

**A. García-Rodríguez, I. Goiri, G. Flores, L.M. Oregui**

**EFFECTO DEL CONTENIDO EN NITRÓGENO DEL MEDIO DE INCUBACIÓN  
SOBRE LA PRODUCCIÓN DE GAS Y LA PREDICCIÓN DE LA DIGESTIBILIDAD  
APARENTE DE LA MATERIA ORGÁNICA DE ENSILADOS DE HIERBA**

Separata ITEA

INFORMACIÓN TÉCNICA ECONÓMICA AGRARIA, VOL. **106** N.º 3 (208-220), 2010

## Efecto del contenido en nitrógeno del medio de incubación sobre la producción de gas y la predicción de la digestibilidad aparente de la materia orgánica de ensilados de hierba

A. García-Rodríguez\*, I. Goiri\*, G. Flores\*\*, L.M. Oregui\*

\* Autor para la correspondencia, Teléfono: 902540546. E-mail: aserg@neiker.net  
Neiker-Tecnalia, Granja Modelo de Arkaute, Apdo. 46, 01080 Vitoria-Gasteiz

\*\* Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (CIAM), Apdo. 10, 15080 A Coruña

### Resumen

El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto del contenido en nitrógeno del medio de cultivo sobre la cinética de producción de gas y sobre la estima de la digestibilidad aparente de la materia orgánica de ensilados de hierba. Para ello, se evaluaron mediante la técnica de producción de gas 24 muestras de ensilados de hierba de digestibilidad aparente de la materia orgánica conocida de una colección de muestras del Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo. Los ensilados de hierba se incubaron con líquido ruminal tamponado con medio de cultivo suplementado o no con nitrógeno, y la producción de gas obtenida se ajustó a un modelo basado en la generalización de Michaelis-Menten. De los resultados obtenidos se deduce que la cantidad de nitrógeno aportado por el inoculo bacteriano y el ensilado de hierba no fue suficiente para mantener un óptimo crecimiento microbiano (16,7 vs. 23,1 h necesarias para alcanzar la mitad de la producción potencial de gas en un medio con y sin suplementación de nitrógeno respectivamente;  $P < 0,001$ ). En consecuencia, tanto las correlaciones encontradas entre los parámetros obtenidos del ajuste con un medio no suplementado con nitrógeno con la composición química, o con la digestibilidad aparente fueron peores que los obtenidos con medio suplementado. Todo ello condujo a unas peores ecuaciones de predicción de la digestibilidad aparente al utilizar el medio de cultivo no suplementado en nitrógeno ( $r^2 = 0,519$ ) frente a otro suplementado ( $r^2 = 0,758$ ).

**Palabras clave:** *in vitro*, rumen, valoración alimentos.

### Summary

#### Effect of incubation medium nitrogen content on gas production and prediction of apparent organic matter digestibility of grass silage

This assay was carried out in order to evaluate the effect of the culture medium N content on gas production and on apparent organic matter digestibility prediction of grass silage. To carry out this experiment, 24 grass silage samples of known apparent organic matter digestibility were selected from the collection belonging to the Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo. Samples were incubated in buffered rumen fluid supplemented and non supplemented with nitrogen and the obtained cumulative gas production was adjusted to a generalized Michaelis-Menten model. Culture medium and sample nitrogen content were not high enough to allow an optimal microbial growth and activity (16.7 vs. 23.1 h to obtain the half of potential gas production with and without nitrogen supplementation;  $P < 0.001$ ). As a consequence, the correlations between the gas production parameters obtained with a non supplemented medium and the chemical constituents or the apparent organic matter digestibility were worse than those obtained with a supplemented culture medium. All these results led to a worse apparent organic matter digestibility predictive equation when a non supplemented nitrogen culture medium was used ( $r^2 = 0.519$ ) compared with those obtained with supplemented medium ( $r^2 = 0.758$ ).

**Key words:** *in vitro*, rumen, feedstuff evaluation.

## Introducción

La técnica de producción de gas es una metodología *in vitro* barata y sencilla que se ha venido utilizado en la valoración de los alimentos (Menke et al., 1979; Khazaal et al., 1993). No obstante, la relación entre los parámetros de producción de gas y las características de los alimentos, en especial con la digestibilidad, puede verse afectada por diversos factores. Entre ellos cabría destacar la influencia de la composición del medio de cultivo, y en particular, su contenido en nitrógeno (Rymer et al., 1999).

Es preciso tener en cuenta que en muchos ensayos *in vivo* los alimentos se aportan sin ningún aporte adicional de nitrógeno. Por lo tanto, se podría pensar que empleando un medio no suplementado en nitrógeno, la técnica de producción de gas podría estar simulando mejor las condiciones del ensayo *in vivo*, lo que permitiría mejores estimas de la digestibilidad aparente de la materia orgánica (DMO). De hecho, en los primeros estudios dirigidos a obtener estimas de la DMO utilizando esta técnica, se empleó un medio de cultivo no suplementado en nitrógeno (Menke et al., 1979).

La disponibilidad de nitrógeno afecta principalmente a la cinética de producción de gas (Dryhurst y Wood, 1998). Al ser esta la característica con una mayor relación con la DMO (Khazaal et al., 1993), el aporte o no de nitrógeno al medio de cultivo podría afectar a la estima de la DMO obtenida mediante la técnica de producción de gas.

Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue analizar el efecto del contenido en nitrógeno del medio sobre la cinética de producción de gas, sobre la correlación entre los parámetros de producción de gas y la composición química o la DMO, y sobre la estima de la DMO de ensilados de hierba.

## Materiales y Métodos

### Ensilados de hierba

Se seleccionaron 24 muestras de ensilado de hierba (tabla 1) pertenecientes a una colección de 197 muestras, de digestibilidad aparente conocida, evaluadas desde 1984 en el Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo (CIAM). Esta colección incluye ensilados de características diferentes, tanto en lo que se refiere a las características de la pradera (localización geográfica, composición botánica, precocidad del corte o número del ciclo de aprovechamiento), como en lo referente a la tecnología utilizada para realizar el ensilado (tipo de silo, realización de prehenificado o tipo de cosechadora).

