proteína no degradable (NRC, 2007).

2.3. SUPLEMENTOS PROTEÍNICOS

En alimentación animal, Church (1989) define suplemento proteínico como aquellos alimentos no forrajes que contienen más del 20% de proteína cruda. Existen diversos orígenes de fuentes de proteína tales como vegetales, animales, marinos, microbianos y nitrógeno no proteínico, como la urea. Entre los suplementos proteínicos de origen vegetal se destacan las semillas de leguminosas y las harinas de semillas de oleaginosas, subproducto de la industria aceitera.

Entre las fuentes proteínicas comerciales más empleadas se encuentran los subproductos de la industria aceitera, harinas de semillas de oleaginosas. Se caracterizan por presentar un elevado contenido de proteína cruda (la mayoría superior al 40%) y un porcentaje elevado de nitrógeno presente como proteína verdadera (aproximadamente 90%) la cual es altamente digestible y de valor biológico moderado a bueno (Church, 1989).

En Uruguay, la harina de soja es uno de los suplementos proteínicos de mayor uso en la alimentación animal. Este subproducto se obtiene de la extracción del aceite por presión y solvente (Marichal, 2013). Presenta alto contenido de lisina, y es relativamente deficitaria en metionina y triptófano (Church 1989, Bauzá 2012). Las harinas de soja se clasifican según su contenido de proteína cruda en base fresca, denominándose por ejemplo, harina de soja 42 a la que presenta como mínimo 42.0%PC (Marichal, 2013). Además este alimento se destaca por su alta preferencia por los animales, por ser muy palatable, lo que facilita el adiestramiento de los mismos. Su proteína tiene una degradabilidad que puede variar entre el 63 y el 85% (cuadro 3) y una digestibilidad intestinal de la proteína no degradable en rumiantes de 90%. En cuanto a la degradabilidad del nitrógeno según el NRC (2007) los valores estimados para sus parámetros fueron $a=22$; $b=77$ y $c=94$. La degradabilidad total del N es de 0.60 considerando una tasa de pasaje de 0.06 por hora. Para la proteína no degradable en rumen la digestibilidad es de 0.85. El valor energético también es elevado, resultando en excelentes desempeños productivos cuando es utilizado por diferentes especies animales (Church 1989, Bauzá 2012). Por las características anteriormente mencionadas, se considera a este alimento la mejor fuente de proteína vegetal disponible, siendo usada incluso como fuente de proteína estándar en la evaluación de muchas raciones utilizadas (Church, 1989). Un suplemento proteínico disponible de uso común en Uruguay es la harina de girasol.

Otro suplemento proteínico de uso en alimentación en el país, es la harina de girasol. Este subproducto de la industria aceitera se obtiene, al igual que la harina de soja, por extracción del aceite por presión y solvente. Es un alimento con un bajo contenido de factores antinutricionales. La principal

limitación para el uso de girasol corresponde a su alto contenido de FDNmo (34,8%) y en lignina (5,5%). Para la harina suelen establecerse categorías de acuerdo con el contenido en proteína: 28 (harina integral), 30, 32, 34 y 36% (Blas et al., 2010). La fracción proteínica tiene una elevada utilización digestiva en todas las especies al no encontrarse ligada a la pared celular, en rumiantes tiene una digestibilidad de 88% aunque los coeficientes de digestibilidad de proteína y aminoácidos tienden a disminuir con el contenido en fibra de la harina. La degradabilidad de la proteína en el rumen es generalmente elevada encontrándose entre el rango de (78%), dependiendo del contenido en fibra de la harina (Blas et al., 2010). Esa diferencia de degradabilidad de la proteína de ambos suplementos puede alterar ciertos parámetros a nivel ruminal. Para este suplemento los parámetros de degradabilidad del nitrógeno según el NRC (2007) fueron a=42; b=53; c=29. Schingoethe et al. (1976) compararon en vacas en lactación la producción y composición de la leche, producción de AGV (ácidos grasos volátiles) y pH ruminal con dos dietas isoproteínicas donde el 60% del contenido de proteína cruda eran provenientes de harina de soja (50% PC) o de harina de girasol (37% PC). Los autores no observaron diferencias en producción y composición de la leche, sin embargo la producción total de AGV en el licor ruminal (LR) fue ligeramente más alta con HG que con HS, mientras que el pH en el licor ruminal tuvo un comportamiento inverso ($p < 0.05$) (6.32 y 6.78, respectivamente). Una explicación de este comportamiento podría deberse a una mayor concentración de AGV suplementando con HG. En este mismo estudio se halló que la concentración de amonio ($N-NH_3$), fue ligeramente mayor en HG que en HS pero esta diferencia no fue significativa. Esto podría esperarse ya que la proteína de HG es más soluble que la proteína de HS bajo condiciones ruminales.

Los rumiantes jóvenes en rápido crecimiento requieren un suministro de algunos aminoácidos (como lisina, metionina) que complemente los provistos por los microorganismos, por lo cual es importante buscar fuentes de proteína de alto valor biológico que escapen a la degradación ruminal para ser procesadas directamente en el abomaso e intestino delgado. Una fuente de proteína no degradable en el rumen es la harina de pescado. Este es un producto obtenido por molturación y desecación de pescados enteros, de partes de estos o residuos de la industria. La harina de pescado, proporciona una fuente concentrada de proteína de alta calidad y una grasa rica en ácidos grasos insaturados. El componente nutritivo más valioso de la harina de pescado es la proteína. La harina de pescado se considera una buena fuente de proteína, lisina y metionina by-pass en rumiantes, aunque por su baja palatabilidad (si no está bien procesada) su uso debe limitarse. Tiene una concentración proteínica del 70% y una degradabilidad que varía entre 40 y 66%, siendo estos valores altamente variable ($CV=26\%$), dependiendo del grado de deterioro durante el almacenamiento (Blas et al., 2010), y presenta

valores de degradabilidad del N de a=23; b=72; c=1.4 (NRC, 2007). Como resultado se incrementa la productividad aunque por su baja palatabilidad debe limitarse su uso. Además la harina de pescado aporta elevadas cantidades de fósforo (2%) altamente disponible, micro minerales (Se, Zn, Cu, Fe) y vitaminas del grupo B (Blas et al., 2010). También es una fuente de energía concentrada; con un 70% a 80% del producto en forma de proteína y grasa digerible, su contenido de energía es mayor que muchas otras fuentes de proteínas (3280 Kcal/Kg) (FIS, s.f.). En Uruguay hay limitaciones para su uso en rumiantes por riesgo a la encefalopatía espongiiforme bovina (decreto 139/96) y se puede utilizar en otras especies que no sean rumiantes, sólo si proviene de plantas donde no se fabriquen raciones para rumiantes. Los parámetros más importantes a determinar en el control de calidad son los relacionados a la frescura de la materia prima, la calidad de su procesado y sus condiciones de almacenamiento ya que se corre un alto riesgo de que ocurra deterioro del material por actividad bacteriana, enzimática o enranciamiento.

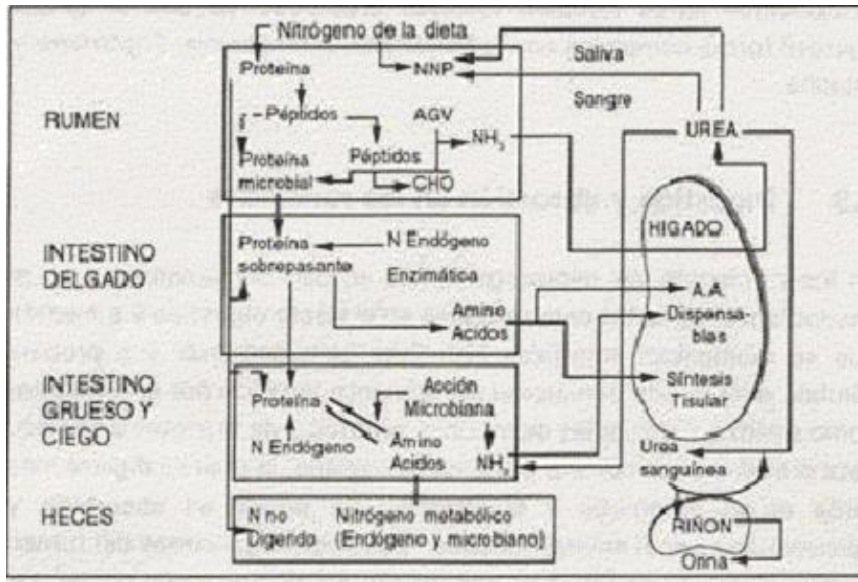
Cuadro 3. Antecedentes de la caracterización proteínica y digestibilidad in vitro de la materia orgánica de la harina de soja, la harina de girasol y la harina de pescado.

Suplemento	MS	PC	DE	a	b	KD	DivMO	Fuente
HS	87,8	52	63	13	85	8,5	92	Sauvant et al. (2004)
		59	85	22	77	9,4		NRC (2007)
	88	53	65	14	85	9		Blas et al. (2007)
HG	88,7	37	77	33	60	16	62	Sauvant et al. (2004)
		28	84	42	53	29		NRC (2007)
	89,7	41	78	26	68	19,5		Blas et al. (2007)
HP		66						Sauvant et al. (2004)
		68	66	23	72	1,4		NRC (2007)
	92,8	71	40					Blas et al. (2007)

2.4. DIGESTIÓN Y METABOLISMO PROTEÍNICO

En los alimentos el nitrógeno puede estar contenido en proteínas o en compuestos no proteínicos (nitrógeno no proteínico). En los animales rumiantes, luego de que ese nitrógeno, ingresa al rumen, comienza una serie de procesos en los cuales los protagonistas son los microorganismos del rumen. Los mismos mediante la segregación de proteasas cumplen el primer paso de degradación proteínica y transforman dicha proteína en péptidos de menor tamaño, los cuales pueden ser catabolizados hasta aminoácidos (aa's.) libres y estos hasta amoníaco, ácidos grasos y dióxido de carbono (CO₂) (Rodríguez et al., 2007). Estos productos son utilizados por los microorganismos para la síntesis de proteínas y demás componentes de las células microbianas como pueden ser los componentes nitrogenados de la pared celular y los ácidos nucleicos, la magnitud de este proceso es dependiente de la energía disponible para realizarlos, de lo contrario los aminoácidos y péptidos pueden ser degradados totalmente usándose el esqueleto carbonado como fuente de energía y el nitrógeno convertido en nitrógeno amoniacal. Si la energía es una limitante, parte del amoníaco que no puede ser fijado por los microorganismos del rumen, es absorbido y llevado por sangre hasta el hígado, donde en el mismo es transformado a urea, de la cual la mayor parte no es utilizada por el animal y es excretada por la orina (Rodríguez et al., 2007). Hay una fracción de dicha urea que puede ser liberada directamente en el rumen o ingresar al rumen por la saliva, y volver a utilizarse para la síntesis de proteína microbiana (Rodríguez et al., 2007). La proteína microbiana generada pasa hacia el intestino delgado con la fracción de proteína de alimento que no fue degradada en el rumen, donde se liberan los aminoácidos, se absorben y son aprovechados por el animal (figura 5).

