

Producción de gas, ácidos grasos volátiles y nitrógeno amoniacal *in vitro* con dietas basadas en pasto seco

C. Rodríguez Muela¹, E. Aguirre¹, F. Salvador¹, O. Ruiz¹, C. Arzola¹, O. La O² y C. Villalobos³

¹Universidad Autónoma de Chihuahua, Facultad de Zootecnia y Ecología. Periférico Francisco R. Almada, km 1 Chihuahua, Chih. México

²Instituto de Ciencia Animal, Apartado Postal 24, San José de las Lajas, La Habana, Cuba

³Texas Tech University, USA

Correo electrónico: crmuela@uach.mx

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del nivel de urea (NU) en bloques multinutricionales, así como de diferentes proporciones de pasto seco, suplemento en forma de bloque multinutricional (NB), en la producción de gas (PG), ácidos grasos volátiles (acético, propiónico y butírico) (AGV) y nitrógeno amoniacal (N-NH₃) *in vitro*. Se evaluaron los siguientes parámetros de PG: asíntota de producción de gas (PG-A), tiempo medio de formación de gas después de incubación (PG-B), constante indicadora del cambio del perfil (PG-C), punto de inflexión (PG-t₁), tasa fraccional de fermentación (PG-R) y tiempo de máxima tasa fraccional de fermentación (PG-t_{RM}). Se utilizaron bloques multinutricionales (PREMIUM BLOCK®), con 0; 2.5; 5 y 7.5 % de urea, y se elaboraron dietas con una proporción de 6; 12 y 18 % de bloque y el resto de pasto seco de un pastizal mediano abierto de la región noroeste del estado de Chihuahua, México. Para PG hubo efecto (P < 0.03) de interacción entre NU y NB, a partir de las 6 h de inicio de la producción de gas, la cual se mantuvo similar hasta las 12 h (P < 0.01), donde se registró un cambio, y a partir de este momento el efecto se mantuvo igual hasta las 96 h (P < 0.01), con el valor más bajo para el tratamiento NU 0 % y NB 18 % (31.50 mL/200 mg MS) y el más alto para NU 5 % y NB 6 % (34.33 mL/200 mg MS). Estos cambios indicaron movimientos en los perfiles de fermentación, debido a la diferente combinación de sustratos. Hubo efecto de interacción (P < 0.01) de NU y NB en PG-B, PG-t₁ y PG-t_{RM} y se registró el mismo efecto (P < 0.07) en PG-R. Se asumió que NB aceleró la fermentación y NU aumentó la disponibilidad de los sustratos. NB mostró efecto lineal (P < 0.02) sobre PG-A y PG-C, donde ambas variables disminuyeron al incrementar NB. Esto indica que la fermentación se aceleró con el aumento de NB. Para la producción de N-NH₃, NB tuvo efecto lineal positivo (P < 0.01), lo que indica que conforme aumentó NB, la concentración de N-NH₃ también se incrementó, en tanto que NU tuvo efecto cúbico (P < 0.13), ya que la mayor concentración de N-NH₃ ocurrió cuando NU tuvo valores de 2.5 y 7.5%, y la concentración más baja se presentó cuando NU alcanzó valores de 0 y 5 %, debido tal vez a una síntesis más eficiente de proteína. No se encontró efecto alguno en AGV. Se concluye que el 5 % de NU en el bloque y el 12 % de bloque en la dieta produjeron el mejor comportamiento de los indicadores de la fermentación ruminal. Se sugieren futuros estudios con animales y su evaluación económica.

Palabras clave: producción de gas, bloques multinutricionales, urea, pasto seco

La urea es el compuesto de nitrógeno no proteico (NNP) más ampliamente utilizado en dietas para rumiantes en todo el mundo. La urea ha sido empleada para disminuir los costos de los alimentos comerciales, sin considerar sus efectos en la producción. La proteína microbiana formada a partir de los compuestos de NNP tiene un alto valor nutritivo, y cualquier incorporación de nitrógeno proveniente de la urea a los tejidos corporales, dependerá de la ureasa microbiana (Church y Pond 1992).

Boguhn *et al.* (2006) afirman que la cantidad y calidad de la proteína cruda microbiana sintetizada en el rumen desempeña una importante función en la provisión de aminoácidos. Además, para un óptimo crecimiento microbiano se requiere de una tasa de 2.0 g de N disponible por 100 g de materia orgánica degradable. Esta cantidad es adecuada cuando los animales son alimentados con suficiente forraje, no así cuando se alimentan con granos, ya que estos limitan la síntesis de proteína microbiana por la resistencia a la degradación microbiana ruminal (Bach *et al.* 2005).

La tasa de degradación de carbohidratos y proteínas en el rumen es el principal factor que controla la disponibilidad de energía y nitrógeno para el crecimiento microbiano (Rotger *et al.* 2006), por lo que el aporte

sincronizado de estos elementos favorece la fermentación ruminal, ya que con dietas basadas en forrajes de baja calidad, la eficiencia de síntesis de proteína microbiana es baja por la digestión lenta de los carbohidratos y por la tasa de dilución partícula-líquido, que también resulta lenta (Karsli y Russell 2001).

La concentración de amoníaco ruminal ha sido usada como un indicador de la degradación microbiana de proteína *in vivo* e *in vitro*, y también de la utilización de NNP (Olmos-Colmenero y Broderick 2006). El reemplazo excesivo de proteína verdadera con NNP puede llevar a una deficiencia de proteína en animales altamente productivos (NRC 2001).

En el rumen, el suministro de urea o de alguna fuente de NNP provoca que estos compuestos nitrogenados sean atacados por la flora ruminal en presencia de ácidos grasos volátiles (AGV), los cuales proporcionan esqueletos de carbono y se transforman a aminoácidos. Es decir, los AGV se aminan (NRC 2001).