### Análisis químico

De forma paralela a la evaluación de la digestibilidad, de cada alimento se tomaron dos submuestras. Una de ellas fue secada en estufa de aire forzado Unitherm, a 80 °C, durante 16 horas, para la determinación por gravimetría del contenido en materia seca (MS), mientras que la otra se conservó sin desecar. El contenido en MS se corrigió por las pérdidas de volátiles durante el secado en estufa siguiendo la metodología propuesta por Dulphy y Demarquilly (1981), aplicando una corrección de 10,3 g kg<sup>-1</sup> al valor obtenido tras el análisis gravimétrico.

La submuestra no desecada se empleó para la determinación de pH, N-total y N-amoniaco. Para ello, de acuerdo a la metodología desarrollada por Laboratorio Agrario e Fitopatológico de Mabegondo, se realizaron tres fracciones. Con la primera fracción se realizó un macerado, para lo que se mezclaron 50 g de muestra y 150 ml de agua destilada a temperatura ambiente durante 2 horas. El sobrenadante resultante se empleó para la determinación del pH, median-

Tabla 1. Medias, error estándar (s.e.) y rango obtenidos para la composición química, indicadores de la fermentación del ensilado y digestibilidad aparente  
 Table 1. Means, standard error (s.e.) and range obtained for the chemical composition, silage fermentative indicators and apparent digestibility

	Ensilado de hierba (n=24)		
	Media	s.e.	Rango
<i>Composición química (g kg<sup>-1</sup> MS<sub>c</sub>)</i>			
Materia Seca (MS <sub>c</sub> )	234,3	83,7	143,0-528,0
Proteína Bruta (PB)	142,2	39,0	60,5-242,3
Nitrógeno soluble (% N total)	49,28	12,26	27,59-71,43
NH <sub>3</sub> (% N total)	9,09	4,66	2,92-16,58
Fibra Neutro Detergente (FND)	518,7	77,6	341,2-637,3
Fibra Acido Detergente (FAD)	357,0	49,8	251,6-458,1
Lignina Acido Detergente (LAD)	65,3	22,3	34,6-122,0
Celulosa (CEL)	26,3	4,2	14,9-34,4
<i>Indicadores de la fermentación del ensilado</i>			
pH	4,27	0,30	3,60-4,90
NH <sub>3</sub> (% MS <sub>c</sub> )	0,23	0,10	0,04-0,63
<i>Determinaciones in vivo (g kg<sup>-1</sup>)</i>			
Digestibilidad aparente de la materia orgánica	664,3	80,2	508,6-804,8

s.e.: error estándar.

MS<sub>c</sub>: Materia seca corregida por pérdida de volátiles según Dulphy y Demarquilly (1981).

te pHmetro provisto de electrodo combinado, y del N-amoniaco, usando un electrodo selectivo (Orion). La segunda fracción se empleó para la realización de un segundo macedado, con agua destilada a 80 °C determinándose el N-soluble mediante digestión macro Kjeldahl, según el método oficial n° 3 del (Mapa, 1995), seguido por destilación y determinación volumétrica del ión amonio. El contenido en nitrógeno-total (Nt) se realizó sobre la tercera fracción, mediante la digestión macro Kjeldahl descrita anteriormente.

La submuestra desecada se utilizó para la evaluación del contenido en humedad residual, cenizas (CZ), proteína bruta (PB), fibra neutro detergente (FND), fibra ácido deter-

gente (FAD), celulosa (CEL) y lignina ácido detergente (LAD).

El contenido en humedad residual y CZ se determinó mediante desecación a 102 °C y posterior calcinación secuencial a 460 °C en un analizador termogravimétrico MAC500 (LECO Corporation, St Joseph, MI, EEUU), siendo expresado el valor de materia orgánica (MO) como 1000-CZ. La proteína bruta resultó de multiplicar por 6,25 el contenido de N total obtenido del análisis de la muestra mediante digestión micro Kjeldahl. La determinación de FND se efectuó siguiendo el procedimiento propuesto por Van Soest *et al.* (1991), y la de FAD y CEL según Goering y Van Soest (1970). La determinación del contenido

en LAD se realizó a partir del residuo insoluble en detergente, mediante el método lignina-sulfúrico de Goering y Van Soest (1970). Los contenidos de FND y FAD se expresaron libre y con cenizas, respectivamente.

#### Determinación de la digestibilidad aparente

Para la evaluación de la DMO, realizada en el CIAM, se utilizaron un mínimo de cinco carneros castrados de raza gallega de más de dos años de edad, alojados en jaulas metabólicas dotadas de separadores de heces y orina. Los animales, que disponían de bloques de corrector vitamínico-mineral a libre disposición, recibieron ensilado como único alimento. El nivel de alimentación fue *ad libitum*, ajustándose la oferta para permitir un 10% de rechazo. El alimento fue ofrecido diariamente en una única comida, a primera hora de la mañana, sin ningún tipo de suplementación externa de nitrógeno.

Los carneros dispusieron de un periodo de aclimatación a cada ensilado y a las jaulas metabólicas de 10 días. El ensayo de digestibilidad se prolongó 11 días más, en los que se cuantificó diariamente el alimento ofrecido y rechazado. Se tomaron alícuotas equivalentes al 10% del alimento ofrecido y rechazado diariamente. Igualmente, se determinó la producción de heces, tomándose una muestra equivalente al 20% de la cantidad total producida por cada animal. Las muestras tomadas diariamente se acumularon y se congelaron a  $-27\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el final del ensayo para su posterior análisis físico-químico. Finalmente, la DMO se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$DMO(\text{gkg}^{-1}) = 1000 \times \frac{(MO_i - MO_e)}{MO_i}$$

donde  $MO_i$  y  $MO_e$  son la cantidad de MO ingerida y excretada, respectivamente.