Figura 5. Metabolismo proteínico.



Fuente: adaptado de UNAD (s.f.).

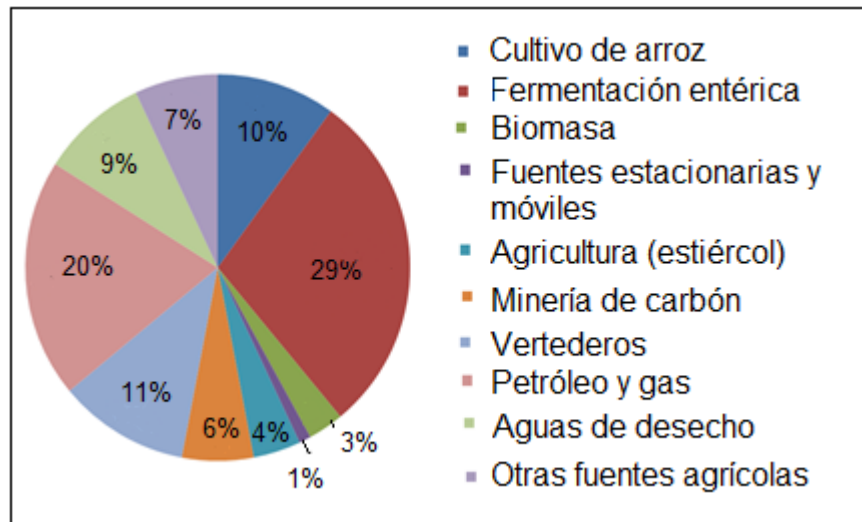
2.5 GAS METANO

Uno de los problemas que actualmente enfrenta nuestro planeta es el calentamiento global, debido al aumento del efecto invernadero causado por la acumulación de gases que atrapan el calor en la atmósfera (Soliva y Hess, 2007). El efecto invernadero es causado por gases denominados gases de efecto invernadero (GEI) de los cuales el metano (CH₄), es considerado como el segundo en importancia después del dióxido de carbono (CO₂) (Van Aardenne et al., 2001). A su vez la contribución de cada molécula de metano en el efecto invernadero es 21 veces superior a la de cada molécula de CO₂ (Ruth, 2009).

El CH₄ se genera como resultado de actividades humanas (origen antropogénico) tales como la producción y transporte de carbón, gas natural y petróleo, en la ganadería y otras prácticas agrícolas, durante la descomposición del desperdicio orgánico en los vertederos municipales, y en ciertos sistemas de tratamientos de aguas de desecho (GMI, 2010). Se estimó que las emisiones antropogénicas de metano en 2010 fueron equivalentes a 6.875 millones de toneladas métricas. Aproximadamente el 50 % de estas emisiones provinieron de cinco fuentes, las mismas son: agricultura, minas de carbón, vertederos, sistemas de petróleo y gas natural y aguas de desecho. Pero sin duda la

máxima producción de dicho gas (29%) se origina de la fermentación entérica de la ganadería mundial (figura 6) (GMI, 2010). Se proyecta que las emisiones de metano aumentarán 15% para el 2020, estimándose que las emisiones por el sector ganadero-agrícola seguirían constantes en este período (GMI, 2010).

Figura 6. Emisiones antropogénicas de metano.

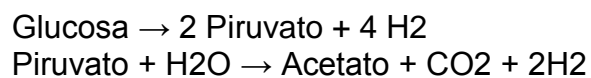


Fuente: adaptado de GMI (2010).

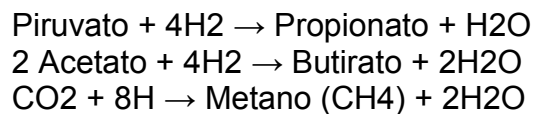
La emisión de metano por parte de los rumiantes, además de generar un impacto ambiental, representa una pérdida económica para la industria ganadera dado que la energía que se utiliza en la síntesis de metano podría ser canalizada para mejorar la productividad de los animales (Johnson et al., 1995). Se ha estimado que los rumiantes pueden producir entre 250 y 500 litros de metano por día y que dicha producción representa una pérdida de 2 al 12% de la ingesta de los rumiantes de la energía bruta, dependiendo del nivel de consumo de alimento, la composición de la dieta y la digestibilidad aparente de la energía alimentaria (Johnson y Johnson 1995, Soliva y Hess 2007). El metano es, la principal forma de eliminación de hidrógeno generado como resultado de un complejo sistema simbiótico compuesto por tres grupos microbiales: bacterias fermentativas, bacterias acetogénicas y bacterias metanogénicas (Van Soest 1982). Las bacterias metanogénicas pertenecen al dominio *Archaea*, y comprende dos reinos, *Euryarchaeota* (metanogénicos, halófilos extremos y algunos hipertermófilos) y *Crenarchaeota* (Cardenas y Lemus, 2012). Los carbohidratos ingeridos por los rumiantes son fermentados por los microorganismos anaerobios del rumen produciendo ácidos grasos volátiles (AGVs), principalmente acetato, propionato y butirato, dióxido de

carbono (CO₂) e hidrógeno (H₂). Los AGVs representan la principal fuente energética para el rumiante y son ampliamente absorbidos a través de las paredes del rumen (Moss y Givens 2002, Relling y Mattioli 2003, Janssen 2010). El H₂ producido durante la fermentación debe ser removida para mantener la eficiencia energética de la fermentación. El H₂ es empleado como fuente de energía por las *Archaea* metanogénicas, siendo esta vía la principal forma de eliminación de H₂ (Moss et al. 2000, Beauchemin et al. 2008, Janssen 2010). La estequiometría de las principales rutas de eliminación de H₂:

Reacciones productoras de H₂



Reacciones que utilizan de H₂



La cantidad de metano que se produce como resultado de la fermentación depende de diversos factores, tales como: la cantidad y características de los carbohidratos ingeridos, la disponibilidad de otros nutrientes (nitrógeno, aminoácidos, ácidos grasos insaturados), el grado de procesamiento del alimento, compuestos como ionóforos, etc., que inciden en la actividad de los microorganismos y (Ishler et al., 1996). Los dos principales factores responsables de las variaciones en la producción de metano son la cantidad de carbohidratos fermentados así como la relación entre los AGV productos de esa fermentación. La cantidad de carbohidratos fermentados en el retículo-rumen está asociada a interacciones dieta-animal, que afectan el balance entre las tasas de fermentación de estos carbohidratos y la tasa de pasaje y por lo tanto a la población microbiana. El tipo de carbohidrato fermentado afecta la producción de metano a través de la relación de ácidos grasos volátiles producidos lo cual define la producción de H₂, impactando en el pH ruminal lo que a su vez incide en la población ruminal y subsecuente producción de metano (Johnson y Johnson 1995, Carmona 2005). Por estas razones, la fermentación de los carbohidratos fibrosos que producen una alta relación de acetato: propionato, está asociada a una alta producción de metano. En contraposición, dietas altas con elevados contenidos de almidón que favorecen la producción de propionato, están asociadas con una disminución de la relación metano: materia orgánica fermentada en el rumen (Moss et al., 2000). En condiciones de pastoreo de forrajes con alto contenido de pared celular y un contenido de proteína cruda que limita la fermentación de la fibra, la

suplementación proteínica constituye una estrategia para incrementar el aprovechamiento de la energía potencial de los pastos. Este incremento en la fermentación de la fibra podría ir acompañado por un incremento en la producción de metano en el rumen.

2.6. HIPÓTESIS

El campo natural presenta una baja PC y a su vez una baja degradabilidad de la misma.

La combinación del campo natural con proporciones variables de suplementos proteínicos afectará la fermentación de la materia orgánica y la producción de metano in vitro.

La producción de metano variará según las características de las proteínas de los suplementos usados.

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 febrero de 2014 con el muestreo del campo nativo finalizándose la fase experimental en octubre. Todos los procedimientos que implicaron el uso de animales, fueron realizados de acuerdo a las normas del comité de ética de la Universidad de la República.

3.2. TRATAMIENTOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Se midió y comparó la fermentescibilidad de la materia orgánica y la producción de metano *in vitro* de forraje de campo natural en combinación con niveles crecientes de tres suplementos proteínicos.

Se evaluaron trece tratamientos en un diseño completamente aleatorizado con un arreglo factorial de los tratamientos (3 suplementos proteínicos x 4 niveles de proteína cruda) con tres repeticiones por tratamiento. Se realizaron mezclas del forraje con tres suplementos proteínicos (harina de soja, harina de girasol y harina de pescado) combinándolos en distintas proporciones de modo de obtener mezclas con 12, 14, 16 y 18 por ciento de proteína cruda en base seca. Las combinaciones del campo natural con los diferentes suplementos proteínicos definió el siguiente esquema para los distintos tratamientos.

T1: campo natural sin agregado de suplemento proteínico.

T2: campo natural con agregado de harina de soja obteniendo una mezcla con 12% de proteína en base seca.

T3: campo natural con agregado de harina de soja obteniendo una mezcla con 14% de proteína en base seca.

T4: campo natural con agregado de harina de soja obteniendo una mezcla con 16% de proteína en base seca.

T5: campo natural con agregado de harina de soja obteniendo una mezcla con 18% de proteína en base seca.

T6: campo natural con agregado de harina de girasol obteniendo una mezcla con 12% de proteína en base seca.

T7: campo natural con agregado de harina de girasol obteniendo una mezcla con 14% de proteína en base seca.

T8: campo natural con agregado de harina de girasol obteniendo una mezcla con 16% de proteína en base seca.

T9: campo natural con agregado de harina de girasol obteniendo una mezcla con 18% de proteína en base seca.

T10: campo natural con agregado de harina de pescado obteniendo una mezcla con 12% de proteína en base seca.

T11: campo natural con agregado de harina de pescado obteniendo una mezcla con 14% de proteína en base seca.

T12: campo natural con agregado de harina de pescado obteniendo una mezcla con 16% de proteína en base seca.

T13: campo natural con agregado de harina de pescado obteniendo una mezcla con 18% de proteína en base seca.

3.3. ALIMENTOS

3.3.1 Campo natural: localización y muestreo

Las muestras de campo natural utilizadas como base para el presente estudio fueron colectadas en el centro de investigación y experimentación “Dr. Alejandro Gallinal” (CIEDAG), perteneciente al Secretariado Uruguayo de la Lana y ubicado en Cerro Colorado, Florida en el km 140 de la ruta 7(33° 52´ latitud Sur, 55° 34´ longitud Oeste).