El uso de bloque multinutricional es una de las formas más prácticas de ofrecer suplemento nutricional al ganado en pastoreo en condiciones extensivas durante la época de sequía. En este período el pasto seco no cumple con las necesidades nutritivas mínimas requeridas por el animal. Gracias a la facilidad de su suministro

al ganado, permite la autorregulación del consumo de suplemento y favorece la distribución del pastoreo en el potrero.

Varios modelos estocásticos han sido utilizados y comparados para describir la producción de gas de diversos tipos de alimentos (Groot *et al.* 1996 y Cone *et al.* 2002). La técnica de PG *in vitro* está relacionada exclusivamente con la fermentación, excluyendo la digestibilidad general del tubo digestivo. La fermentación en el rumen es principalmente el resultado de la actividad enzimática de bacterias, protozoarios y hongos que lo habitan (Williams 2000).

Las ventajas de este método, comparado con otros métodos enzimáticos, es que toma menos tiempo y reduce los errores debidos al lavado, filtración y pesaje. Además, permite la estimación de un gran número de muestras y el uso de pocos animales durante largos períodos (Williams 2000).

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del nivel de urea (NU) en bloques multinutricionales, así como de diferentes proporciones de pasto seco, suplemento en forma de bloque multinutricional, en la producción de gas, ácidos grasos volátiles y nitrógeno amoniacal *in vitro*.

Materiales y Métodos

El pasto seco se obtuvo de un pastizal mediano abierto, cuyas especies predominantes son *Bouteloua* spp., del rancho experimental «Teseachi», propiedad de la Universidad Autónoma de Chihuahua, el cual se localiza al noroeste del estado de Chihuahua, en México.

Se evaluaron doce tratamientos, mediante un diseño completo al azar, con arreglo factorial de 4 x 3, cuyos factores principales fueron los cuatro niveles de urea en bloques multinutricionales, combinados con tres niveles

de bloque multinutricional como suplemento en dietas basadas en pasto seco. Los niveles de urea en los bloques multinutricionales fueron 0, 2.5, 5 y 7.5 %. Los niveles de bloque multinutricional en las muestras fueron de 6, 12 y 18 % (en base húmeda). El resto de la dieta fue pasto seco (tabla 1).

Las variables medidas fueron producción de gas (mL/200 mg MS), evaluada a través del tiempo a diferentes horas de incubación (2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72 y 96 h) mediante el modelo monofásico no lineal para producción de gas, propuesto por Groot *et al.* (1996).

Los bloques multinutricionales tuvieron como ingredientes harinolina, melaza de caña, sebo animal, minerales, vitaminas y aglutinantes patentados. Los bloques con los cuatro niveles de urea se elaboraron con 25 ± 1 % de proteína cruda (B. H.) por el método de secado químico. Este es patentado y se utilizó con la asesoría de una empresa privada.

Las muestras de pasto seco se recolectaron al azar, en abril, y procedían de cuatro transeptos representativos del área, de un potrero de 260 ha, ubicado en el rancho «Teseachi». Se obtuvieron 20 muestreos de cada transecto, por lo que el número total de muestras fue 80. Posteriormente, las muestras de pasto seco, utilizadas para la elaboración de los tratamientos, así como las de bloque de proteína, se trituraron en un molino marca Wiley®, modelo 3375-E50, con una criba de 1 mm. Con las proporciones adecuadas de los tratamientos descritos, se elaboraron mezclas homogéneas.

Para determinar el valor nutritivo de las dietas, se realizó el análisis proximal (AOAC 2006) a la muestra de pasto seco y a los bloques multinutricionales (tabla 2).

Tabla 1. Combinaciones de los efectos principales y composición química en los diferentes tratamientos utilizados en el estudio

Tratamiento	Urea ^a	Bloque	Pasto	MS ^b	PC ^c	EE ^d	CEN ^e	FC ^f
1	0.0	6.0	94.0	95.70	6.19	0.80	7.09	39.28
2	2.5	6.0	94.0	95.99	6.09	0.80	7.09	39.18
3	5.0	6.0	94.0	95.55	6.47	0.81	7.32	39.02
4	7.5	6.0	94.0	95.91	5.86	0.80	7.62	38.75
5	0.0	12.0	88.0	95.13	7.63	1.03	8.28	37.39
6	2.5	12.0	88.0	95.70	7.45	1.03	8.28	37.19
7	5.0	12.0	88.0	94.82	8.21	1.06	8.74	36.87
8	7.5	12.0	88.0	95.54	6.98	1.04	9.35	36.34
9	0.0	18.0	82.0	94.55	9.07	1.27	9.47	35.50
10	2.5	18.0	82.0	95.41	8.80	1.27	9.47	35.20
11	5.0	18.0	82.0	94.09	9.94	1.31	10.16	34.72
12	7.5	18.0	82.0	95.18	8.10	1.28	11.07	33.93

^a % de urea en el bloque multinutricional

^b MS = Contenido de Materia Seca del tratamiento

^c PC = Contenido de Proteína Cruda del tratamiento

^d EE = Contenido de Extracto Etereo del tratamiento

^e CEN = Contenido de Cenizas del tratamiento

^f FC = Contenido de Fibra Cruda del tratamiento

Tabla 2. Composición química del pasto seco y los bloques multinutricionales empleados en el experimento (base seca).

Ingrediente	%					
	Urea ^a	PC ^b	EE ^c	CEN ^d	MS ^e	FC ^f
Pasto seco	-	4.74	0.56	9.40	96.28	41.17
Bloque A	0.0	28.77	4.51	7.43	86.70	9.68
Bloque B	2.5	27.26	4.50	7.42	91.49	8.00
Bloque C	5.0	33.59	4.71	7.04	84.13	5.38
Bloque D	7.5	24.37	4.58	6.53	90.18	0.95

^a El porcentaje de urea va contenido en el bloque de proteína.