#### Ensayos de producción de gas

Cada muestra se incubó por triplicado en dos series independientes realizadas en semanas diferentes. En cada serie se incubaron las mismas muestras de forma paralela en medio suplementado (McDougall, 1948) o no suplementado (Menke *et al.*, 1979) con nitrógeno. La composición de ambos medios de incubación se indica en la tabla 2. El aporte de nitrógeno del medio de cultivo suplementado con N ( $\text{N}^+$ ) se calculó como la suma de la cantidad aportada por la solución tampón y la solución reductora. Ambas contribuyeron al medio de cultivo final en un 21% y 6% (v/v), respectivamente.

Una descripción detallada del procedimiento llevado a cabo para la determinación de la producción de gas se puede encontrar en García-Rodríguez *et al.* (2005). Señalar que al comienzo de cada serie se determinó el contenido en  $\text{NH}_3$  del líquido ruminal utilizado como inóculo siguiendo el procedimiento descrito por Weatherburn (1967).

#### Ajuste de la producción de gas

La curva de producción acumulada de gas del ensilado de hierba se ajustó mediante el modelo propuesto por Groot *et al.* (1996). Este modelo toma la forma:

$$G = \frac{A}{(1 + B^c/t^c)}$$

Donde G ( $\text{ml g}^{-1}$  MO) es la producción de gas a tiempo "t", y "A", "B" y "c" son constantes. Así, "A" ( $\text{ml g}^{-1}$  MO) representa la producción potencial de gas, "B" (h) es el tiempo de incubación para el que se alcanza la mitad de la producción potencial de gas, y "c" es una constante adimensional que determina la forma de la curva.

A partir de los parámetros "B" y "c" se puede calcular la tasa de producción de gas (R,

Tabla 2. Composición y cantidades aportadas del medio suplementado en N (N<sup>+</sup>) o no (N<sup>-</sup>)  
 Table 2. Composition and quantity added of medium supplemented (N<sup>+</sup>) or not (N<sup>-</sup>)

	N+	N-
<b>Solución de macrominerales</b>	<b>208 ml l<sup>-1</sup></b>	<b>237 ml l<sup>-1</sup></b>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	9,45 g l <sup>-1</sup>	5,70 g l <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,20 g l <sup>-1</sup>	6,20 g l <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,60 g l <sup>-1</sup>	0,60 g l <sup>-1</sup>
<b>Solución tampón</b>	<b>208 ml l<sup>-1</sup></b>	<b>237 ml l<sup>-1</sup></b>
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	4,00 g l <sup>-1</sup>	
NaHCO <sub>3</sub>	35,00 g l <sup>-1</sup>	38,28 g l <sup>-1</sup>
<b>Solución reductora</b>	<b>62 ml l<sup>-1</sup></b>	<b>71,3 ml l<sup>-1</sup></b>
Cisteína-HCl	6,25 g l <sup>-1</sup>	
1M NaOH	40 ml l <sup>-1</sup>	3,74 ml l <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> S·10H <sub>2</sub> O	6,67 g l <sup>-1</sup>	0,70 g l <sup>-1</sup>
<b>Solución de microminerales</b>	<b>0,1 ml l<sup>-1</sup></b>	<b>0,1 ml l<sup>-1</sup></b>
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	13,2 mg ml <sup>-1</sup>	13,2 mg ml <sup>-1</sup>
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	10,0 mg ml <sup>-1</sup>	10,0 mg ml <sup>-1</sup>
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1,0 mg ml <sup>-1</sup>	1,0 mg ml <sup>-1</sup>
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	8,0 mg ml <sup>-1</sup>	8,0 mg ml <sup>-1</sup>
<b>Solución de resazurin</b>	<b>1 ml l<sup>-1</sup></b>	<b>1,2 ml l<sup>-1</sup></b>
Resazurin	0,01 g l <sup>-1</sup>	0,01 g l <sup>-1</sup>

h<sup>-1</sup>), a tiempo "t", a partir de la siguiente ecuación (Groot et al., 1996):

$$R = \frac{c \times t^{c-1}}{B^c + t^c}$$

Para "c" > 1 la tasa de producción de gas aumenta hasta llegar a un máximo (RM). El tiempo de incubación al que sucede RM (t<sub>RM</sub>) se calcula a partir de la siguiente ecuación:

$$t_{RM} = B \times (c - 1)^{1/c}$$

Los parámetros de esta ecuación se calcularon utilizando un procedimiento de regresión no lineal que minimiza, mediante el algoritmo de Marquardt, las distancias de los puntos a la curva resultante del ajuste (SAS, 2002).

#### Cálculos y análisis estadísticos

En este ensayo se ha considerado que la cantidad de nitrógeno total aportado por el alimento al medio de incubación fue la suma del nitrógeno amoniacal y del soluble del ensilado.

El efecto del aporte de N del medio sobre la producción acumulada de gas en los distintos momentos de incubación, así como sobre los parámetros y los valores medios de la tasa de producción de gas, se realizó mediante análisis de varianza (GLM) utilizando el paquete estadístico SAS (SAS, 2002). En este análisis se tomó el medio de cultivo utilizado (N<sup>+</sup> y N<sup>-</sup>) como único tratamiento, y a la muestra como repetición.

De forma paralela, se realizó un análisis de correlación de Pearson entre los parámetros del ajuste de la curva de producción de gas, obtenidos con ambos medios ( $N^+$  y  $N^-$ ), y la composición química del ensilado (FND, FAD, CEL, LAD y PB) y la DMO, y entre la tasa de producción de gas (R) a lo largo del tiempo de incubación, con la DMO.

Para cada uno de medios de incubación ( $N^+$  y  $N^-$ ), se realizó un estudio de regresión múltiple entre la DMO del ensilado de hierba y los parámetros resultantes del ajuste de la curva de producción de gas (A, B, c), utilizando un procedimiento de selección por tramos hacia delante. La estimación de la bondad del ajuste y el error de predicción de las regresiones obtenidas se evaluaron mediante el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) y la desviación estándar de los residuos (d.e.r.), respectivamente.