El padrón en el cual se obtuvieron las muestras para realizar el ensayo (padrón 10558, Florida) pertenece al grupo coneat de suelos 2.11^a, 2.13 y 5.4. Dichos suelos pertenecen a la unidad San Gabriel-Guaycurú en la carta a escala 1:1.000.000; se desarrollaron de materiales cristalinos, y en parte, de sedimentos limo-arcillosos poco potentes y discontinuos que lo recubren. Son moderadamente profundos y superficiales, de texturas francas, fertilidad media, a veces baja, moderadamente a bien drenados. Se encuentran también suelos de color negro o pardo muy oscuro, textura franca a franco arcillosa, fertilidad alta y moderadamente bien drenados.

El muestreo del campo natural se realizó en el mes de febrero de 2014, período que fue marcado por altos valores de precipitaciones; los cuales superaron ampliamente los promedios registrados en los años anteriores.

Como se puede observar en el siguiente cuadro, el promedio de las precipitaciones registradas en el CIEDAG en los meses de enero y febrero de 2014 fueron superiores que en los mismos meses del período 1986-2014.

Cuadro 6. Precipitaciones promedio registradas en el CIEDAG en los períodos 1986-2010, 2011 – 2014 y en el año 2014.

Precipitaciones (mm)	1986-2010	2011-2014	2014
enero	71	105	255
febrero	194	174	223

Se muestrearon tres potreros de campo natural (potrero 3 = 3.9 has, potrero 4 = 4.2 has y colgado = 9.5 has), cortándose el forraje a ras del suelo con tijera manual. Se recorrieron los potreros en zigzag y cada 10 pasos se recolectó el forraje modo de tener una muestra representativa. Luego de cortado el forraje, se separaron los restos secos del material verde, conservándose este último para evaluación. El material verde fue secado a 60°C durante 48 h, procesado en un molino Wiley con una malla de 1 mm y almacenado para su posterior análisis.

3.3.2 Suplementos proteínicos

Se utilizaron dos suplementos proteínicos de origen vegetal (harina de soja y harina de girasol) y uno de origen animal (harina de pescado). La harina de girasol y la harina de soja fueron obtenidas en la empresa Cousa como pellets y la harina de pescado fue adquirida en la empresa Fripur. Las harinas de soja y de girasol, fueron procesadas en el molino Wiley (malla 1 mm) mientras que a la harina de pescado, no fue necesario hacerle ningún tratamiento ya se presentó en forma pulverulenta.

3.4. ANÁLISIS QUÍMICOS

Tanto para el caso de los suplementos proteínicos, para las pasturas y como para las mezclas de suplemento con forraje 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, harina de soja y de girasol y se determinó según la técnica descrita Van Soest et al. (1991). En la solución detergente neutro se omitió el sulfito de sodio y se incluyó α -amilasa termoestable. Los resultados de FDNmo y FDAmo se expresaron en base materia orgánica (FDNmo y FDAmo).

3.5. CINÉTICA DE DEGRADACIÓN DEL N Y DIGESTIBILIDAD INTESTINAL DEL N NO DEGRADADO

Se estudió la cinética de degradación ruminal del nitrógeno para lo cual se usó la técnica de la bolsa de nylon (Ørskov y McDonald, 1979) tanto para los suplementos proteínicos como para el campo natural. Se emplearon dos ovinos machos castrados de 40 kg de peso vivo con fístulas ruminales. Los animales se alojaron en bretes individuales y se le ofrecía 1 kg de heno de alfalfa dos veces al día, con una diferencia de 12 horas entre comidas (8 y 20hs) y tenían libre disponibilidad de agua. En bolsas de 5 x 3 cm confeccionadas con tela polyester de monofilamento con un tamaño de poro de 45 μ m (ANKOM Technology) se pesaron 3 gramos de campo natural y de cada suplemento proteínico. Previo a la incubación, las bolsas fueron sumergidas en agua tibia (39°C) durante 15 min para luego ser colocadas en el rumen inmediatamente de la primera comida y retiradas secuencialmente en los tiempos designados (2, 4, 8, 12, 16, 24, 72 y 96 horas). En todas las horas, también se incubaron muestras de heno alfalfa como estándar de referencia. Después de retiradas las bolsas del rumen, se enjuagaron con agua fría y se almacenaron a -20°C. Terminadas todas las incubaciones, las bolsas se descongelaron, se lavaron tres veces en un lavarropas (30 bolsas en 30 l de agua durante 3 minutos), se secaron en una estufa de aire forzado a 60°C durante 48 h y se pesaron.

La digestibilidad intestinal de la proteína no degradable ruminal se estimó según el procedimiento de Gargallo et al. (2006). En 54 bolsas, de iguales características de las empleadas en la técnica e la bolsa de nylon, se pesó 1,5 g de MS de cada alimento, las bolsas se remojaron en agua a 39°C durante 15 min. y se incubaron por 16 h en el rumen de dos ovinos con cánulas permanentes de rumen. En cada ovino y cada día se incubaron nueve bolsas, repitiéndose tres veces este procedimiento. Los animales fueron manipulados como indicado para la técnica de la bolsa de nylon. El procedimiento descrito se repitió a efectos de estimar el nitrógeno egresado del rumen. Las bolsas se enjuagaron, se secaron (60°C, 48 hs.), se pesaron y se determinó nitrógeno. Las demás bolsas egresadas del rumen, se incubaron a 39°C durante 24 horas el equipo Daisy. En cada botella del equipo, se colocaron 27 bolsas durante 2,5

hs., en una solución de pepsina ácida-HCl (pH 2,3 g de pepsina / L de HCl 0,1 N). Luego, las bolsas se enjuagaron y se incubaron (24 horas a 39°C) en botellas (27 bolsas por botella) conteniendo 2 litros de una solución de pancreatina (0,5 M KH₂PO₄) ajustado a pH 7,75. Después de la incubación, las bolsas se enjuagaron, se secaron a 60 °C, se pesaron y se almacenaron para su determinación de N con agua del grifo.

3.6. PRODUCCIÓN DE GAS TOTAL Y METANO

Para el estudio de la fermentescibilidad de la materia orgánica y la producción de metano del forraje de campo natural, los suplementos proteínicos 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 8) (Ankom, 2013).

Cuadro 7. Composición de la solución buffer y de la solución reductora.

Solución A (c.s.p 1000 ml)	
NH ₄ HCO ₃	4 g
NaHCO ₃	35 g
Agua destilada	Hasta llegar a 1000 ml total
Solución B	
Solución macromineral (c.s.p 1000 ml)	
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	14.4 g
KH ₂ PO ₄	6.2 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.6 g
Agua destilada	Hasta llegar a 1000 ml total
Solución micromineral (c.s.p 100 ml)	
CaCl ₂ .2H ₂ O	13.2 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	10 g
CoCl ₂ .6H ₂ O	1 g
FeCl ₃ .6H ₂ 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 dos 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 CO₂. Luego de inoculados, los viales se taparon con septos de goma butilo y sellaron con

precintos de aluminio, empleando un flujo continuo de CO₂ 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 tres incubaciones (“corridas”) separadas una semana entre sí.

Las mediciones de gas se realizaron a la 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) 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 h) y la producción de metano acumulado hasta las 8 hs., entre las 8 y 24 hs. y entre las 24 y 48 hs. de incubación, períodos que abarcaron 8,16 y 24 hs. 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 identificado. 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 hs. de incubación (inclusive), en el segundo y tercer frasco se procedió de la misma forma para las mediciones de las 8 a las 24 hs. 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 12.3psi. Se utilizó un estándar de metano de concentración conocida para calcular los mg de metano obtenidos para cada muestra.

3.7. CÁLCULOS

3.7.1 Cinética y degradabilidad efectiva del N

La cinética de desaparición ruminal del N de las bolsas se describió para cada animal utilizando los modelos de Ørskov y McDonald (1979, Modelo 1, sin tiempo “lag”, y Dhanoa (1988, Modelo 2, con tiempo “lag”).

$$\text{Modelo 1: desaparición (\% del N incubado)} = a + b \times (1 - e^{-kdt})$$

$$\text{Modelo 2: desaparición (\% del N incubado)} = a + b \times (1 - e^{-kd(t-L)})$$

Las constantes “a” y “b” estiman la fracción soluble y la fracción potencialmente degradable, respectivamente; kd la tasa de desaparición de la fracción potencialmente degradable; t el tiempo y L tiempo “lag”. Los parámetros de degradación fueron calculados usando el procedimiento no lineal con el método de Marquardt (PROC NLIN, SAS). Se presentaron los parámetros a, b, kd y L estimados con el modelo con el mayor r².

La degradabilidad efectiva (DE) del N se calculó utilizando la siguiente ecuación.

$$DE (\%) = a + [b \times kd / (kd + kp)]$$

Siendo kp la tasa de pasaje en el rumen (0.06/h)

3.7.2 Cinética de la producción de gas

Para describir la cinética de producción de gas se empleó un modelo logístico con 1 o 2 fases (Schofield et al., 1994).

$$V = V_1 / (1 + e^{(2+4k_1)(t-L)}) + V_2 / (1 + e^{(2+4k_2)(t-L)})$$

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, %/hs.

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

t: tiempo de incubación (hs.).

L: tiempo de colonización (hs.).

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

3.7.3. Digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica

La digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica (DIVMO) se estimó según el procedimiento de ANKOM (2013).

3.7.4. Cálculo de energía metabolizable

La energía metabolizable (EM) de los alimentos se calculó como:

$$EM \text{ (Mcal / kg de MS)} = EB * DIVMO * 0.82$$

Donde,

EB= energía bruta

EB (Mcal/kg MS) = carbohidratos totales_{bs} * 4.1 + proteína cruda_{bs} * 5.6 + extracto etéreo_{bs} * 9.4 carbohidratos totales = fibra detergente neutro + carbohidratos no estructurales (CHONE) CHONE_{bs} = 100 – (PC´FDNmo+EE+Cenizas).

3.7.5. Digestibilidad intestinal de la proteína no degradable en el rumen

La digestibilidad intestinal de la proteína no degradable en el rumen se calculó según lo descrito por Gargallo et al. (2006).

3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

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

$$Y_{ijk} = \mu + P_i + G_j + PG_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde,

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

μ : media poblacional

P_i : efecto del i -ésimo nivel A

G_j : efecto del j -ésimo nivel B

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

ε_{ijk} : error experimental

Donde,

Nivel A: nivel de inclusión del suplemento (1, 2, 3 y 4, correspondiente a 12, 14, 16 o 18 % de PC en las mezclas)

Nivel B: suplementos proteínicos (harina de soja, harina de girasol, harina de pescado)

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

En el cuadro 8 se presentan la caracterización química, producción de gas y de metano *in vitro*.