^b PC = Proteína cruda

^c EE = Extracto etéreo

^d CEN = Cenizas

^e MS = Materia seca

^f FC = Fibra cruda

La producción de gas se midió de acuerdo con la técnica de Menke y Steingass (1988). El fluido ruminal para todos los tratamientos se obtuvo de un novillo de raza pura Aberdeen-Angus, con peso promedio durante el estudio de 315 kg. El novillo se alimentó con bloques de proteína con 5 % de urea y con heno de avena *ad libitum*. Los muestreos de fluido ruminal se hicieron durante septiembre y octubre, con siete días de intervalo entre cada uno de los cinco muestreos. El muestreo de líquido ruminal se realizó 20 min antes de iniciar la incubación. Esta se llevó a cabo en la mañana, considerando que los microorganismos son más consistentes en su composición y actividad (Menke y Steingass 1988).

Las jeringas permanecieron durante 24 h a una temperatura de 39 °C dentro de un incubador (Incubator shaker modelo I2400). Se tomaron las lecturas del desplazamiento de los pistones a las 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72 y 96 h. Este procedimiento se realizó cinco veces consecutivamente, y dio el número de repeticiones del experimento.

Después de las 96 h, el líquido ruminal contenido de las jeringas se centrifugó durante 10 min. a 3500 rpm y se filtró. El líquido sobrenadante se dividió en dos para analizar posteriormente el contenido de amoníaco (Preston 1986) y el de ácidos grasos volátiles (Galyean y May 1995).

Se estableció un programa de flujos-temperatura para la cuantificación cromatográfica de AGV (acético, propiónico y butírico) en líquido ruminal, utilizando un cromatógrafo de gases modelo SRI-8610, con un detector FID y una columna EC-1000.

Como condiciones óptimas resultantes, la temperatura inicial fue de 90 °C, con incremento de 10 °C/min hasta 100 °C. De ahí con incremento de 2 °C/min hasta 110 °C, luego con aumento de 5 °C hasta 120 °C, y de esa temperatura a 10 °C/min hasta 130 °C.

Para ajustar los valores de las variables de amoníaco y ácidos grasos volátiles, se utilizó el modelo descrito por Galyean y May (1995). Para la variable de producción de gas se hizo un ajuste de los datos observados con un

modelo monofásico no lineal, descrito por Groot *et al.* (1996).

La producción de gas en los períodos de tiempo medidos en cada una de las muestras fue estimada por la siguiente ecuación:

$$G = \frac{A}{1 + \frac{B^C}{t^C}}$$

Donde:

G = Predicción de producción de gas (mL) por 200 mg de MS incubada para un tiempo dado de incubación

A = Asíntota de producción de gas

B = Tiempo medio de producción de gas después de incubación

C = Constante que determina el cambio del perfil

t = Variable predictiva que representa el tiempo de incubación en horas

Los valores iniciales de los parámetros A , B y C se ajustaron sobre la base del modelo monofásico, utilizando el PROC NLIN del programa SAS (2004) para las repeticiones de los diferentes tratamientos. Con los valores de los parámetros A , B y C se utilizaron un conjunto de ecuaciones, descritas por los mismos autores del modelo, para estimar los parámetros tI , R y t_{Rm} .

Todos los análisis se realizaron mediante el procedimiento de Modelos Lineales Generales (PROC GLM) del programa SAS (2004).

Resultados y Discusión

Los resultados del análisis del pasto seco y de los bloques multinutricionales se muestran en la tabla 2. El bloque con 7.5 % de urea tuvo el contenido de proteína cruda más bajo (24.37 %). Tal vez esto se deba a las pérdidas de amoníaco durante el proceso de elaboración de los bloques en el momento de mezclar los ingredientes. La presencia de melaza, ácido fosfórico y los diferentes reactivos utilizados en la elaboración de los bloques con secado químico favorece reacciones exotérmicas que producen temperaturas elevadas en la mezcla de ingredientes, lo que hace que el amoníaco se desprenda

más fácilmente. Esto se constató porque en la elaboración del bloque de 7.5 % de urea se percibió un olor a amoníaco más fuerte. Esto sugiere que al agregar cantidades elevadas de urea en este tipo de bloques pueden producirse algunas pérdidas de nitrógeno, y pudiera ocurrir una sobreestimación de la proteína calculada a la proteína que realmente contienen los bloques.

Otro factor que pudo influir en la disminución de la proteína cruda de los bloques con 7.5 % de urea fue el escurrimiento de melaza que presentaron, debido a que la mayor parte de la proteína de estos bloques la proporcionó la urea, que se encontraba disuelta en la melaza que se perdió. Los bloques de los tratamientos de 0 y 7.5 % de urea no presentaron una forma física adecuada ni práctica para su uso convencional, ya que al tratar de adecuar su presentación cambió la concentración de nutrientes requeridos para este estudio.

El volumen promedio de gas producido, predicho con el modelo de Groot *et al.* (1996) en los diferentes períodos de lectura de incubación en los doce tratamientos evaluados, se muestra en la tabla 3. La producción promedio de gas se incrementó conforme avanzó el tiempo de incubación en todos los tratamientos.

En las primeras horas de incubación se fermenta la fracción proteica de los forrajes, ya que es altamente soluble (Cone *et al.* 2002). Debido a que el pasto seco utilizado en este estudio tiene un contenido bajo en proteína cruda (4.74%), es posible que no se hayan observado diferencias significativas entre los tratamientos en las primeras horas de incubación por la ausencia de carbohidratos altamente solubles. Al respecto, Cone *et al.* (2002), mencionaron que la degradación de dietas de pasto es más baja con respecto a otros tipos de forrajes

por la baja disponibilidad de los sustratos, y sugieren que los microorganismos necesitan adaptarse a las propiedades de los forrajes.