## Resultados

### Producción de gas

La producción acumulada de gas obtenida utilizando los medios de cultivo  $N^+$  y  $N^-$ , a lo largo de las 96 h de incubación, se representa en la figura 1. Tal como se puede apreciar, la producción total de gas obtenida de la incubación de las muestras con el medio de cultivo  $N^+$  fue superior a la obtenida utilizando el medio  $N^-$ , siendo estas diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) para la totalidad de tiempos de determinación de gas. Además, se puede observar que estas diferencias fueron mayores a tiempos cortos (a excepción de la medida realizada a las 2 horas) y medios del periodo de incubación.

Los valores medios de los parámetros obtenidos del ajuste de la curva de producción de

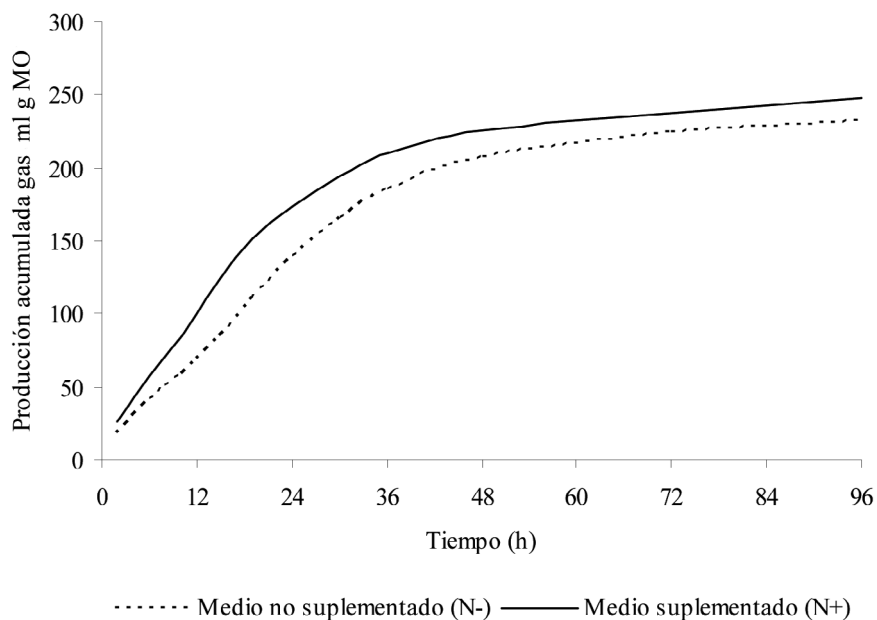


Figura 1. Evolución de la producción acumulada de gas a lo largo del tiempo de incubación utilizando un medio suplementado en N ( $N^+$ ) o no ( $N^-$ ).

Figure 1. Cumulative gas production evolution with incubation time using a supplemented ( $N^+$ ) or non supplemented ( $N^-$ ) with nitrogen culture medium.

gas con ambos medios de cultivo se indican en la tabla 3. En la misma puede observarse que el parámetro "B", fue significativamente inferior cuando las muestras se incubaron en el medio N<sup>+</sup>. Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas ni en el parámetro "A", ni en el parámetro "c".

La evolución de la tasa de producción de gas a lo largo del tiempo de incubación se representa en la figura 2. Se puede apreciar que la tasa de producción de gas fue mayor en el medio N<sup>+</sup>, siendo estas diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) durante las primeras 36 h de incubación. Así mismo, se observó que

Tabla 3. Medias, error estándar (s.e.) y significación (P) de los parámetros del ajuste de la producción acumulada de gas (A, B, c, RM)<sup>1</sup> utilizando un medio de cultivo suplementado en N (N<sup>+</sup>) o no (N<sup>-</sup>)  
 Table 3. Means, standard error (s.e.) and level of significance (P) for the cumulative gas production parameters (A, B, c, RM)<sup>1</sup> with a supplemented (N<sup>+</sup>) or non supplemented (N<sup>-</sup>) with nitrogen culture medium

	Parámetros								
	A (ml g <sup>-1</sup> MO)		B (h)			c		RM (h <sup>-1</sup> )	
	N <sup>+</sup>	N <sup>-</sup>	N <sup>+</sup>	N <sup>-</sup>	N <sup>+</sup>	N <sup>-</sup>	N <sup>+</sup>	N <sup>-</sup>	N <sup>-</sup>
Media	269,5	267,4	16,7	23,1	1,43	1,51	0,0521	0,0366	
P	ns		***			ns		***	
s.e.	29,6		4,6			0,22		0,0102	

<sup>1</sup> A: producción potencial de gas; B: tiempo necesario para que se alcance el 50% de la producción potencial de gas; c: parámetro adimensional que define la forma de la curva; RM: tasa de producción de gas máxima.

MO: materia orgánica.

s.e.: error estándar.

ns:  $P > 0,05$ ; \*:  $P < 0,05$ ; \*\*:  $P < 0,01$ ; \*\*\*:  $P < 0,001$ .

la tasa de producción de gas máxima (RM) fue significativamente mayor en el medio N<sup>+</sup> (0,0521 vs. 0,0366 h<sup>-1</sup>;  $P < 0,001$ ).

Por otra parte, esta RM ocurrió antes en el tiempo (9,0 vs. 14,3 h;  $P < 0,001$ ) cuando se utilizó el medio de cultivo N<sup>+</sup> que cuando se utilizó el N<sup>-</sup>. Una vez superados estos máximos, la tasa de producción de gas se redujo de forma más marcada en el caso del medio N<sup>+</sup>, de manera que a partir de las 36 h de incubación ya no se detectaron diferencias significativas en las tasas de producción de gas.

