



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **Producción de metano *in vitro* e *in vivo* de gramíneas y leguminosas presentes en sistemas de producción bovina en trópico alto colombiano**

**Juan de Jesús Vargas Martínez**

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Departamento Producción Animal

Bogotá, Colombia

2013



# **Producción de metano *in vitro* e *in vivo* de gramíneas y leguminosas presentes en sistemas de producción bovina en trópico alto colombiano**

**Juan de Jesús Vargas Martínez**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Producción Animal**

Director:

Zoot, M.Sc., PhD Juan Evangelista Carulla Fornaguera

Codirectora:

Quim, M.Sc, PhD Martha Lucia Pabón Restrepo

Línea de Investigación:

Línea de Investigación – Nutrición Animal

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación en Nutrición Animal

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Departamento Producción Animal

Bogotá, Colombia

2013



*“Nadie no exige que sepamos...*

*...hay que saber, eso es todo, aún a riesgo de equivocarse”*

*Umberto Eco*



## **Agradecimientos**

Este trabajo se lo dedico a Dios que con su inmenso poder me ha guiado por este camino y a todas aquellas personas que de una u otra manera me han acompañado a recorrerlo.

## Declaratoria de originalidad y reconocimiento

Yo Juan de Jesús Vargas Martínez, identificado con cc 1.019.004.610 expedida en Bogotá, declaro que los datos publicados en este trabajo de grado corresponden al proyecto de investigación titulado “**PRODUCCION DE METANO IN VITRO E IN VIVO CON GRAMINEAS Y LEGUMINOSAS PRESENTES EN SISTEMAS DE PRODUCCION BOVINA EN TROPICO ALTO COLOMBIANO**”, producto de una propuesta original cuyo trabajo de campo fue realizado en la estación experimental Corpoica Tibaitatá.

El desarrollo de esta investigación fue ejecutada principalmente por el autor, contando con el apoyo del personal del Laboratorio de Nutrición Animal, integrantes del Grupo de Investigación en Nutrición Animal (GINA), como de profesores adscritos al Departamento de Producción Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia-sede Bogotá.

Adicionalmente se contó con el apoyo del Laboratorio de Nutrición animal de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica)

Juan de Jesús Vargas Martínez

Autor



## Cesión de derechos para publicación en la red

Yo, Juan de Jesús Vargas Martínez, manifiesto en este documento mi voluntad de ceder a la Universidad Nacional de Colombia los derechos patrimoniales. Consagrados en el artículo 72 de la Ley 23 de 1982, del trabajo final de grado denominado: **“PRODUCCION DE METANO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE GRAMINEAS Y LEGUMINOSAS PRESENTES EN SISTEMAS DE PRODUCCION BOVINA EN TROPICO ALTO COLOMBIANO”**, producto de mi actividad académica para optar por el titulo de MAGISTER EN PRODUCCION ANIMAL en la Universidad Nacional de Colombia.

La Universidad Nacional de Colombia, entidad académica sin ánimo de lucro, queda por tanto facultada para ejercer plenamente los derechos de publicación anteriormente cedidos en su actividad ordinaria de investigación, docencia y publicación. La cesión otorgada se ajusta a lo establecido en la Ley 23 de 1982. Con todo, en mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada con arreglo al artículo 30 de la ley 23 de 1982. En concordancia suscribo este documento en el momento mismo que hago entrega del trabajo final a la Biblioteca Central de La Universidad Nacional de Colombia.

Atentamente

Juan de Jesús Vargas Martínez

Autor

X Producción de metano *in vitro* e *in vivo* de gramíneas y leguminosas presentes en sistemas de producción bovinas en trópico alto colombiano