4.1.1 Campo natural

En el forraje de campo natural, la MO representó 93.41 % de la materia seca siendo su digestibilidad *in vitro* 71.33%. El contenido de FDNmo, FDAmo y Ligas fue de 70.74, 46.81 y 8.19 % respectivamente. El contenido (% base seca) de PC fue 9.27 presentando una relación PDR: PNDR de 40:60. La digestibilidad intestinal de la PNDR fue 55.16%. Se observó un tiempo de demora de inicio de la digestión del N de 15 hs., siendo la proporción de fracción soluble y fracción potencialmente degradable 37 y 63 % del N desaparecido en el rumen, respectivamente y una tasa de degradación de la FPD de 5.31 %/h. Se registró una producción total de gas de 568 ml gas/g MOd. En el análisis de la producción de gas se identificaron dos comportamientos fermentativos. En la primera fase de producción de gas, se produjo 297 ml /g MOd a una tasa de 0,0527 ml/h mientras que en la segunda fase se observó una producción de 271 ml/g MOd a una tasa de 0,0158 ml/h. La producción de metano a las 48 horas de incubación así como el volumen de gas generado para ese período, fueron 22,8 y 524 ml/g MOd, respectivamente.

4.1.2 Suplementos

En la harina de girasol la MO representó 92,04 % de la materia seca, con una digestibilidad *in vitro* de 63.45%. El contenido de FDNmo, FDAmo y Ligas fue de 37,52, 20,72 y 6.45 % respectivamente. El contenido (% base seca) de PC fue 39,04%, siendo la degradación de la misma de 68%. No se identificó un tiempo de inicio de la digestión, siendo la FS 24,61 % y la FPD 75,39 % de la PC, con una tasa de degradación de FDP 9,43 %/h. En la producción de gas, se identificaron dos pools fermentativos, siendo la producción total de gas de 569 ml/g MOd. En la primera fase de la producción de gas se obtuvo un volumen de 355 ml gas/g MOd a una tasa de 0,0943 ml/h mientras que en la segunda etapa se obtuvo un volumen de 214 ml gas/g MOd a una tasa de 0,0183 ml/h. La producción de metano para la harina de girasol en el período de incubación de 48 hs. fue 22,82 ml /g MOd y el volumen de gas generado en dicho período fue 528 ml/g MOd.

La harina de soja, presentó 93,38 % de MO, con una digestibilidad *in vitro* de 67,59%. La FDNmo, FDAmo y Ligas fueron 9,66, 3,59 y 6,45 %, respectivamente. El contenido de PC (% base seca) fue 51,54 %, con una tasa de degradación de 67,22%. Al igual que en la harina de girasol no se identificó un tiempo de inicio de la digestión, siendo la proporción de fracción soluble y fracción potencialmente degradable 35 y 65 %, respectivamente y una tasa de degradación de la FPD de 5,88 %/h. La producción de gas en la harina de soja acumuló un total de 545 ml gas/g MOd. Al igual que en el campo natural y que la harina de girasol, se encontraron dos comportamientos fermentativos. En la primera fase se produjo 332 ml gas/g MOd a una tasa de 0,0899 ml/h, mientras que en la segunda fase hubo una producción de 213 ml gas/g MOd a una tasa de 0,0207 ml gas/GMO. En la harina de soja se obtuvo un volumen de metano acumulado en 48 hs. de 21,55 ml/g MOd, siendo el volumen de gas 506 ml/g MOd.

La harina de pescado, presentó un nivel de MO de 77,59 %, con una digestibilidad *in vitro* de 87,36%. Tanto los contenidos de FDNmo, FDAmo y Ligas fueron de 0%. El contenido de PC en base seca fue de 66,61 %, con una degradación proteínica de 41,71%. Al igual que en los dos suplementos ya mencionados no se identificó un tiempo de inicio de la digestión, siendo la proporción de fracción soluble y fracción potencialmente degradable 30,30 y 69,62 %, respectivamente y la tasa de degradación de la FPD fue 3,34 %/h. A diferencia de los alimentos mencionados anteriormente en la harina de pescado se identificó solo un comportamiento fermentativo que produjo 343 ml gas/g MOd a una tasa de 0,0421 ml/h. En la harina de pescado la producción de metano fue de 14 ml/g MOd en un volumen total de 343 ml/g MOd de gas en las 48 hs de incubación.

Cuadro 8. Caracterización química, producción de gas y metano *in vitro* de los alimentos empleados.

Alimentos	CN	HG	HS	HP
Caracterización química				
MS (%)	33,3	88,92	89,13	94,36
Cenizas (% BS)	6,59	7,96	6,62	22,41
EE (% BS)	1,26	0,25	1,05	5,73
FDNmo (% BS)	70,74	37,52	9,66	0,00
FDAmo(% BS)	33,12	20,72	3,59	0,00
Lig as (% BS)	2,71	6,45	0,00	0,00

DIV MO (%)	71,33	63,45	67,59	87,36
EM (Mcal/kg MS)	2,41	2,31	2,62	3,25
Proteína y su caracterización				
PC (% BS)	9,27	39,04	51,54	67,61
DE de la PC (% de la PC)	41,14	68,05	67,22	41,71
PDR (% BS)	3,81	26,57	34,65	28,20
Lag (hs)	15,11	0,00	0,00	0,00
FS (% de la PDR)	36,65	24,61	35,00	30,38
FPD (% de la PDR)	63,35	75,39	65,00	69,62
kd (%/h)	5,31	9,43	5,88	3,34
Producción de gas <i>in vitro</i>				
Prod. Total (ml/g Mod)	568	569	545	343
k (ml/h)	-	-	-	0,0421
Pool de fermentación rápida				
Volumen (ml/g MOd)	297	355	332	-
k (ml/h)	0,0527	0,0943	0,0899	-
Pool de fermentación lenta				
Volumen (ml/g MOd)	271	214	213	-
k (ml/h)	0,0158	0,0183	0,0207	-
Producción de metano <i>in vitro</i>				
Metano acumulado de 0 a 48 hs (ml/g Mod)	22,8	22,82	21,55	14,16
Gas acumulado de 0 a 48 hs (ml/ g Mod)	524	528	506	343

MS: materia Seca, EE: extracto etéreo, FDNmo: fibra detergente neutro de la materia orgánica, FDAmo: fibra detergente ácido de la materia orgánica, Ligas: lignina, DIV MO: digestibilidad *in vitro* de la materia orgánica, EM: energía metabolizable; PC: proteína cruda, DE: degradabilidad, PDR: proteína degradable en el rumen, Lag: tiempo de inicio de la degradación, FS: fracción soluble: FDP: fracción potencialmente degradable, Kd: tasa de degradación, k: tasa de fermentación.

4.1.3 Mezclas

En el cuadro 9 se presenta la información de caracterización química de las mezclas evaluadas.

Las mezclas de CN con los suplementos proteínicos presentaron niveles crecientes de PC ($p < 0.0001$). En las mezclas de CN con HG la PC (% BS) fue 12.09, 14.14, 16.18 y 18.22, en las mezclas con HS fue 12.08, 14.14, 17.02 y 18.23 y en las que contenían HP los valores fueron 11.94, 13.89, 15.86 y 17.82, no observándose diferencias ($p > 0.0956$) entre las mezclas que incluían los distintos suplementos a un mismo nivel de PC.

El análisis de los componentes fibrosos registró diferencias ($p < 0.001$) entre los contenidos de FDNmo y FDAmo del CN y los de las mezclas, mientras tanto, el contenido de Ligas fue similar ($p = 0.912$). La FDNmo y la FDAmo de las mezclas fueron inferiores ($p < 0.0302$) a las del CN. Ambas fracciones disminuyeron ($p < 0.0022$) cuando la cantidad de HG o HS combinada con el CN incrementó de 12 a 16 % la PC de las mezclas. Esta disminución también se observó en las mezclas conteniendo HP cuando la inclusión incrementó de 12 a 18% la PC de las mezclas.

Cuadro 9. Caracterización química de las mezclas

Alimentos	PC de las mezclas (%)					CME
	CN	12	14	16	18	
Harina de girasol	% BS					
PC	9.27 e	12.09 d	14.14 c	16.18 b	18.22 a	0,0076
FDNmo	70.74 a	67.73 b	65.49 bc	63.26 cd	61.02 d	0,0663
FDAmo	33.12 a	31.99 b	31.16 bc	30.32 cd	29.49 d	0,4139
Ligas	2.71 e	3.05 d	3.303 c	3.55 b	3.81 a	0,0748
Harina de soja	% BS					
PC	9.27 e	12.08 d	14.14 c	17.02 b	18.23 a	0,0553
FDNmo	70.74 a	65.35 b	63.93 b	60.41 c	58.15 c	0,0261
FDAmo	33.12 a	30.51 b	29.83 c	28.12 d	27.03 e	0,4139
Ligas	2.71 a	2.47 ab	2.41 b	2.25 b	2.15 b	0,0748
Harina de pescado	% BS					
PC	9.27 e	11.94 d	13.89 c	15.86 b	17.82 a	0,0033
FDNmo	70.74 a	67.45 b	65.02 c	62.91 c	60.17 d	0,0637
FDAmo	33.12 a	31.57 b	30.44 b	29.45 c	28.17 d	0,4139
Ligas	2.71 a	2.59 b	2.49 bc	2.42 cd	2.31 d	0,0748

a,b,c,d,e: en la fila, valores seguidos por igual letra no difieren ($p < 0.05$).

4.2. CINÉTICA

4.2.1. Producción de gas del campo natural y las combinaciones evaluadas

En el cuadro 10 se presentan la producción total de gas y los parámetros de la cinética de fermentación y en las figuras 7, 8 y 9 se muestran las cinéticas de la producción de gas del forraje de campo natural y su combinación con harina de girasol, harina de soja o harina de pescado.

Cuadro 10. Producción total de gas y cinética de fermentación del forraje de campo natural y las mezclas en estudio.