Relación de la producción de gas obtenida utilizando un medio suplementado con nitrógeno (N<sup>+</sup>) o no (N<sup>-</sup>) con la composición química y la DMO

Los coeficientes de correlación entre los parámetros del ajuste de la producción de gas utilizando los medios de cultivo N<sup>+</sup> y N<sup>-</sup>, con la DMO y la composición química de los ensilados de hierba se resumen en la tabla 4. Tal y como se aprecia, cuando se utilizó el medio N<sup>-</sup> no se encontraron correlaciones individuales significativas entre el parámetro



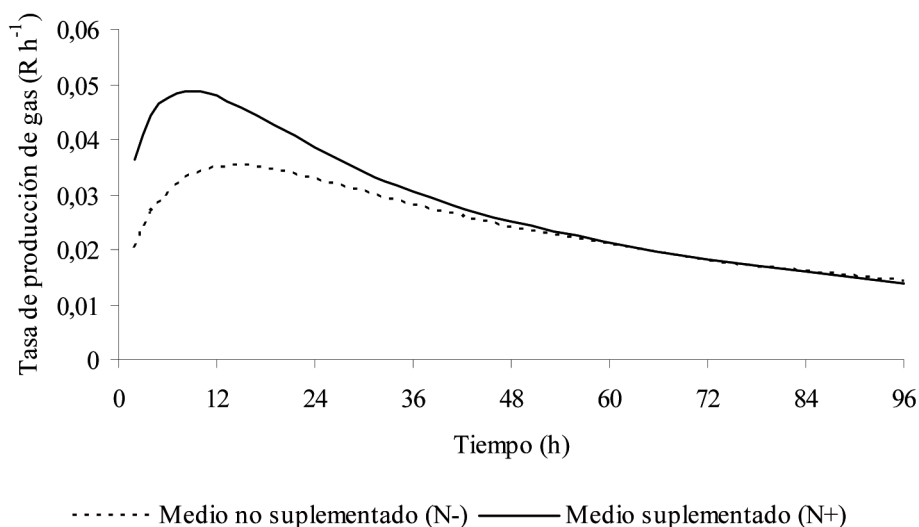


Figura 2. Evolución de la tasa de producción de gas (R) con el tiempo de incubación utilizando un medio suplementado con N (N<sup>+</sup>) o no (N<sup>-</sup>).

Figure 2. Gas production rate (R) evolution with incubation time using a supplemented (N<sup>+</sup>) or non supplemented (N<sup>-</sup>) with nitrogen culture medium.

"A", o el parámetro "c", y ninguno de los parámetros químicos (FND, FAD, CEL, LAD, PB) o la DMO. Por el contrario, las correlaciones fueron significativas con el parámetro "B". Estas correlaciones fueron positivas para el contenido en FND, FAD, CEL y LAD, y negativas para el contenido en PB y la DMO. Además, excepto para el contenido en LAD y CEL, se puede considerar que las correlaciones encontradas fueron altas ( $r > 0,70$ ).

Al considerar los parámetros obtenidos con el medio de cultivo N<sup>+</sup>, los parámetros "A" y "c" presentaron correlaciones significativas con el contenido en PB, de signo negativo para "A" y positivo para "c". En cualquier caso, ambas correlaciones fueron bajas ( $r < 0,50$ ). El parámetro "B" presentó correlaciones significativas tanto con los parámetros de composición química como con la DMO. Las correlaciones presentaron valores absolutos que oscilaron entre 0,61 y 0,85, a excepción de la correlación correspondiente al contenido

en LAD, para el que se alcanzaron valores inferiores a 0,50. De cualquier manera, las correlaciones encontradas con el parámetro "B" fueron ligeramente superiores con el medio de cultivo N<sup>+</sup>, excepto en el caso del contenido en LAD (tabla 4).

La tasa de producción de gas máxima obtenida con ambos tipos de medio, se encontró significativamente correlacionada con los parámetros de composición química y con la DMO. En ambos casos, las correlaciones fueron positivas con el contenido en PB y con la DMO, y negativas con los parámetros químicos relacionados con el contenido en pared vegetal (FND, FAD, CEL, LAD). También en este caso, las correlaciones obtenidas fueron ligeramente superiores para el medio N<sup>+</sup>, excepto para la observada con el contenido en LAD (tabla 4).

La evolución de la correlación entre la tasa de producción de gas y la DMO a lo largo del periodo de incubación puede observarse

Tabla 4. Coeficientes de correlación entre los parámetros del ajuste de la producción de gas (A, B, c, RM)<sup>1</sup> utilizando un medio de cultivo suplementado en N (N<sup>+</sup>) o no (N<sup>-</sup>), y la digestibilidad aparente de la materia orgánica o la composición química<sup>2</sup>  
 Table 4. Correlation coefficients obtained between gas production parameters (A, B, c, RM)<sup>1</sup> with a supplemented (N<sup>+</sup>) or non supplemented (N<sup>-</sup>) with nitrogen culture medium and apparent digestibility or the chemical composition<sup>2</sup>

	Parámetros							
	A		B		c		RM	
	N <sup>+</sup>	N <sup>-</sup>	N <sup>+</sup>	N <sup>-</sup>	N <sup>+</sup>	N <sup>-</sup>	N <sup>+</sup>	N <sup>-</sup>
FND	0,25 <sup>ns</sup>	0,24 <sup>ns</sup>	0,85 <sup>***</sup>	0,80 <sup>***</sup>	0,02 <sup>ns</sup>	0,16 <sup>ns</sup>	-0,75 <sup>**</sup>	-0,73 <sup>***</sup>
FAD	-0,23 <sup>ns</sup>	-0,28 <sup>ns</sup>	0,74 <sup>***</sup>	0,70 <sup>***</sup>	0,06 <sup>ns</sup>	0,27 <sup>ns</sup>	-0,71 <sup>***</sup>	-0,65 <sup>***</sup>
CEL	0,12 <sup>ns</sup>	0,06 <sup>ns</sup>	0,70 <sup>***</sup>	0,61 <sup>**</sup>	0,19 <sup>ns</sup>	0,36 <sup>ns</sup>	-0,54 <sup>**</sup>	-0,46 <sup>*</sup>
LAD	-0,21 <sup>ns</sup>	-0,19 <sup>ns</sup>	0,45 <sup>*</sup>	0,49 <sup>*</sup>	-0,18 <sup>ns</sup>	-0,10 <sup>ns</sup>	-0,44 <sup>*</sup>	-0,52 <sup>**</sup>
PB	-0,49 <sup>*</sup>	-0,40 <sup>ns</sup>	-0,79 <sup>***</sup>	-0,71 <sup>***</sup>	0,41 <sup>*</sup>	0,18 <sup>ns</sup>	0,82 <sup>***</sup>	0,78 <sup>***</sup>
DMO	0,05 <sup>ns</sup>	0,08 <sup>ns</sup>	-0,77 <sup>***</sup>	-0,72 <sup>***</sup>	0,34 <sup>*</sup>	0,11 <sup>ns</sup>	0,75 <sup>***</sup>	0,72 <sup>***</sup>