En este estudio se empezaron a observar diferencias significativas ($P < .03$) entre tratamientos a partir de las 6 h, cuando los tratamientos con valor extremo mínimo y máximo de bloque y de urea tuvieron el valor promedio más bajo y el más alto, respectivamente. Es decir, el T4 tuvo la media más baja de producción promedio de gas (1.98 mL/200 mg MS) y el T12 tuvo la media más alta (3.40 mL/200 mg MS). Esta tendencia se mantuvo de forma similar hasta las 12 h, cuando las diferencias entre tratamientos fueron significativas ($P < .01$).

A las 24 h, la producción promedio de gas más baja se obtuvo con el T3 (16.25 mL/200 mg MS). Igualmente, T5 y T7 obtuvieron las producciones promedio de gas más altas (19.81 y 19.23 mL/200 mg MS, respectivamente). Estas tendencias se mantuvieron de manera similar hasta el final de la incubación a las 96 h, cuando la producción promedio más baja se obtuvo con el T3 (31.50 mL/200 mg MS), y la más alta con el T7 (34.33 mL/200 mg MS).

Blümmel *et al.* (2005) refirieron que algunos sustratos con alto volumen de producción de gas tienen comparativamente más proteína y carbohidratos fermentables, lo cual explica lo ocurrido con los tratamientos T5 y T7. En los tratamientos evaluados, la cantidad de proteína y carbohidratos fermentables no incrementó la cantidad de gas producida en forma lineal, sino que es la combinación de estos la que incrementó la disponibilidad de los sustratos.

Tabla 3. Producción de gas *in vitro* (mL/200 mg MS) de los diferentes niveles de urea y de bloque multinutricional a través del tiempo^a.

Nivel (%)		T(x) ^b	Horas de Incubación									
Urea ^c	Bloque		#	2	4	6	8	12	24	48	72	96
0	6	T1	0.29	1.11	2.35	3.92	7.64	18.45	29.14	32.70	34.17	
	12	T2	0.29	1.06	2.20	3.62	6.96	16.81	27.10	30.72	32.27	
	18	T3	0.30	1.07	2.20	3.60	6.83	16.25	26.22	29.90	31.50	
2.5	6	T4	0.24	0.92	1.98	3.34	6.67	17.03	28.06	31.84	33.40	
	12	T5	0.43	1.50	3.03	4.88	9.01	19.81	29.58	32.81	34.18	
	18	T6	0.40	1.34	2.67	4.26	7.81	17.38	26.88	30.34	31.87	
5	6	T7	0.32	1.21	2.55	4.24	8.18	19.23	29.59	32.95	34.33	
	12	T8	0.39	1.36	2.76	4.45	8.26	18.52	28.29	31.67	33.14	
	18	T9	0.52	1.68	3.24	5.04	8.92	18.87	28.28	31.62	33.11	
7.5	6	T10	0.31	1.15	2.39	3.95	7.60	18.10	28.67	32.33	33.89	
	12	T11	0.40	1.39	2.81	4.53	8.39	18.83	28.77	32.17	33.62	
	18	T12	0.58	1.80	3.40	5.23	9.13	19.12	28.53	31.83	33.28	
E.E. ±			0.06	0.13	0.21	0.27	0.36	0.43	0.42	0.43	0.46	
Pr > t			P>0.05	P<0.08	P<0.03	P<0.008	P<.0001	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	P<0.0001	

^a E.E. = Error estándar de la media. MS = Materia seca

^b T(x) = Tratamiento

^c Urea = % de urea incluido en el bloque multinutricional

En los resultados de este estudio hubo una producción de gas compensatoria en las mediciones de las últimas horas, con respecto a los tratamientos que obtuvieron bajas producciones de gas en las primeras horas. Esto quizá se deba a la baja disponibilidad de los sustratos y su resistencia a la fermentación por los microorganismos del rumen durante las primeras horas de incubación y, por otra parte, a la falta de productos rápidamente fermentables en los tratamientos.

Cuando la muestra se incubaba, los microorganismos prefieren la fracción fácilmente disponible, lo que causa una fermentación retrasada de la fracción no soluble. Sin embargo, cuando ambas fracciones se separan en el laboratorio, los microorganismos no tienen oportunidad de elección (Castillo 2004).

Cone *et al.* (2002) informaron que las paredes celulares se rompen conforme transcurre la fermentación, y las proteínas celulares y otros componentes solubles se vuelven accesibles a los microorganismos. La cantidad de fibra cruda de la dieta no afecta la producción de gas (Getachew *et al.* 2004 y Castillo 2004), por lo que la cantidad de pasto seco en la dieta no debe de afectar la producción de gas. Sin embargo, la cantidad de componentes solubles del bloque de proteína es lo que da origen a los diferentes perfiles de producción de gas.

El valor del parámetro A está relacionado con la cantidad de fermentación de un componente en particular de un sustrato (Cone *et al.* 2002). La interacción de los efectos nivel de urea y nivel de bloque no fue significativa ni importante ($P > 0.05$) con respecto a los valores promedio del parámetro A del modelo no lineal. Hubo efecto ($P < 0.02$) del nivel de bloque en los valores promedio del parámetro A. El efecto del nivel de bloque que se encontró en este estudio es de tipo lineal ($P < 0.01$), donde a medida que el nivel de bloque se incrementó en la dieta, los valores promedio del parámetro

A disminuyeron (tabla 4). Esto se debe a que a medida que la cantidad de bloques se incrementa en la ración, aumenta la cantidad de componentes solubles en la dieta, lo que hace que se alcance más rápido la tasa fraccional de fermentación y, como consecuencia, se consiga más rápido la asíntota de la curva de producción de gas (parámetro A).