PC mezclas (%BS)	CN	12	14	16	18	CME
Producción total de gas						
			ml/g Mod			
Harina de girasol	568 b	637 a	665 a	662 a	662 a	23
Harina de soja	568 b	612 ab	640 a	665 a	669 a	23
Harina de pescado	568 b	636 a	639 a	642 a	654 a	23
Pool de fermentación rápida						
			ml/g Mod			
Harina de girasol	297 b	326 ab	341 a	349 a	351 a	13
Harina de soja	297 c	308 bc	337 ab	342 a	340 a	13
Harina de pescado	297 b	328 a	333a	329 a	333 a	13
k1						
			ml/h			
Harina de girasol	0,0527 c	0,0645 ab	0,0596 bx	0,0639 ab c	0,06750 a x	0,0027
Harina de soja	0,0527 c	0,0596 a x	0,0566 bc xy	0,0603 ab x	0,0639 a x	0,0027
Harina de pescado	0,0527 c	0,0536 9 y	0,05313 y	0,05502 y	0,05627 y	0,0027
Pool de fermentación lenta						
			ml/g Mod			
Harina de girasol	271 b	311 a	324 a	314 a	310 a	12
Harina de soja	271 b	304 ab	303 ab	323 a	329 a	12
Harina de pescado	271 b	306 a	306 a	313 a	321 a	12
k2						
			ml/h			
Harina de girasol	0,0158	0,0163	0,0158	0,0162	0,0166	0,0013
Harina de soja	0,0158	0,0158	0,0158	0,0115	0,0163	0,0013
Harina de pescado	0,0158	0,0159	0,0156	0,0155	0,0163	0,0013

k1: tasa de degradación de la fracción potencialmente degradable, pool de fermentación rápida, k2: tasa de degradación de la fracción potencialmente degradable, pool de fermentación rápida, Mod: materia orgánica digestible, a,b,c: en la fila, valores seguidos por igual letra no difieren ($p < 0,05$).

En producción total de gas y en los parámetros de la cinética, no se registró una interacción ($p > 0.1618$) entre el suplemento incluido en la mezcla y los niveles de inclusión de los mismos.

La producción total de gas de las mezclas conteniendo niveles similares de PC no difirieron ($p > 0.4375$). La producción total de gas se modificó ($p < 0.001$), al combinar el CN con los suplementos. Al combinar CN con HG o HP para generar mezclas con 12% de PC, la producción total de gas se incrementó ($p < 0.047$) mientras que en las combinaciones con HS esta diferencia ($p=0.038$) se observó cuando la mezcla tenía 14% de PC, no registrándose aumentos ($p > 0.1218$) en producción total de gas en las combinaciones con mayores concentraciones de PC.

En referencia a la cinética de la fermentación, en todas las mezclas evaluadas se identificaron dos pools de fermentación, representando el pool de fermentación rápido 50 % de la producción total de gas, con una tasa de fermentación cuatro veces superior a la del pool de fermentación más lenta. Las cinéticas de fermentación de las combinaciones de los suplementos con CN que resultaron en mezclas con concentraciones similares de PC, no difirieron ($p > 0.3781$) en la producción de gas de cada uno de los pools ni en las tasas de fermentación del pool de liberación lenta de gas. La tasa de liberación de gas del pool de fermentación rápido fue mayor ($p \leq 0.05$) en las mezclas con HG o HS en 12, 16 o 18% de PC que sus correspondientes con HP.

La cinética de producción de gas varió ($p < 0.01$) al combinar el CN con niveles crecientes de suplementos (cuadro 10). En las mezclas de CN con HG, la producción de gas del pool de fermentación rápido así como la tasa respectiva, de las mezclas que presentaban más de 12% de PC, fueron mayores ($p < 0.023$) que sus correspondientes del CN. La producción de gas del pool de fermentación lenta en todas las mezclas, fue mayor ($p < 0.0279$) que su correspondiente del CN, siendo la tasa de fermentación de este pool similar ($p = 29.84$) en el CN y las mezclas.

Las mezclas de CN y HS mostraron una producción de gas del pool de fermentación rápida, mayor ($p < 0.025$) que su correspondiente del CN, cuando las mezclas presentaban 14% o más de PC; mientras que la tasa de fermentación de este pool tendió mayor ($p < 0.123$) en las mezclas con 12, 16 o 18% de PC. La producción de gas del pool de fermentación lenta fue mayor ($p < 0.0279$) en las mezclas con 16 y 18% de PC, que su correspondiente del CN,

siendo la tasa de fermentación de este pool similar ($p = 29.84$) en el CN y las mezclas de este con HS.

En las mezclas con HP, la producción de gas de los pools de fermentación rápida y lenta, tendió ($p < 0.10$) a aumentar y aumentó ($p \leq 0.05$), respectivamente, al comparar las mezclas con 12% de PC con los correspondientes del CN, no observándose diferencias ($p > 0.4047$) en la producción de gas de ambos pools al incrementar la PC de las mezclas. Tampoco se observaron diferencias ($p > 0.1761$) en las tasas de producción de gas de ambos pools del CN y las mezclas con HP.

Figura 7. Producción de gas de la combinación de CN con HG.

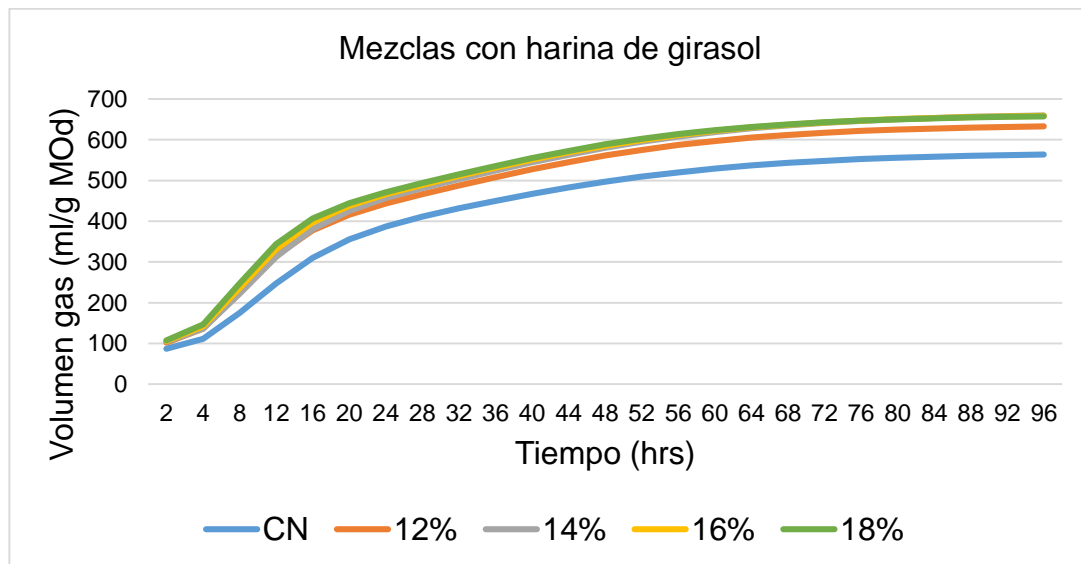


Figura 8. Producción de gas de la combinación de CN con HS.

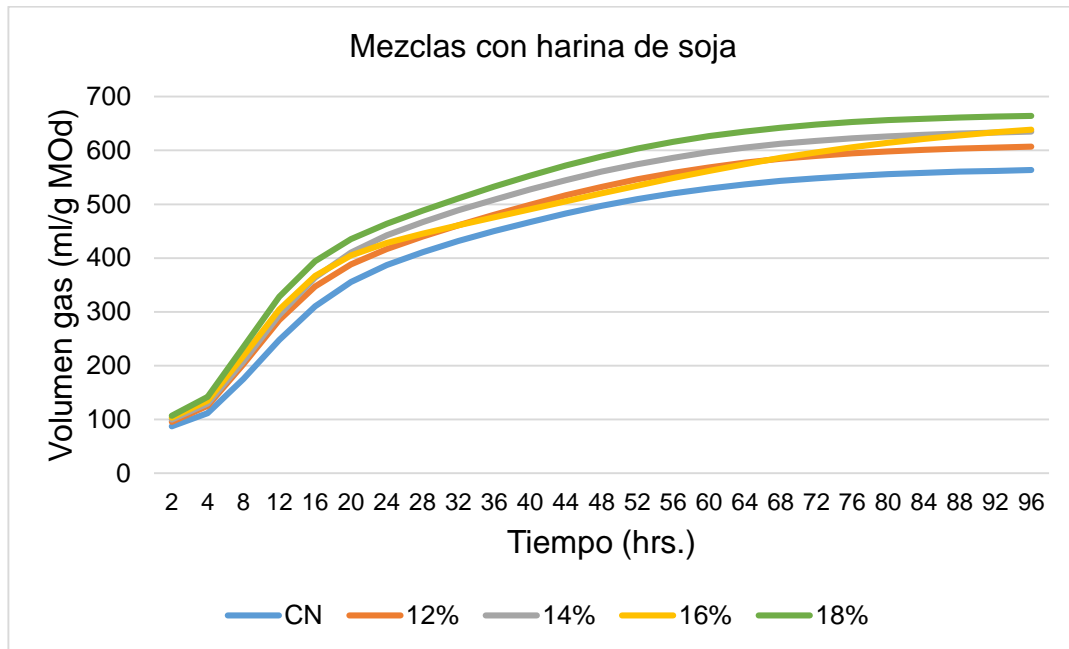
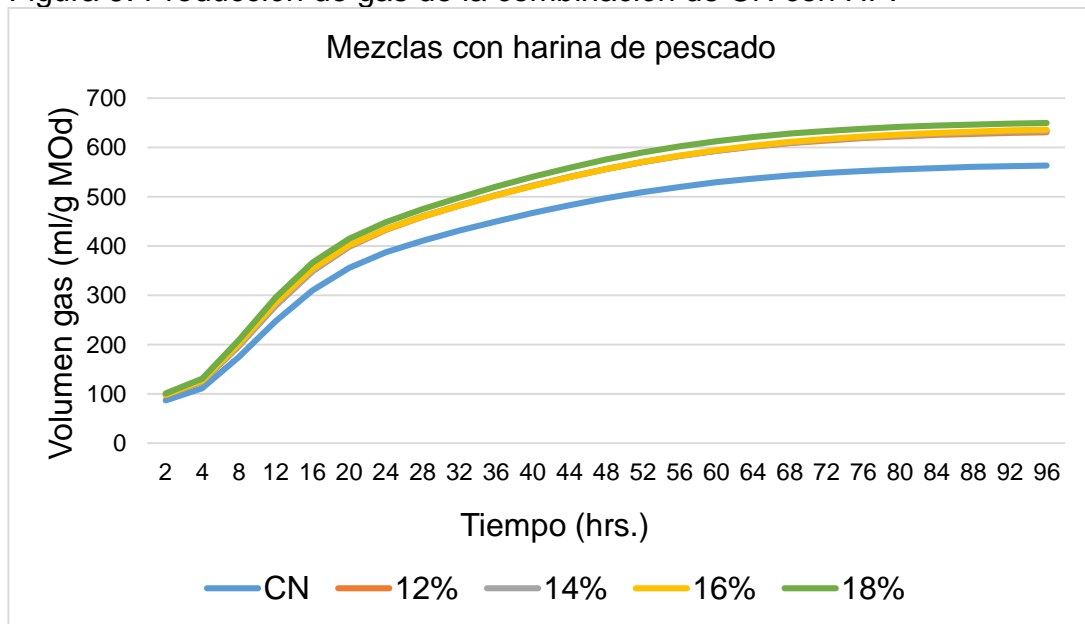


Figura 9. Producción de gas de la combinación de CN con HP.