<sup>1</sup> A: producción potencial de gas; B: tiempo necesario para que se alcance el 50% de la producción potencial de gas; c: parámetro adimensional que define la forma de la curva; RM: tasa máxima de producción de gas.

<sup>2</sup> FND: fibra neutro detergente; FAD: fibra ácido detergente; CEL: celulosa; LAD: lignina ácido detergente; PB: proteína bruta; DMO: digestibilidad aparente de la materia orgánica.  
 ns:  $P > 0,05$ ; \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ .

en la figura 3. En el caso del medio de cultivo N<sup>+</sup>, esta correlación aumentó desde las primeras horas de incubación alcanzando su máximo ( $r = 0,85$ ) a las 12 h tras la inoculación, para disminuir a partir de este máximo. En el caso del medio N<sup>-</sup> la evolución fue similar, si bien las correlaciones fueron inferiores a las obtenidas con el medio N<sup>+</sup> a lo largo de todo el periodo de incubación, obteniéndose la correlación máxima ( $r = 0,75$ ) más tarde en el tiempo, a las 15 h del comienzo de la incubación.

Estimación de la DMO a partir de los parámetros de ajuste obtenidos utilizando medio suplementado (N<sup>+</sup>) y no suplementado con nitrógeno (N<sup>-</sup>)

Las ecuaciones de predicción de la DMO de los ensilados de hierba, utilizando los parámetros del ajuste de la curva de producción

de gas obtenidos con medios de cultivo N<sup>+</sup> y N<sup>-</sup> pueden verse en la tabla 5. Tal y como se aprecia, al utilizar los parámetros obtenidos con el medio de cultivo N<sup>+</sup>, el procedimiento por tramos hacia delante llevó a considerar al conjunto de parámetros de la curva de ajuste (A, B y c), obteniéndose una ecuación con un elevado coeficiente de determinación ( $r^2 = 0,758$ ) y un error de predicción (d.e.r. = 43,21 g kg<sup>-1</sup>) equivalente al 6,5% de la DMO media.

Por el contrario, al considerar los parámetros obtenidos del ajuste de la curva de producción de gas con el medio de cultivo N<sup>-</sup>, el procedimiento por tramos hacia delante, únicamente incluyó el parámetro "B". El coeficiente de determinación obtenido en este caso fue 0,519 y el error de predicción encontrado 58,09 g kg<sup>-1</sup>, lo que equivale al 8,7% de la DMO media (tabla 5).

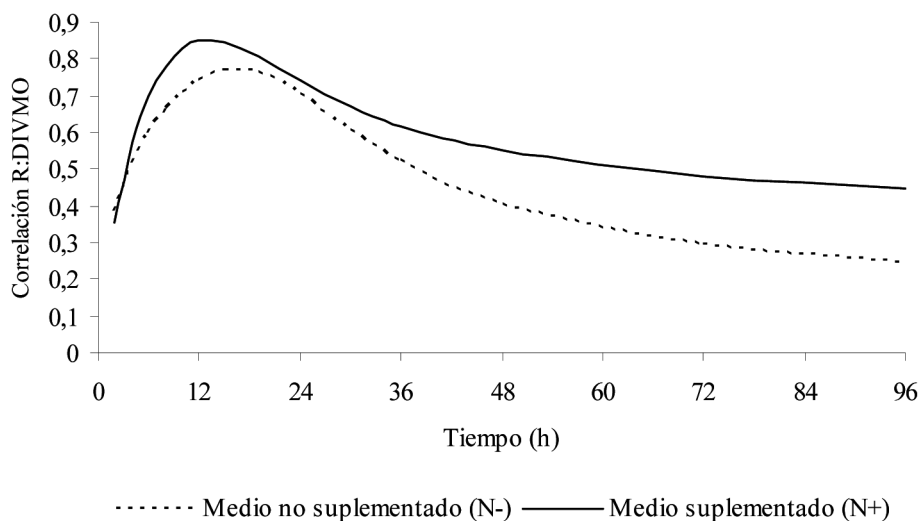


Figura 3. Evolución de la correlación entre la tasa de producción de gas (R) obtenida utilizando un medio de cultivo suplementado (N<sup>+</sup>) o no (N<sup>-</sup>) con la digestibilidad aparente (DMO) a lo largo del tiempo de incubación.

*Figure 3. Evolution with incubation time of the correlation between gas production rate (R) obtained using a supplemented (N<sup>+</sup>) or non supplemented (N<sup>-</sup>) with nitrogen culture medium and apparent digestibility (DMO).*

Tabla 5. Ecuaciones de predicción de la digestibilidad aparente de la materia orgánica utilizando los parámetros resultantes del ajuste de la producción de gas (A, B, c)<sup>1</sup> obtenidas en medio suplementado (N<sup>+</sup>) o no (N<sup>-</sup>) con nitrógeno

*Table 5. Predictive equations of the organic matter apparent digestibility using gas production parameters (A, B, c) obtained with a supplemented (N<sup>+</sup>) or non supplemented (N<sup>-</sup>) with nitrogen culture medium*

	Intercepto	A (ml g <sup>-1</sup> MO)	B (h)	c	r <sup>2</sup>	d.e.r. (g kg <sup>-1</sup> )
Medio suplementado en N	475,7	0,85	-15,99	155,79	0,758	43,21
Medio no suplementado en N	942,61		-12,25		0,519	58,09

<sup>1</sup> A: producción potencial de gas; B: tiempo necesario para que se alcance el 50% de la producción potencial de gas; c: parámetro adimensional que define la forma de la curva.

r<sup>2</sup>: coeficiente de determinación; d.e.r.: desviación estándar de los residuos.