---

## Resumen

Se realizaron tres experimentos con el objetivo de evaluar estrategias de mitigación de metano entérico proveniente de sistemas pastoriles. En el primer ensayo se comparó la producción de metano *in vitro* de dos gramíneas (*Pennisetum clandestinum* y *Lolium sp.*) y dos leguminosas (*Trifolium sp.* y *Lotus uliginosus*) cosechadas en tres estados de madurez (joven, intermedio y maduro). En el segundo experimento se determinó la producción de metano de cuatro mezclas gramínea y leguminosa (kikuyo y lotus, kikuyo y trébol, ryegrass y lotus y ryegrass y trébol) en tres diferentes proporciones gramínea:leguminosa (90:10, 70:30, 50:50). En el tercer ensayo se comparó la producción de metano en ovinos cuando se incluyó 30% de heno de *Lotus uliginosus* sobre una dieta basal de *Pennisetum clandestinum*. En el primer experimento, los forrajes jóvenes produjeron 24% menos metano respecto a la edad intermedia y madura. El lotus produjo 41% menos metano que el ryegrass y el trébol, mientras que el kikuyo presentó una producción intermedia. En el segundo experimento, el aumento en la inclusión de leguminosas cuando se asociaron con kikuyo disminuyeron la emisión de metano entre un 13 y 17%, sin embargo no se presentaron diferencias cuando se asociaron con ryegrass. Finalmente la inclusión de *Lotus uliginosus* disminuyó en ovinos la producción de metano por unidad de materia seca consumida en 35%. Este trabajo sugiere que la producción de metano en sistemas pastoriles puede ser mitigada a través de prácticas de manejo que influyan sobre las características de la dieta. La condición fisiológica de los forrajes (madurez del forraje), las características de las especies (C3 y C4), la presencia de compuestos secundarios (taninos condensados) y la inclusión de leguminosas en la dieta, modifican la degradación de nutrientes y posiblemente factores fisiológicos en los animales permitirían disminuir la producción de metano.

**Palabras claves:** agricultura, gases efecto invernadero, *Lolium sp.*, *Lotus uliginosus*, *Pennisetum clandestinum*, *Trifolium sp.*

## Abstract

Three experiments were conducted in order to evaluate mitigation strategies enteric methane from grazing systems. In the first trial compared the *in vitro* methane production of two grasses (*Pennisetum clandestinum* and *Lolium perenne*.) and two legumes (*Trifolium repens* and *Lotus uliginosus*) harvested at three maturity stages (young, intermediate and mature). In the second experiment determined the methane production of four grass-legume mixtures (kikuyu and lotus, kikuyu and clover, ryegrass and lotus and ryegrass and clover) in three different proportions grass: legume (90:10, 70:30, 50:50). In the third trial compared the methane production in sheep when including 30% of *Lotus uliginosus* hay on a basal diet of *Pennisetum clandestinum* hay. In the first experiment, young forages produced 24% less methane compared to middle and mature age. The lotus produced 41% less methane than ryegrass and clover, while the kikuyu presented an intermediate production. In the second experiment, the increased inclusion of legumes when kikuyu were associated with decreased methane emissions by 13 to 17%, however there were no differences when associated with ryegrass. Finally, the inclusion of *Lotus uliginosus* sheep decreased methane production per unit of dry matter intake by 35%. This work suggests that methane production in pastoral systems can be mitigated through management practices that influence the characteristics of the diet. The physiological condition of forages (forage maturity), the characteristics of the species, the presence of secondary compounds (tannins condensates) and the inclusion of legumes in the diet, modified nutrient degradation and possibly physiological factors in animals which would reduce the production of methane.

**Key words:** agriculture, greenhouse gases, *Lolium perenne*, *Lotus uliginosus*, *Pennisetum clandestinum*, *Trifolium repens*.

# Contenido

Pág.