4.2.2. Producción de metano

En el cuadro 11 se presenta la producción de metano y de gas en 48 hrs de incubación.

Cuadro 11. Producción total de gas metano, en gas acumulado dentro de las 48 horas.

PC mezclas (%BS)	CN	12	14	16	18	CME
Producción total de gas CH₄ (ml/g Mod)						
Harina de girasol	22,81b	22,96 b	24,72 b	25,90 a	25,81 a	0,9481
Harina de soja	22,81 b	24,72 b	25,01 b	26,77 ab	27,88 a	0,9481
Harina de pescado	22,81	21,84	21,67	23,36	22,6	0,9481
Producción de gas, acumulado en 48 hrs						
Harina de girasol	524,33	558,67	546	557,67	549	18,05
Harina de soja	524,33	555,33	550,67	550	558,33	18,05
Harina de pescado	524,33	538,67	554,67	543,67	552,33	18,05

a,b,c: en las filas, valores seguidos por igual letra no difieren ($P < 0,05$)

x,y: en las columnas, valores seguidos por igual letra no difieren ($P < 0,05$)

No se registró una interacción ($p > 0.3486$) entre el suplemento incluido en las mezclas y los niveles de inclusión de esos suplementos, en la producción de metano o de gas acumulado a las 48 h de incubación. La producción total de gas en el período en el cual se midió metano (48 hs. de incubación), fue similar en todas las combinaciones de CN con los suplementos, no identificándose efecto de los suplementos incluidos en las mezclas ($p = 0.8903$) ni del nivel de inclusión de los mismos ($p = 0.2682$) en las mezclas.

En producción de metano, los suplementos incluidos en las mezclas ($p < 0.001$) así como el nivel de inclusión de los mismos ($p = 0.0038$) afectó la producción de metano.

En las mezclas que presentaban concentraciones similares de PC, aquellas con 14, 16 o 18% de PC e incluían HG o HS produjeron más ($p < 0.0407$) metano que las correspondientes que incluían HP. En las mezclas con 12% de PC, la que contenía HS mostró mayor ($p < 0.407$) concentración de metano que la que contenía HP, presentado un valor intermedio la que incluía HG.

La producción de metano del CN fue similar ($p > 0.1639$) a la de las mezclas de CN con HG o HS y 12 o 14 % de PC. La combinación de CN con HG mostró la máxima producción de metano ($p < 0.0423$) en la mezcla con 16% de PC, mientras que en las que incluían HS la producción máxima ($p < 0.0255$) se observó en la mezcla con 18% de PC. La combinación de CN con HP no generó ninguna modificación ($p > 0.2179$) en la producción de metano.

5. DISCUSIÓN

5.1. CARACTERIZACIÓN NUTRICIONAL DEL CAMPO NATURAL

En el campo natural se observaron valores bajos de PC (7,90 a 10,39%), semejantes a los reportados por Formoso et al. (2001), Barbosa y Machado (2012) con un valor promedio para los meses de enero y febrero (9 y 9,49 %, respectivamente). La degradabilidad efectiva de la PC fue baja (41,14%, $k_p=0.06/h$), siendo superior a los valores (34,77%, $k_p=0.06/h$) reportados por Barbosa y Machado (2012). Esta diferencia puede explicarse en los modelos matemáticos empleados para el cálculo de los parámetros. En el trabajo de Barbosa y Machado (2012) el modelo utilizado no consideró un tiempo lag, mientras que en este estudio se testeó el ajuste de dos modelos (sin y con lag) obteniéndose un mejor ajuste con este último. Dicho tiempo dio 15 horas y una diferencia en la fracción soluble y k_d , 37 vs. 15 % y 2.44 vs. 5.31 %/h (el presente estudio y Barbosa y Machado, 2012). La digestibilidad de la proteína no degradable en rumen fue baja (55%) indicando que si bien la proporción de proteína no degradable sería moderadamente alta (60%), su aporte de aminoácidos absorbibles sería bajo. La fracción FDN_{mo} fue 71% de la cual, la celulosa y la hemicelulosa habrían representado el 53 y 43%, respectivamente lo cual podría explicar el valor de la DIVMO (70%) y la EM (2.41 Mcal/ kg MS). Estos valores fueron algo superiores a los reportados (59 y 61% para la DIVMO y 2.20 de EM/kg MS) por Formoso et al. (2001), Barbosa y Machado (2012) para un campo natural estival sobre el cristalino.

El CN frecuentemente es la única, o principal, fuente de nutrientes estivales de los corderos nacidos en primavera. En esta situación, el NRC (2007) indica que corderos de 20 kg de maduración tardía o temprana, deberían disponer de forrajes que presentaran, respectivamente, 1.91 o 2.40 Mcal de EM/kg de MS los cuales podrían ser satisfechos por forrajes de CN similares a los de este estudio. Esta situación podría ser diferente si se considera el aporte proteínico de esos forrajes. Si los mismos corderos considerados anteriormente, consumieran lo sugerido por NRC (2007) (570 o 630 g de MS /día, maduración tardía o temprana), el aporte de PC del CN sería 53 o 58 g/día frente a requerimientos de 69 o 64 g/día, lo que indicaría un déficit de PC de 23 o 9% respectivamente. Estas diferencias serían aún mayores si se consideraran los requerimientos de PDR - 39 o 55 g/d para los corderos de maduración tardía o temprana - los cuales serían satisfechos en 56 o 44%, respectivamente.

5.2. CARACTERIZACIÓN NUTRICIONAL DE LOS SUPLEMENTOS PROTEÍNICOS

El contenido de PC de las harinas estudiadas fue similar a los presentados por Sauvant et al. (2004), Blas et al. (2007), NRC (2007) así como la DE la cinética de la degradación de la harina de soja y la harina de pescado (cuadro 3). En contraposición, la harina de girasol mostró una DE superior a la reportada en los antecedentes, con valores similares a los de la harina de soja. Esta diferencia podría asociarse a la menor tasa de degradación observada en este estudio respecto a las reportadas por Sauvant et al. (2004), Blas et al. (2007), NRC (2007) (9.23 vs. 16.29 y 16 %/h, respectivamente, cuadro 3 y 8).

5.3 CARACTERIZACIÓN NUTRICIONAL DE LAS MEZCLAS

Los valores de proteína cruda de las mezclas fueron muy similares a los valores teóricos propuestos, En todas las mezclas la proporción de MS del forraje de CN fue mayor a 71%. El CN presentó una PDR de 3.8%, fracción que en las mezclas con 12 o 18% de PC presentó valores calculados de 5.7 o 11.1, 5.7 u 9.9 y 3.1 o 8.4 % cuando el suplemento empleado fue HG, HS o HP lo cual habría representado un incremento en los valores de PDR superior a 200%. En las mezclas con HG o HS y 12% de PC, la proporción de MS del CN fue similar (92%) y en aquellas con 18% el forraje representó 71 y 79%, respectivamente. Cuando el suplemento fue HP, la proporción de CN fue, respectivamente, 95 o 85% para las mezclas con 12 o 18% de PC. Esto indica que, el sustrato mayoritario para la fermentación microbiana fue la MO del CN, principalmente la pared celular (FDN_{mo}) que en las mezclas con 12 o 18% de PC representó 69 o 62, 66 o 59 y 69 o 63 % cuando el suplemento fue HG, HS o HP.

5.4 PRODUCCIÓN DE GAS Y METANO

El tiempo de demora en el inicio de la degradación de la PC del CN, pudo haber limitado la fermentación de la MO ya que al combinar ese forraje con los suplementos proteínicos la producción de gas aumentó. La PDR de los suplementos habría estado disponible para la población microbiana al inicio del contacto de la MO de las mezclas con el inóculo, ya que no se identificó un tiempo lag en ninguno de ellos. Esto habría favorecido la actividad microbiana lo cual justificando el aumento de la producción de gas observado. Sin embargo, los incrementos en la proporción de los suplementos proteínicos no generó aumentos sucesivos en la producción de gas. El incremento de la producción de gas observado no fue acompañado simultáneamente con aumentos en la

producción de metano. Los incrementos en producción de metano, se observaron cuando la proporción de suplemento en la mezcla fue mayor que la que generó el incremento de la producción de gas. Lo que sugeriría que otros factores podrían haber limitado la fermentación microbiana de los carbohidratos estructurales cuya fermentación está asociada a la metanogénesis.

Uno de los factores que podría haber sido la relación nitrógeno: energía disponible para el metabolismo microbiano. El NRC (2007) propone un requerimiento único para todas las categorías de 36 g de PDR por Mcal de EM. Como se observa en el cuadro 12, En el CN la relación es bastante menor que la requerida debido fundamentalmente a su bajo aporte de PDR. Esta situación se revierte al mezclar el CN con la HG o HS, lográndose la relación óptima con las combinaciones en las que se observa el incremento en la producción de metano, aquellas con HG y 16% de la PC y aquellas con HS y 18% de PC. En las mezclas con HP no se habría logrado una relación PDR: EM acorde a la requerida lo que podría fundamentar la similitud en producción de metano observada en todas las mezclas que incluían este suplemento.

Cuadro 12. Relación proteína degradable en rumen: energía metabolizable requerida por ovinos y presente en el campo natural y en las mezclas evaluadas

	Relación PDR : EM g/ Mcal
REQUERIDA	36
Campo natural	16
CN + HG, 12 % de PC	23
CN + HG, 14 % de PC	30
CN + HG, 16 % de PC	36
CN + HG, 18 % de PC	43
CN + HS, 12 % de PC	22
CN + HS, 14 % de PC	27
CN + HS, 16 % de PC	34
CN + HS, 18 % de PC	37
CN + HP, 12 % de PC	21
CN + HP, 14 % de PC	24
CN + HP, 16 % de PC	28
CN + HP, 18 % de PC	32

CN: campo Natural, HG: harina de Girasol, HS: harina de Soja

Fuente: NRC (2007)

Otro factor que podría haber incidido en las diferentes respuestas observadas en producción de metano podrían ser las diferentes vías metabólicas de fermentación asociadas a diferencias en las características de las paredes celulares (Cao et al., 2016). Así, las mezclas con HP en las cuales las paredes celulares provenían únicamente de CN, no se identificaron diferencias en la producción de metano del CN y las mezclas. En contraposición, la HG y la HS podrían haber tenido paredes celulares disímiles y diferentes de las del CN cuya inclusión en niveles crecientes podrían explicar las diferencias en las respuestas obtenidas.