Groot *et al.* (1996) informaron que la tasa fraccional máxima de fermentación (R_m) se puede lograr rápidamente durante la incubación de los componentes solubles, lo que coincide con resultados obtenidos en este estudio. Castillo (2004) mostró que las diferencias en el parámetro A se pueden deber a las diferentes proporciones de ácidos grasos volátiles presentes en las dietas. No se observó efecto significativo del nivel de urea en el bloque en los valores promedio del parámetro A.

Hubo interacción entre los efectos del nivel de urea y los del nivel de bloque, la cual resultó altamente significativa e importante ($P < 0.05$) en los valores promedio del Parámetro B. Los valores del parámetro B tendieron a disminuir, cuando existió una fracción soluble presente en el alimento, mientras que para las fracciones no solubles sucedió lo contrario (Cone *et al.* 2002).

La interacción mostró que los niveles altos de bloque, pero bajos en nivel de urea tuvieron valores altos en el parámetro B. Estos valores disminuyeron conforme se aumentó el nivel de urea en el bloque. Según disminuyen los valores del parámetro B, se puede entender como una aceleración en la fermentación ruminal. Esto sugiere que la adición de urea produjo aumento en la disponibilidad de sustratos para los microorganismos del rumen.

Este parámetro mide el cambio del perfil de la curva de producción de gas. La interacción de los efectos nivel de urea y nivel de bloque no fue significativa en los valores promedio del parámetro C. Se observó un efecto altamente significativo ($P < 0.01$) del nivel de bloque en

Tabla 4. Parametros de la producción de gas de acuerdo con los tratamientos.

Trat. N°	Urea %	Bloque %	Pasto %	Parámetro					
				A	B	C	t _l	R	t _{Rm}
				h					
1	0.0	6.0	94.0	-	23.54	-	13.58	0.037	23.50
2	2.5	6.0	94.0	-	25.14	-	14.95	0.036	25.66
3	5.0	6.0	94.0	-	22.57	-	12.76	0.038	22.15
4	7.5	6.0	94.0	-	24.10	-	13.36	0.035	23.29
5	0.0	12.0	88.0	-	25.05	-	13.90	0.035	24.14
6	2.5	12.0	88.0	-	21.77	-	11.60	0.038	20.35
7	5.0	12.0	88.0	-	23.08	-	11.97	0.036	21.05
8	7.5	12.0	88.0	-	22.86	-	12.18	0.036	21.35
9	0.0	18.0	82.0	-	25.26	-	13.58	0.033	23.76
10	2.5	18.0	82.0	-	24.08	-	12.21	0.034	21.53
11	5.0	18.0	82.0	-	22.56	-	11.12	0.036	19.69
12	7.5	18.0	82.0	-	22.24	-	11.10	0.037	19.59
EE ±					0.54	-	0.48	0.001	0.74

los valores promedio del parámetro C. El efecto encontrado del nivel de bloque multinutricional en la dieta fue de tipo lineal ($P < .01$). A medida que el nivel de bloque se incrementó en la dieta, los valores promedio del parámetro C disminuyeron. Esto significa que según se incrementa el nivel de bloque, se acelera la fermentación.

Los valores del parámetro C se comportaron de manera similar a los del B (Cone *et al.* 2002). Es decir, disminuyeron, cuando existió fracción soluble presente en el alimento, y para las no solubles, los valores aumentaron. Esto explica claramente que al aumentar el nivel de bloque en la dieta, se aumentó la fracción soluble, por lo que disminuyeron los valores del parámetro C. Sin embargo, no se observó efecto significativo del nivel de urea en el bloque en los valores promedio del parámetro C.

El punto de inflexión (parámetro t_1) de la curva de producción de gas se puede utilizar como un estimador del tiempo después de la incubación, en el cual la mitad de la cantidad asintótica de gas ha sido formada. Esto es de gran utilidad para el ajuste de datos a las diferentes curvas de los modelos multifásicos, donde si las fases son simétricas el parámetro t_1 es igual al parámetro B (Groot *et al.* 1996). En este estudio se encontró interacción entre los efectos del nivel de urea y el nivel de bloque, la cual resultó significativa ($P < 0.01$) con respecto a los valores promedio del parámetro t_1 .

Groot *et al.* (1996) indicaron que existe una relación entre el parámetro t_1 y el B para la estimación de las diversas fases en modelos multifásicos. Sin embargo, en este modelo monofásico el punto de inflexión de la curva de producción de gas (parámetro t_1) no tuvo valores similares a los del tiempo medio de formación de gas después de incubación (parámetro B), aunque los tratamientos muestran similitud en la distribución de los datos del parámetro t_1 , con respecto a los valores promedio del B. Esto indica que dichos parámetros están relacionados.

El parámetro R se incrementa en las etapas iniciales de la incubación, por lo que la población microbiana tiende a multiplicarse y colonizar el sustrato hasta alcanzar un máximo (R_m). Es decir, cuando el tamaño de la población microbiana no limita más la fermentación, y la digestión no se ve impedida por los componentes químicos o estructurales del alimento, entonces R_m puede ser alcanzada rápidamente en la incubación de los componentes solubles, y no requiere de la colonización microbiana bajo densidades altas de microorganismos (Groot *et al.* 1996).

La interacción entre los efectos del nivel de urea y nivel de bloque resultó significativa ($P < 0.07$) para los valores promedio del parámetro R.