## Discusión

La curva de producción de gas obtenida de la incubación *in vitro* de un alimento, depende tanto de la naturaleza del propio alimento, como de las características del medio de cultivo utilizado en la fermentación, o de las condiciones en las que ésta se desarrolla (Rymer et al., 1999). No obstante, en el caso de la valoración de alimentos, lo que se pretende es que la producción de gas sea lo más independiente posible de las características del ensayo, y que esté condicionada en la medida de lo posible por las características del alimento analizado.

En el presente estudio se encontraron diferencias notables en la producción de gas obtenida al incubar las muestras de ensilado de hierba en un medio de cultivo N<sup>+</sup> o N<sup>-</sup> (figuras 1 y 2). Estas diferencias conllevan que el ajuste de la producción de gas resulte en ecuaciones claramente diferenciadas, reflejándose especialmente en el tiempo necesario para que se alcance la mitad de la producción potencial de gas (B) (figura 1), y en la tasa máxima de producción de gas (RM), junto con el tiempo necesario para alcanzarla ( $t_{RM}$ ) (figura 2). Estas diferencias podrían ser debidas a que en el medio de cultivo N<sup>-</sup>, la actividad potencial de los microorganismos se vería limitada negativamente por un posible déficit de N, reflejándose, de forma general, en una menor tasa de producción de gas (Krisnamoorthy et al., 1991).

En condiciones de déficit de nitrógeno en relación a la disponibilidad de hidratos de carbono, como puede ser el caso al utilizar un medio de cultivo no suplementado con N, los microorganismos tenderían a adoptar estrategias para reducir la producción de ATP (Russell, 1998) y disipar energía disponible (Russell y Strobel, 1993), ya que un exceso de ATP podría resultarles tóxico. Entre las alternativas disponibles, estaría el empleo de rutas metabólicas que producen lactato en lugar de acetato (Russell, 1998), y el empleo

directo de hidratos de carbono para sintetizar mucílago o polímeros de  $\alpha$ -dextrinas (McAllan y Smith, 1976). Todo ello se traduciría en una reducción de la tasa de producción de gas, al ser ésta un reflejo del proceso fermentativo, en particular de la producción de ácidos grasos volátiles y ATP (Harrison et al., 1979), y explicaría las diferencias entre medios de cultivo observadas en la figura 2.

Estos resultados estarían en línea con los de Dryhurst y Wood (1998), quienes describieron que la limitación en la disponibilidad de nitrógeno causaba, básicamente, una disminución de la cinética de producción de gas, sin afectar a la producción potencial.

Si consideramos, que al inicio del periodo de incubación la proteína del alimento es poco disponible para los microorganismos, éstos harían uso, principalmente, del N aportado por el medio de cultivo y el inóculo ruminal. En el caso del medio suplementado ambos aportarían una cantidad de N equivalente a una concentración de 233 mg de N l<sup>-1</sup>, frente a 105,4 mg de N l<sup>-1</sup> en el caso del medio N<sup>-</sup>. Es decir, el N utilizable representaría el 2,2% y el 1,0% de la materia seca del substrato incubado, para los medios de cultivo N<sup>+</sup> y N<sup>-</sup> respectivamente. Por lo tanto, al comienzo del periodo de incubación, mientras que en el medio de cultivo N<sup>-</sup> la cantidad de N disponible se sitúa en el límite inferior de las necesidades para no limitar la fermentación ruminal (1-1,2% de N sobre materia seca incubada) establecidas por Van Soest (1994), en el medio de cultivo N<sup>+</sup> se encuentra 1,8 veces por encima del límite superior del rango establecido por este autor.

Para ensayos *in vitro*, en la bibliografía se encuentran estudios en los que se evalúan las necesidades en nitrógeno de los microorganismos, que permiten tasas máximas de degradación de los alimentos. Así, Oosting et al. (1989) utilizando una metodología *in vitro* discontinua observaron que para alcanzar la máxima degradación *in vitro* se

requería entre 88 y 100 mg N l<sup>-1</sup>, valores inferiores a los que permitieron la mayor tasa de producción de gas en el caso presente. Junto a las características del fermentador, la mayor digestibilidad de los alimentos utilizados en el presente ensayo, en relación a los empleados por Oosting *et al.* (1989), podría haber contribuido a que las concentraciones de N necesarias, para alcanzar una tasa de fermentación óptima, hayan sido más elevadas, ya que las necesidades en nitrógeno son tanto más altas cuanto que la degradabilidad del alimento es mayor (Erdman *et al.*, 1986).

Esta mayor disponibilidad de nitrógeno al utilizar el medio de cultivo N<sup>+</sup>, 2,2 veces mayor al comienzo de la incubación, se amortiguaría a medida que aumente la disponibilidad del N de la dieta. Considerando el aporte medio de N de los ensilados, la mayor disponibilidad de N al utilizar el medio de cultivo N<sup>+</sup>, se reduciría, por término medio hasta 1,5 veces. Esto explicaría que en períodos posteriores, en particular después de alcanzar la tasa de producción máxima, se encuentre una menor disminución de la tasa de producción de gas al utilizar el medio N<sup>-</sup>, resultando en un patrón de fermentación más homogéneo (figura 2), y contribuyendo a la similitud de producción potencial de gas (A) con ambos medios de cultivo (figura 1).