6. CONCLUSIONES

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

El campo natural estival estudiado presenta deficiencia proteínica que a su vez es de baja degradabilidad y con un tiempo de inicio de la degradación prolongado.

La combinación del CN con harina de girasol, harina de soja o harina de pescado afectó la fermentescibilidad de la MO y en la producción de metano.

Las características de las proteínas de los suplementos proteínicos y la cantidad incluida en la combinación con campo natural influirían de manera diferente en la producción de CH₄.

7. RESUMEN

En el Centro de Investigación y Experimentación Dr. Alejandro Gallinal, perteneciente al Secretariado Uruguayo de la Lana, 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 suplementos proteínicos. Se evaluaron 13 tratamientos en un diseño completamente al azar con un arreglo factorial de los tratamientos (3 suplementos proteínicos x 5 niveles de inclusión del mismo) con tres repeticiones por tratamiento. Se realizaron mezclas del forraje con los tres suplementos proteínicos (harina de soja, harina de girasol y harina de pescado) a modo de obtener distintos porcentajes de PC en base seca (12, 14, 16 y 18). Se registró la producción *in vitro* de gas a la 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 24, 48 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 producción total de gas y en los parámetros de la cinética, no se registró una interacción ($p > 0.1618$) entre el suplemento incluido en la mezcla y los niveles de inclusión de los mismos. La producción total de gas de las mezclas conteniendo niveles similares de PC no difirieron ($p > 0.4375$). La producción total de gas se modificó ($p < 0.001$), al combinar el CN con los suplementos. En referencia a la cinética de la fermentación, en todas las mezclas evaluadas se identificaron dos pools de fermentación, un pool de fermentación rápida y otro de fermentación lenta. La cinética de producción de gas varió ($p < 0.01$) al combinar el CN con niveles crecientes de suplementos. En las mezclas de CN con HG, la producción de gas del pool de fermentación rápido así como la tasa respectiva, de las mezclas que presentaban más de 12% de PC, fueron mayores ($p < 0.023$) que sus correspondientes del CN. La producción de gas del pool de fermentación lenta en todas las mezclas, fue mayor ($p < 0.0279$) que su correspondiente del CN, siendo la tasa de fermentación de este pool similar ($p = 29.84$) en el CN y las mezclas. Las mezclas de CN y HS mostraron una producción de gas del pool de fermentación rápida, mayor ($p < 0.025$) que su correspondiente del CN, cuando las mezclas presentaban 14% o más de PC; mientras que la tasa de fermentación de este pool fue mayor ($p < 0.123$) en las mezclas con 12, 16 o 18% de PC. La producción de gas del pool de fermentación lenta fue mayor ($p < 0.0279$) en las mezclas con 16 y 18% de PC, que su correspondiente del CN, siendo la tasa de fermentación de este pool similar ($p = 29.84$) en el CN y las mezclas de este con HS. En las mezclas con HP, la producción de gas de los pools de fermentación rápida y lenta, tendió ($p < 0.10$) a aumentar y aumentó ($p \leq 0.05$), respectivamente, al comparar las mezclas con 12% de PC con los correspondientes del CN, no observándose diferencias ($p > 0.4047$) en la

producción de gas de ambos pooles al incrementar la PC de las mezclas. Tampoco se observaron diferencias ($p > 0.1761$) en las tasas de producción de gas de ambos pooles del CN y las mezclas con HP. En producción de metano, los suplementos incluidos en las mezclas ($p < 0.001$) así como el nivel de inclusión de los mismos ($p = 0.0038$) afectó la producción de metano. La producción de metano del CN fue similar ($p > 0.1639$) a la de las mezclas de CN con HG o HS y 12 o 14 % de PC. La combinación de CN con HG mostró la máxima producción de metano ($p < 0.0423$) en la mezcla con 16% de PC, mientras que en las que incluían HS la producción máxima ($p < 0.0255$) se observó en la mezcla con 18% de PC. La combinación de CN con HP no generó ninguna modificación ($p > 0.2179$) en la producción de metano.

Palabras clave: Fermentación ruminal; Suplementación proteínica; Metanogénesis.

8. SUMMARY

In the Centro de Investigación y Experimentación Dr. Alejandro Gallinal, belonging to the Secretariado Uruguayo de la Lana, was carried out an experiment, which has the objective of evaluate the variability of the energy digestion and the methanogenic potential of natural grass combined with protean supplements. 13 treatments were evaluated in a completely randomized design with a factorial arrangement of the treatments (3 protean supplements x 5 level of inclusion) with three repetitions per treatment. The natural grass was mixed with three different protean supplements (soya bean meal, sunflower meal and fishmeal) in order to obtain different percentage of crude protein in dry basis (12, 14, 16 y 18). The *in vitro* gas production was registered at 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 24, 48 hours of incubation with the collection of the accumulated gas from 0 to 8, 8 to 24 and 24 to 48 hours to determine the methane concentration by gas chromatography mass. In the total gas production and in the kinetics' parameters there was no interaction found ($p > 0.1618$) between the supplements included in the mixture and the levels of inclusion of the same. The total gas production of the mixtures containing similar levels of crude protein did not differ ($p > 0.4375$). The total gas production was modified ($p < 0.001$) when combining the natural grass with the supplements. Referring to the fermentation of kinetics, in all evaluated mixtures there were identified two pooles of fermentation, one pool of fast fermentation and the other one of slow fermentation. The kinetics of gas production varied ($p < 0.01$) when combining the natural grass with increasing levels of supplements. In the natural grass with sunflower meal mixture the gas production of the fast fermentation pool as well as the respective rate of the mixtures that presented more than a 12% of crude protein were higher ($p < 0.023$) than their corresponding of natural grass. The gas production of the slow fermentation pool in all the mixtures were higher ($p < 0.0279$) than their corresponding of natural grass, being the fermentation rate of this pool similar ($p = 29.84$) in the natural grass and in the mixtures. The natural grass and soya bean meal mixtures showed a gas production of the fast fermentation pool higher ($p < 0.025$) than its corresponding of natural grass, when the mixtures presented 14% or more of crude protein; whereas the fermentation rate of this pool was higher ($p < 0.123$) in the mixtures with 12, 16 or 18% of cp. The gas production of the slow fermentation pool was higher ($p < 0.0279$) in the mixtures with 16 and 18% of crude protein, than their corresponding of natural grass, being the fermentation rate of this pool similar ($p = 29.84$) in natural grass and the mixtures of this with soya bean meal. In the mixtures with fishmeal, the gas production of slow and fast fermentation pooles tended to rise ($p < 0.10$) and has risen ($p \leq 0.05$) respectively when comparing the mixtures with 12% of crude protein with the corresponding of natural grass,

where no differences were observed ($p > 0.4047$) in the gas production of both pools when rising the crude protein of mixtures. Neither were differences observed ($p > 0.1761$) in the rates of gas production of both pools of natural grass and the mixtures with fishmeal. In methane production the supplements included in the mixtures ($p < 0.001$) as well as the level of inclusion of the same ($p = 0.0038$) affected the production of methane. The production of methane of natural grass was similar ($p > 0.1639$) to the ones of the mixtures with natural grass with sunflower meal or soya bean meal and 12 or 14% of crude protein. The combination of natural grass with sunflower meal showed the peak methane production ($p < 0.0423$) in the mixture with 16% of crude protein, whereas in the ones that included soya bean meal the peak production ($p < 0.0255$) were observed in the mixture with 18% of crude protein. The combination of natural grass with fishmeal did not produce any modification ($p > 0.2179$) in the methane production.

Key words: Ruminant fermentation; Protean supplements; Methanogenesis.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. AFRC (Agricultural and Food Research Council, UK). 1993. Energy and protein requirements of ruminants; an advisory manual prepared by the AFRC Technical Committee on Responses to Nutrients. Wallingford, UK, CABI. pp. 133-137.
2. ANKOM. 2013. *In vitro* true digestibility using the DAISY II Incubator. (en línea). Macedon, NY. s.p. (In Vitro ANKOM Technology Method no. 3). Consultado mar. 2014. Disponible en <https://www.ankom.com/analytical-methods-support/daisy-incubators>
3. AOAC (Association of Official Analytical Chemists, US). 1990. Official methods of analysis. 15th. ed. Washington, D. C. 1045 p.
4. _____. 2012. Official methods of analysis. 19th. ed. Washington, D. C. 1422 p.
5. Bauzá, R. 2012. Suplementos proteicos. (en línea). In: Curso de Nutrición Animal (2012, Montevideo). Textos. Montevideo, Facultad de Agronomía. s.p. Consultado 26 feb. 2013. Disponible en http://prodanimal.fagro.edu.uy/cursos/NUTRICION/MATERIAL%202012/Tema_2.Alimentos_Proteicos.2012.pdf
6. Beauchemin, K.; McGinn, S.; Grainger, C. 2008. Reducing methane emissions from dairy cows. (en línea). Lethbridge, Canadá, s.e. 7 p. Consultado jul. 2014. Disponible en <http://www.wcds.ca/proc/2008/Manuscripts/Beauchemin.pdf>
7. Berreta, E. J.; Do Nascimento, D. 1991. Glosario estructurado de términos sobre pasturas y producción animal. Montevideo, Uruguay, IICA. PROCISUR. 126 p. (Diálogo no. 32).
8. _____. 1996. Campo natural; valor nutritivo y manejo. In: Risso, D.; Berretta, E. J.; Morón, A. eds. Producción y manejo de pasturas. Montevideo, INIA. pp. 113-117 (Serie Técnica no. 80).