Las dietas que contienen una proporción alta de carbohidratos solubles y proteína, los cuales se encuentran altamente disponibles y son rápidamente fermentados, tienen valores bajos de tR_m y valores muy altos de R_m

(Groot *et al.* 1996). Los niveles más altos de bloque con los más bajos de urea tuvieron los valores más bajos en el parámetro R, o sea, presentaron menor cantidad de componentes solubles. Estos valores del parámetro R tendieron a aumentar, conforme se incrementaron los niveles de urea en el bloque. Sobre la base de lo informado por Groot *et al.* (1996), el parámetro R se alcanzó más rápidamente en los tratamientos con mayor cantidad y disponibilidad de los componentes solubles. Se observó que el nivel de urea en el bloque aumentó la disponibilidad de los sustratos a los microorganismos ruminales, favoreciendo la fermentación. Los valores de R_m son bajos para forrajes, pero una vez que R_m ha sido alcanzada, la tasa fraccional de fermentación puede declinar rápida o gradualmente. Una caída rápida de los valores del parámetro R puede ocurrir después de que han sido consumidos los componentes del sustrato, que es más común en el caso de que la dieta tenga un alto contenido de componentes solubles. Para los componentes insolubles, asociados con la fracción de las paredes celulares de los sustratos, es común que el parámetro R disminuya lentamente, cuando las barreras químicas o estructurales se imponen por el componente del alimento. La cristalización de la celulosa y de la acción tóxica de los compuestos fenólicos de las paredes celulares imponen barreras químicas a la digestión. Estas características están relacionadas con factores como la especie de la planta, estado de madurez y pre tratamiento químico. Las limitaciones estructurales para la digestión pueden tener también una naturaleza diversa, así que la función de las barreras estructurales depende de la anatomía de la planta y del tamaño de partícula (Groot *et al.* 1996).

Cuando la población microbiana se multiplica y coloniza el sustrato para digerir los componentes insolubles del alimento, se alcanza el máximo de la tasa fraccional de fermentación (R_m) (Groot *et al.* 1996), y el tiempo de incubación en el que este proceso ocurre es el tR_m . Se observó interacción entre los efectos del nivel de urea y los del nivel de bloque, la cual resultó significativa ($P < .05$) con respecto a los valores promedio del parámetro tR_m . Los valores del parámetro t_{R_m} en los diferentes niveles de bloque mostraron tendencia a disminuir, conforme aumentó el nivel de urea en el bloque. Esto indica que el tiempo de máxima tasa fraccional de fermentación disminuyó con la adición de urea en el bloque. Es decir, que los componentes insolubles del sustrato son colonizados más rápidamente con niveles más altos de urea.

Se observó que los niveles más bajos de bloque tuvieron valores más altos del parámetro tR_m , lo que sugiere que al aumentar el nivel de bloque se alcanzó más rápido el tiempo de máxima tasa fraccional de fermentación. Esto significa que la fermentación se aceleró. Cuando las proteínas son fermentadas *in vitro*, el proceso lleva a la formación de bicarbonato de amonio ($NH_4 HCO_3$) a partir del CO_2 y el NH_3 , como contribución de

CO₂ a la producción de gas (Menke y Steingass 1988). Por tanto, se debe tener en cuenta una posible subestimación de los valores de producción de gas por los métodos *in vitro*.

La interacción entre el efecto del nivel de urea y el nivel de bloque no fue significativa en el contenido promedio de nitrógeno amoniacal. Se observó efecto significativo (P < 0.01) del nivel de bloque en el contenido promedio de nitrógeno amoniacal (tabla 5). El efecto encontrado fue de tipo lineal (P < 0.01), donde a medida que el nivel de bloque se incrementó en la dieta, la cantidad promedio de amoniaco también aumentó en el líquido ruminal. Esto es de suponer porque aumentó la cantidad de nitrógeno total en la dieta (tabla 1), donde los tratamientos con mayor contenido de bloque multinutricional tuvieron más contenido de proteína cruda.

La concentración de nitrógeno amoniacal en el rumen depende directamente de la degradabilidad ruminal de las fracciones nitrogenadas que componen la dieta, de modo que conforme aumenta la proporción de proteína no degradable en rumen, disminuye la concentración de nitrógeno amoniacal en el rumen (Cecava y Parker 1993). Sin embargo, el bajo contenido de nitrógeno parece ser más importante que el alto contenido de fibra de los forrajes. La baja digestibilidad de los forrajes, debido a la baja disponibilidad de los sustratos nitrogenados, dependerá de cada forraje en particular. Los forrajes con alto contenido de nitrógeno, alto contenido de fibra y baja digestibilidad son los más afectados (Dixon *et al.* 2003).

Hubo efecto (P < 0.13) del nivel de urea en la producción promedio de nitrógeno amoniacal porque las diferencias (1.008 ± .81 mg/100mL) entre las medias de mínimos cuadrados tienen una importancia práctica (tabla 6). Esto concuerda con lo que informan Cecava y

Parker (1993), quienes encontraron mayores concentraciones de nitrógeno amoniacal cuando la dieta contenía urea, en lugar de otras fuentes de proteína. El efecto del nivel de urea en este estudio es de tipo cúbico (P < 0.09), donde la producción promedio más alta de nitrógeno amoniacal ocurrió en los niveles de urea de 2.5 y 7.5 %, y los más bajos se dieron en los niveles de 0 y 5 %. En dicho efecto, el nivel de 5 % de urea mostró disminución en la concentración promedio de nitrógeno amoniacal (15.63 mg N-NH₃/100 mL), respecto al nivel de 2.5 % de urea (16.13 mg N-NH₃/100 mL). Esta disminución se debió, probablemente, a la síntesis más eficiente de proteína microbiana, ya que las cantidades de sustrato requeridas por los microorganismos fueron más eficientes para la síntesis de proteína microbiana en la dieta con la proporción de ingredientes del bloque de proteína con 5 % de urea.

Dixon *et al.* (2003) mencionaron que cuando se incluye urea en la dieta, la concentración de amoniaco aumenta rápidamente después de la alimentación, pero decrece aproximadamente 12 h después. Esta rápida disminución se debe, probablemente, a la incorporación de nitrógeno amoniacal a la proteína microbiana. Esto sucede cuando se fermentan los azúcares de la melaza, pero también debido a la rápida absorción de amoniaco por las paredes del rumen.