La influencia que el N disponible tiene sobre la cinética de degradación, se traduce, igualmente, a la correlación de los parámetros de producción de gas con los parámetros de la analítica química y con la DMO, así como en los resultados de la regresión entre los parámetros de producción de gas y la DMO. Al utilizar los datos obtenidos en los ensayos con el medio N<sup>+</sup>, se obtuvieron mejores correlaciones y una mejor estima de la DMO, lo que reflejaría una mayor independencia de las condiciones de trabajo. Por lo tanto, la incubación en un medio suplementado con N estaría reflejando mejor el proceso de degradación *in vivo*, independien-

temente de que en éste los animales no recibían ningún aporte externo de N.

En condiciones *in vivo*, los microorganismos, además del aporte de nitrógeno de la ración, cuentan con aportes de urea endógena, transferida al rumen a través de la saliva (McDonald, 1948), que puede suplir el déficit existente cuando el aporte dietético es inferior a sus necesidades.

La menor capacidad de predicción que resulta al utilizar un medio de cultivo N<sup>-</sup> se encontraría en contraposición por lo observado por Menke *et al.* (1979), quienes encontraban ecuaciones de predicción muy precisas utilizando medio de cultivo no suplementado. El mayor contenido en PB de los alimentos incubados (203,0 vs. 142,2 g kg<sup>-1</sup>), respecto a los del presente ensayo, así como el empleo de un inóculo más concentrado (1:2 vs. 1:4), podrían explicar estas diferencias. Además, Menke *et al.* (1979) junto a la producción de gas a las 24 h de incubación, utilizó como variables independientes los contenidos en PB, grasa y los extractivos libres de nitrógeno, lo que contribuiría a mejorar la bondad de la predicción de las ecuaciones propuestas.

## Conclusiones

La cantidad de nitrógeno aportado por el inóculo bacteriano y el ensilado de hierba no fue suficiente para mantener un óptimo crecimiento microbiano. Esto contribuyó a que las correlaciones encontradas entre los parámetros obtenidos del ajuste de la curva de producción de gas tanto con la composición química y la digestibilidad aparente de la materia orgánica, fueran inferiores cuando el medio de cultivo no fue suplementado con nitrógeno, traduciéndose en mejores ecuaciones de predicción de la digestibilidad al utilizar el medio de cultivo suplementado con nitrógeno.

## Bibliografía

- Dryhurst N, Wood CD, 1998. The effect of nitrogen source and concentration on *in vitro* gas production using rumen micro-organisms. *Anim. Feed Sci. Technol.* 71, 131-143.
- Dulphy JP, Demarquilly C, 1981. Problèmes particuliers aux ensilages, *En: Prèvision de la valeur nutritive des aliments des ruminants*, INRA editions, Paris, Francia, pp. 81-104.
- Erdman RA, Proctor GH, Vandersall JH, 1986. Effect of rumen ammonia concentration on *in situ* rate and extent of digestion of feedstuffs. *J. Dairy Sci.* 69, 2312-2320.
- García-Rodríguez A, Mandaluniz N, Flores G, Oregui LM, 2005. A gas production technique as a tool to predict organic matter digestibility of grass and maize silage. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124, 267-276.
- Goering MK, Van Soest PJ, 1970. Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications), *Agriculture Handbook*, Vol 379, Agricultural Research Service, USDA, Washington, EEUU.
- Groot JCJ, Cone JW, Williams BA, Debersaques, FMA, Latinga EA, 1996. Multiphasic analysis of gas production kinetics on *in vitro* ruminal fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.* 64, 77-89.
- Harrison DG, Beever DE, Osbourne DF, 1979. The contribution of protozoa to the protein entering the duodenum of sheep. *Br. J. Nutr.* 41, 521-527.
- Khazaal K, Dentinho MT, Ribeiro JM, Orskov ER, 1993. A comparison of gas production during incubation with rumen contents *in vitro* and nylon bag degradability as predictors of the apparent digestibility *in vivo* and the voluntary intake of hays. *Anim. Prod.* 57, 105-112.
- Krisnamoorthy U, Soller H, Steingass H, Menke KH, 1991. A comparative study on rumen fermentation of energy supplements *in vitro*. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 65, 28-35.
- Mapa 1995. Métodos oficiales del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA). BOE 52, 7167.
- McAllan AB, Smith RH, 1976. Effect of dietary nitrogen source on carbohydrate metabolism in the rumen of the young steer. *Br. J. Nutr.* 36, 511-522.
- McDonald IW, 1948. The absorption of ammonia from the rumen of sheep. *Biochem. J.* 42, 584-587.
- McDougall EI, 1948. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochem. J.* 43, 99-109.
- Menke KH, Raab L, Salewski A, Steingass H, Fritz D, Schneider W, 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *J. Agric. Sci. (Camb)*. 93, 217-222.
- Oosting SJ, Verdonk JM, Spinhoven GGB, 1989. Effect of supplementary urea, glucose and minerals on the *in vitro* degradation of low quality feeds. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 2, 583-590.
- Russell JB, 1998. Strategies that ruminal bacteria use to handle excess carbohydrate. *J. Anim. Sci.* 76, 1955-1963.
- Russell JB, Strobel HJ, 1993. Microbial energetics, *En: Forbes, J.M., France, J. (Eds.), Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism*, CABI, Wallingford, Reino Unido, pp. 165-186.
- Rymer C, Huntington JA, Givens DI, 1999. Effects of inoculum preparation method and concentration, method of inoculation and pre-soaking the substrate on the gas production profile of high temperature dried grass. *Anim. Feed Sci. Technol.* 78, 199-213.
- SAS, 2002. SAS/Stat User's Guide, Cary, NC, EEUU.
- Van Soest PJ, 1994. Nutritional Ecology of the Ruminants. Cornell University Press, Ithaca, Nueva York, EEUU.
- Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA, 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74, 3583-3597.
- Weatherburn MW, 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Ann. Chem.* 39, 971-974.

(Aceptado para publicación el 27 de abril de 2010)