9. Blas, C.; Mateos, G. G.; García Rebollar, P. 2007. Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para fabricación de piensos compuestos. 3ª. ed. Madrid, Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. 482 p.
10. _____. 2010. Tablas FEDNA de composición y valor nutritivo de alimentos para fabricación de piensos compuestos. (en línea). 3ª. ed. Madrid, Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. 502 p. Consultado jul. 2016. Disponible en <http://www.fundacionfedna.org/ingredientes-para-piensos>
11. Borucki, S. I.; Castro, L. E.; Phillip, H.; Lapierre, P.; Jardon, W.; Berthiaume, R. 2007. Ruminant degradability and intestinal digestibility of protein and amino acids in treated soybean meal products. *Journal of Dairy Science*. 90:810–822.
12. Byers, F. M. 1989. Ruminant nutrition. Montrouge, France. s.p.
13. Cao, Z.; Liang, J. B.; Liao, X. D.; Wright, A. D. G.; Wu, Y. B.; Yu, B. 2016. Effecto of dietary fiber on the methanogen community in the hindgut of Lantang gilts. *Animal*. 10: 1666-1676.
14. Cardenas, J.; Lemus, C. 2012. Emisión de metano entérico por rumiantes y su contribución al calentamiento global y al cambio climático. (en línea). *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 3 (2): 215-246. Consultado jul. 2016. Disponible en <http://www.redalyc.org/pdf/2656/265624467007.pdf>
15. Carmona, J.; Bolívar, D.; Giraldo, L. 2005. El gas metano en la producción ganadera y alternativas para medir sus emisiones y aminorar su impacto a nivel ambiental y productivo. (en línea). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 18 (1): 49-63. Consultado ago. 2014. Disponible en <http://www.redalyc.org/pdf/2950/295022952006.pdf>
16. Church, D. C. 1989. Fuentes suplementarias de proteínas. *In*: Church, D. C. ed. Alimentos y alimentación de ganado. Montevideo, Hemisferio Sur. pp. 197-212.

17. Dhanoa, M. S. 1988. On the analysis of dacron bag data for low degradability feeds. *Grass and Forage Science*. 43: 441-443.
18. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2011. El estado mundial de la agricultura y la alimentación. (en línea). Roma. 78 p. Consultado jul. 2016. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/013/i2050s/i2050s.pdf>
19. Formoso, D.; Oficialdegui, R.; Norbis, H. 2001. Producción y valor nutritivo del campo natural y mejoramientos extensivos. *In*: Secretariado Uruguayo de la Lana. Utilización y manejo de mejoramientos extensivos con ovinos. Montevideo, Tycom. pp. 7-11.
20. _____. 2005. La investigación en utilización de pasturas naturales sobre Cristalino desarrollada por el Secretariado Uruguayo de la Lana. *In*: Seminario de Actualización Técnica en Manejo de Campo Natural (2005, Montevideo). Trabajos presentados. Montevideo, INIA. pp. 51- 57 (Serie Técnica no. 151).
21. Gargallo, S.; Calsamiglia, S.; Ferret, A. 2006. Technical note; a modified three-step in vitro procedure to determine intestinal digestion of proteins. *Journal of Animal Science*. 84: 2163-2167.
22. GMI (Global Methane Initiative). Emisiones mundiales de metano y oportunidades de atenuación. (en línea). s.l. 4 p. Consultado mar. 2014. Disponible en https://www.globalmethane.org/documents/analysis_fs_spa.pdf
23. Hodgson, J. 1990. *Grazing management; science into practice*. New York, Longman. 203 p.
24. INAC (Instituto Nacional de Carne. Dirección de Información y Análisis Económico, UY). 2014. Anuario estadístico. 24 p.
25. Invernizzi, J. P.; Silveira, M. F. 1992. Valor nutritivo de diferentes especies nativas en suelos de Basalto, en condiciones de pastoreo. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay. Facultad de Agronomía. pp. 46-50.

26. Ishler, V.; Heinrichs, A.; Varga, G. 1996. From feed to milk: Understanding rumen function. Pennsylvania State University Extension Circular no. 422. 21 p.
27. Janssen, P. 2010. Presence of Novel, potentially homoacetogenic bacteria in the rumen as determined by analysis of formyltetrahydrofolate synthetase sequences from ruminants. (en línea). Applied and Environmental Microbiology. 76 (7): 2058- 2066. Consultado jul. 2014. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2849231/>
28. Johnson, K.; Johnson, D. 1995. Methane emissions from cattle. Journal Animal Science. 73: 2483-2492.
29. Jones, H.; Lewis, R.; Young, M.; Simm, G. 2004. Nutritional requeriments of growing lambs: Protein and energy requeriments. In: Chapman, H. M. ed. Feeding grain for sheep meat production. s.l., CRC Australian Sheep Industry. pp. 13-23.
30. Lovett, D. K.; Bortolozzo, A.; O´kiley, P.; Conaghan, P.; O´mara, F. P. 2004. *In vitro* total methane gas production as influenced by rate of nitrogen application, season of harvest and perennial ryegrass cultivar. Grass and Forage Science. 59 (3): 227-232.
31. Marichal, M. J. 2013. Post-weaning growth of lambs grazing natural pastures supplemented with protein concentrates. Montevideo, s.e. s.p
32. MGAP. DIEA (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Dirección de Estadísticas Agropecuarias, UY). s.f. Anuario estadístico 2013. Montevideo. s.p.
33. Mieres, J. 1997. Tipo de suplemento y su efecto sobre el forraje. In: Martins, D. V. ed. Suplementación estratégica para el engorde de ganado. Montevideo, INIA. pp. 11-15 (Serie Técnica no. 83).
34. Moss, A.; Hannah, I.; Kenman, S.; Buchanan, I.; Martin, P. 2000. Response by dairy cows grazing tropical grass pasture to barley or sorghum grain based concentrates and lucerne hay. Sydney, Australia, Australian Society of Animal Production. 168 p.

35. _____.; Givens, D. 2002. The effect of supplementing grass silage with soya bean meal on digestibility, in sacco degradability, rumen fermentation and methane production in sheep. London, s.e. 87 p.
36. Navarro-Villa, A.; O`brian, M.; Lopez, S.; Boland, T. M.; O`kiley, P. 2011. *In vitro* rumen methane output of red clover and perennial ryegrass assayed using the gas production technique (GPT). *Animal Feed Science and Technology*. 168: 152-164.
37. NRC (National Research Council, US). 2007. Nutrient requeriments of small ruminants; sheep, goats, cervids, and new world camelids. Washington, D.C., National Academic Press. 362 p.
38. Orskov, E. R.; Mac Donald, I. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal of Agricultural Science*. 92: 499-507.
39. Piaggio, L. 2009 Suplementación con concentrados para el engorde de corderos sobre campo natural. (en línea). Buenos Aires, Sito Argentino de Producción Animal. 4 p. Consultado jul. 2016. Disponible en http://www.produccion-animal.com.ar/produccion_ovina/produccion_ovina_carne/15-suplementacion_concentrados.pdf
40. _____.; Deschenau, H.; del Pino, L. 2012. Suplementación para engorde de corderos. (en línea). Turrialba, CR, IICA. Diapositivas. Consultado jun. 2016. Disponible en <http://argus.iica.ac.cr/Esp/regiones/sur/uruguay/Documentos%20de%20la%20Oficina/AgroenFoco/2012/Salto/Luc%C3%ADa%20Piaggio.pdf>
41. _____. 2013. A protein bank of *Lotus uliginosus* cv. Maku as an alternative to conventional protein supplements for weaned lambs grazing on natural pastures during summer and autumn. Montevideo, s.e. s.p.
42. Quirama, L.; Echeverry Zuluaga, J. J.; Parra Suescún, E. 2011. Effect of the *Lotus uliginosus* cv Maku regrowth age on the post-ruminal digestibility of the protein that can not be degraded in rumen. *Revista Lasallista de Investigación*. 8: 42:49.

43. Ramírez, J. F.; Posada, S.; Noguera, R. 2014. Metanogenesis ruminal y estrategias para su mitigación. (en línea). Medellín, Universidad de Antioquía. Facultad de Ciencias Agrarias. Escuela de Producción Agropecuaria. 17 p. Consultado feb. 2014. Disponible en <http://revistas.ces.edu.co/index.php/mvz/article/view/3151>
44. Recalde, E. 2013. Producción ovina; situación y perspectivas. Anuario OPYPA 2013: 31-61.
45. Relling, A.; Mattioli, G. 2003. Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes. La Plata, Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Veterinarias. s.p.
46. Risso, D. F.; Morón, A. 1990. Evaluación de mejoramientos extensivos de pasturas naturales en suelos sobre cristalino (1984-1990). In: Seminario Nacional de Campo Natural (2º., 1990, Tacuarembó). Trabajos presentados. Montevideo, Hemisferio Sur. pp. 205-218.
47. _____.; Berretta, E. J.; Zarza, A. 2001. Tecnologías para la mejora de la producción de forraje en suelos de Cristalino. In: Risso, D. F.; Berretta, E. J. eds. Tecnologías forrajeras para sistemas ganaderos del Uruguay. Montevideo, INIA. pp. 39-42 (Boletín de Divulgación no. 76).
48. Rodríguez, R.; Sosa, A.; Rodríguez, Y. 2007. La síntesis de proteína microbiana en el rumen y su importancia para los rumiantes. Revista Cubana de Ciencia Agrícola. 41 (4): 303-311.
49. Ruth, M. 2009. El metano y sus efectos en el calentamiento global. (en línea). Jalisco, México, Secretaría de Medio Ambiente para el Desarrollo Sustentable. s.p. Consultado mar. 2014. Disponible en https://www.globalmethane.org/documents/events_land_20090326_landfill-26mar09_methane_and_global_warming_effects_spanish.pdf
50. Sauvant, S.; Perez, J.-M.; Tran, G. eds. 2004. Tables de composition et de valeur nutritive des matières premières destinées aux animaux d'élevage. Paris, INRA. 301 p.

51. Schingoethe, D. J. 1976. Whey utilization in animal feeding; a summary and evaluation. *Journal of Dairy Science*. 59: 556-600.
52. Schofield, P.; Pitt, R. E.; Pell, A. N. 1994. Kinetics of fiber digestion from in vitro gas production. *Journal of Animal Science*. 72: 2980 - 2991.
53. Soliva, C. R.; Hess, H. D. 2007. Measuring methane emission of ruminants by in vitro and in vivo techniques. *Institute of Animal Science*. In: Makkar, H. P. S.; Vercoe, P. E. eds. *Measuring methane production from ruminants*. Zurich, Springer. Institute of Animal Science. pp. 15 - 31.
54. Soto, C.; Reinoso, V. 2007. Suplementación proteica en ganado de carne. (en línea). *Revista de la Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay (SMVU)*. 42(167):27-34. Consultado ene. 2014. Disponible en <http://www.revistasmvu.com.uy/revistas/numero167.pdf>
55. 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. *Animal Feed Science and Technology*. 48: 185 - 197.
56. Van Aardenne, J. A.; Dentener, F. J.; Olivier, J. G. J.; Klein Goldewijk, C. G. M.; Lelieveld, J. 2001. A 1°x1° resolution data set of historical anthropogenic trace gas emissions for the period 1890–1990. *Global Biogeochemical Cycles*. 15(4): 909–928.
57. Van Soest, P. J.; Robertson, J. B.; Lewis, B. A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*. 74: 3583-3597.
58. Wawrzekiewicz, M.; Danelón, J. 2004. Mejoramiento de la técnica de producción de gas in vitro para evaluar alimentos para ruminantes. *Revista Argentina de Producción Animal*. 24(3-4):87-97.