La concentración de N-NH₃ en el rumen es un balance que resulta entre la producción y el uso del N-NH₃. Este uso se explica por la utilización de N-NH₃ por los microorganismos ruminales o por la absorción llevada a cabo en las paredes del rumen. Este es un nutriente crítico para los microorganismos ruminales y se ha encontrado en concentraciones con un amplio rango, desde 1 hasta 22.1 mg/100 mL (McCullum y Horn 1990, citados por Bodine y Purvis 2003).

Tabla 5. Efecto del nivel de bloque de la dieta en el contenido de amoniaco y AGV.

Bloque	Pasto	Parámetro						NH ₃			AGV		
		A	B	C	T1	R	T _m	mg/100mL	Acetico	Propionico	Butirico		
%		h							mM /L				
6	94.0	20.89	-	1.99	-	-	-	14.55	90.76	20.89	7.52		
12	88.0	20.49	-	1.89	-	-	-	16.15	90.01	20.49	7.30		
18	82.0	19.98	-	1.83	-	-	-	17.08	89.96	19.98	7.27		
EE		0.31	-	0.02	-	-	-	0.29	1.09	0.31	0.22		

Tabla 6. Influencia del nivel de urea en el contenido de amoniaco y AGV.

Bloque	Parámetro						NH ₃			AGV		
	A	B	C	T1	R	T _m	mg/100mL	Acetico	Propionico	Butirico		
%	h							mM /L				
0	20.70	-	1.95	-	-	-	15.47	90.59	20.70	7.59		
2.5	20.51	-	1.92	-	-	-	16.13	90.32	20.51	7.23		
5	20.62	-	1.87	-	-	-	15.63	90.73	20.62	7.31		
7.5	19.98	-	1.87	-	-	-	16.48	89.33	19.98	7.33		
EE	0.36	-	0.03	-	-	-	0.33	1.26	0.36	0.25		

Las concentraciones ideales de amoníaco requeridas en el rumen para una fermentación ruminal más eficiente han sido informadas por diversos autores con resultados muy heterogéneos (Mejía 2000). Este factor es importante al considerar que es necesario un óptimo crecimiento microbiano para lograr una tasa eficiente de fermentación ruminal, lo que se va a reflejar en una adecuada síntesis de proteína microbiana (Cecava y Parker 1993). La concentración de nitrógeno amoniacal en el líquido ruminal después de la digestión tendió a aumentar, conforme se incrementaron los niveles de consumo de bloque multinutricional y los niveles de urea en el bloque. Sin embargo, este incremento en la concentración de nitrógeno amoniacal se afectó mayormente por el nivel de bloque en la dieta, con respecto al nivel de urea en el bloque. Esto indicó que es importante controlar que el consumo de alimento por parte de los animales sea el adecuado para mejorar el rendimiento productivo.

No se observó efecto alguno de la interacción del nivel de urea con el nivel de bloque en el contenido promedio de ácido acético, así como tampoco hubo efecto en los factores principales por separado (tablas 5 y 6).

Mejía (2000) no encontró efecto significativo en la concentración total de ácidos grasos volátiles con la utilización dietas con proteína degradable en rumen, algunas de las cuales contenían urea. Van Soest (1994) refirió que la literatura coincide en afirmar que el uso de fuentes de proteína no degradables en rumen no modifica la producción de ácidos grasos volátiles. Agregó que este parámetro se modifica básicamente por el tipo de dieta, la relación forraje-concentrado, el nivel de consumo y el empleo de aditivos, entre otros. Sin embargo, Griswold *et al.* (2003) informaron que la concentración total de ácidos grasos volátiles y el porcentaje molar individual de valerato aumentaron significativamente, como resultado de la infusión de urea en la saliva artificial en un experimento con dos niveles de urea, y dos de proteína degradable en el rumen. Estos mismos autores encontraron que la infusión de urea provoca ($P = 0.08$) aumento en el porcentaje molar de acetato. Encontraron además, que las dietas con mayor cantidad de proteína degradable en el rumen (11 % de la dieta en base a materia seca) aumentaron significativamente el porcentaje molar de isobutirato, con respecto a las dietas con menor cantidad (8 % de la dieta en base a materia seca).

Sin descartar la posibilidad de que estos resultados sean correctos, los valores obtenidos en este estudio no alcanzaron a distinguir estos efectos, debido probablemente a que los rangos de las concentraciones de amoníaco no son lo suficientemente amplios como para encontrar diferencias.

No se encontró efecto de la urea, debido posiblemente a que los niveles de urea utilizados en este estudio no fueron lo suficientemente elevados como para provocar una diferencia significativa en las concentra-

ciones de amoníaco del líquido ruminal, y de esta manera distinguir efectos en las concentraciones promedio de ácido acético de los diferentes tratamientos. Los resultados también pueden obedecer a que siempre hubo presencia de carbohidratos altamente fermentables en ingredientes como la melaza, lo que permitió que los microorganismos la utilizaran rápidamente.

En la concentración promedio de ácido propiónico no se observó efecto de la interacción entre el nivel de urea y el de bloque, donde las diferencias entre las medias de mínimos cuadrados no presentaron importancia práctica. Así como tampoco hubo efecto del nivel de bloque y de urea en la concentración promedio de este ácido. No se observó efecto de la interacción del nivel de urea con el nivel de bloque en el contenido promedio de ácido butírico, así como tampoco hubo efecto en los factores principales. Esto concuerda con lo obtenido por Mejía (2000), quien no encontró efectos de tratamiento en la proporción molar de ácido butírico, agregando diferentes fuentes de proteína degradable en rumen.

Para la utilización de bloques multinutricionales como suplemento de la dieta, en condiciones similares a las de este estudio, se sugiere aplicar la combinación de 5 % de urea y 12 % de bloque, ya que mostró el mejor comportamiento en los indicadores evaluados. No obstante, es necesario conducir nuevas investigaciones para estudiar esta combinación en animales e incluir los estudios económicos.

Debido a la complejidad en la toma de lectura durante la producción de gas, es recomendable el uso de aparatos automatizados para realizar mediciones más precisas de la producción de gas. La medición de proteína verdadera puede ser un parámetro útil para estimar la síntesis de proteína microbiana en este tipo de experimento.

Referencias

- AOAC. 2006. Official Methods of Analysis. Ass. Off. Anal. Chem. 18th Ed. Washington, DC. 2000 pp.
- Bach, A., Calsamiglia, S. & Stern, M. D. 2005. Nitrogen Metabolism in the Rumen. *J. Dairy Sci.* 88: 21
- Blümmel, M., Cone, J.W., van Gelder, A. H., Nshalai, I., Umanna, N., Makkar, H.P.S., Becker, K. 2005. Prediction of forage intake using *in vitro* gas production methods: Comparison of multiphase fermentation kinetics measured in an automated gas test, and combined gas volume and substrate degradability measurements in a manual syringe system. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 123:517
- Bodine, T. N. & Purvis, H. T. 2003. Effects of supplemental energy and/or degradable intake protein on performance, grazing behavior, intake, digestibility, and fecal and blood indices by beef steers grazed on dormant native tallgrass prairie. *J. Anim. Sci.* 81:304
- Boguhn, J., Kluth, H. & Rodehutschord, M. 2006. Effect of Total Mixed Ration Composition on Fermentation and Efficiency of Microbial Crude Protein Synthesis *In Vitro*. *J. Dairy Sci.* 89:1580
- Castillo, C. N. Y. 2004. Cinética de fermentación ruminal del ensilaje de cuatro híbridos de maíz mediante las técnicas de digestibilidad *in situ* y producción de gas *in vitro*. Tesis de

- Maestría. Universidad Autónoma de Chihuahua. México. 91 pp.
- Cecava, M. J. & Parker, J. E. 1993. Intestinal supply of amino acids in steers fed ruminally degradable and undegradable crude protein sources alone and in combination. *J. Anim. Sci.* 71: 1596
- Church, D. C. & W. G. Pond. 1992. Fundamentos de Nutrición y Alimentación de Animales. Editorial Limusa. Tercera Edición. México. 438 pp.
- Cone, J. W., A. H. Van Gelder & H. Bachmann. 2002. Influence of inoculum source on gas production profiles. *J. Anim. Feed Sci. and Tech.* 99: 221
- Dixon, R. M., B. J Hosking & A. R. Egan. 2003. Effects of oilseed meal and grain-urea supplements fed infrequently on digestion in sheep: 1. low quality grass hay diets. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 110: 75
- Galyean, M. & May, T. 1995. Laboratory Procedures in Animal Nutrition Research. New Mexico State University. Ed. Department of Animal and Range Sci. E.U.A. 246 pp.
- Getachew, G., Robinson, P. H., De Peters, E. J. & Taylor, S.J. 2004. Relationships between chemical composition, dry matter degradation and *in vitro* gas production of several ruminant feeds. *Anim. Feed. Sci. Tech.* 111: 57
- Griswold, K. E., Apgar, G. A., Bouton, J. & Firkins, J. L. 2003. Effects of urea infusion and ruminal degradable protein concentration on microbial growth, digestibility, and fermentation in continuous cultura. *J. Anim. Sci.* 81:329
- Groot, C. J., Cone, J. W., Williams, B. A., Debersaques, F. M. A. & Lantinga, E. A. 1996. Multiphasic analysis of gas production kinetics for *in vitro* fermentation of ruminant feeds. *J. Anim. Feed Sci. Tech.* 64:77
- Karsli, M. A. & Russell, J. R. 2001. Effects of Some Dietary Factors on Ruminal Microbial Protein Synthesis. *Turk J. Vet. Anim. Sci.* 25:681
- Mejía, H. J. 2000. Efecto de dos fuentes proteicas sobre el comportamiento productivo, fermentación ruminal y cinética digestiva en bovinos productores de carne. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Chihuahua. México. 137 pp.
- Menke, K. H. & Steingass, H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Dev.* 28:55
- NRC. 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. National Academy Press. Seventh Revised Edition. U.S.A. 283 pp.
- Olmos-Colmenero, J.J. & Broderick, G. A. 2006. Effect of Dietary Crude Protein Concentration on Milk Production and Nitrogen Utilization in Lactating Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 89: 170
- Preston, T.R. 1986. Better utilization of crop residues and by-products in animal feeding: Research guidelines. A practical manual for research workers. Ed. FAO. 107 pp.
- Rotger, A., Ferret, A., Manteca, X. J., Ruiz de la Torre, L. & Calsamiglia, S. 2006. Effects of dietary nonstructural carbohydrates and protein sources on feeding behavior of tethered heifers fed high-concentrate diets. *J. Anim. Sci.* 84:1197
- SAS 2004. Statistical Analysis System User's Guide. SAS Institute Inc. Cary. NC. USA
- Van Soest, P. J. 1994. Metabolism of Volatile Fatty Acids. En: XIX Intermediary metabolism nutritional ecology of the ruminant. Second Edition. Cornell University Press. 314 pp.
- Williams, B. A. 2000. Cumulative Gas-production Techniques for Forage Evaluation. En: Forage Evaluation in Ruminant Nutrition. Eds. D.J. Givens, E. Owens, R.F.E. Axford and H.M. Omed. CAB International. pp. 189-213

Recibido: 10 de diciembre de 2008