<b>Resumen .....</b>	<b>XI</b>
<b>Lista de figuras .....</b>	<b>XVI</b>
<b>Lista de tablas .....</b>	<b>XVII</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Producción de metano entérico en rumiantes con énfasis en pasturas .....</b>	<b>7</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>7</b>
1.1    Introducción .....	8
1.2    Formación de metano entérico .....	9
1.3    Especies forrajeras y la producción de metano entérico .....	10
1.3.1    Gramíneas C3 vs C4 .....	10
1.3.2    Variedades .....	11
1.3.3    Gramíneas vs leguminosas .....	12
1.4    Características de las praderas sobre la producción de metano entérico .....	18
1.4.1    Madurez de la pradera .....	18
1.4.2    Manejo de la pastura .....	20
1.4.3    Fertilización .....	21
1.5    Conclusiones .....	22
1.6    Bibliografía .....	23
<b>2. Cambios en las emisiones de metano debido a la especie y el estado de madurez en forrajes del trópico alto colombiano incubados <i>in vitro</i> .....</b>	<b>39</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>39</b>
2.1    Introducción .....	40
2.2    Materiales y métodos .....	41
2.2.1    Especies forrajeras .....	41
2.2.2    Incubación <i>in vitro</i> .....	41
2.2.3    Producción de gas .....	42
2.2.4    Análisis químicos .....	42
2.2.5    Análisis estadístico .....	42
2.3    Resultados .....	43
2.3.1    Composición nutricional de los forrajes .....	43
2.3.2    pH, AGVs, digestibilidad, producción de gas y de metano. ....	43
2.4    Discusión .....	49
2.5    Conclusiones .....	54

2.6	Agradecimientos.....	54
2.7	Bibliografía.....	54
<b>3.</b>	<b>Producción de metano <i>in vitro</i> en mezclas de gramíneas y leguminosas del trópico alto colombiano.....</b>	<b>61</b>
<b>Resumen.....</b>		<b>61</b>
3.1	Introducción.....	62
3.2	Materiales y métodos.....	62
3.2.1	Especies forrajeras.....	62
3.2.2	Incubación <i>in vitro</i> .....	63
3.2.3	Análisis estadístico.....	63
3.3	Resultados.....	63
3.3.1	Composición bromatológica de los forrajes.....	63
3.3.2	Digestibilidad, pH, producción de gas, concentración de metano y AGV's.....	63
3.4	Discusión.....	71
3.5	Conclusiones.....	76
3.6	Agradecimientos.....	77
3.7	Bibliografía.....	77
<b>4.</b>	<b>Producción de metano por corderos consumiendo mezclas de henos de <i>Lotus uliginosus</i> y de <i>Pennisetum clandestinum</i>.....</b>	<b>83</b>
<b>Resumen.....</b>		<b>83</b>
4.1	Introducción.....	85
4.2	Materiales y métodos.....	85
4.2.1	Localización.....	85
4.2.2	Especies forrajeras.....	86
4.2.3	Animales y diseño experimental.....	86
4.2.4	Análisis de laboratorio.....	87
4.2.5	Análisis estadístico.....	87
4.3	Resultados.....	88
4.3.1	Composición bromatológica de los forrajes.....	88
4.3.2	Consumo, excreción y digestibilidad de nutrientes.....	88
4.3.3	Amonio, pH, AGV's y producción de metano.....	90
4.4	Discusión.....	91
4.5	Conclusiones.....	96
4.6	Agradecimientos.....	96
4.7	Bibliografía.....	96
<b>5.</b>	<b>Discusión general.....</b>	<b>101</b>
5.1	Bibliografía.....	104
<b>6.</b>	<b>Conclusiones y recomendaciones.....</b>	<b>109</b>
6.1	Conclusiones.....	109
6.2	Recomendaciones.....	110
<b>Anexos.....</b>		<b>113</b>
<b>A. Anexo:</b>	Supuestos del modelo de bloques completos al azar con estructura factorial 4*3 de las variables analizadas en el capítulo 2 "Efecto de la madurez del forraje sobre la	

---

producción de metano <i>in vitro</i> de gramíneas y leguminosas presentes en trópico alto colombiano” <sup>1</sup> .....	114
<b>B. Anexo:</b> Supuestos de bloques completos al azar con estructura factorial 4*3 de las variables analizadas en el capítulo 3 “Efecto de la asociación gramínea:leguminosa en diferentes proporciones sobre la producción de metano <i>in vitro</i> ” <sup>1</sup> .....	115
<b>C. Anexo:</b> Comparación del modelo de sobre cambio con y sin estimación del efecto residual en el capítulo 4 “Efecto de la inclusión de heno de lotus grande a una dieta basal de heno de kikuyo sobre la producción de metano en ovinos” .....	116
<b>D. Anexo:</b> Supuestos del modelo de sobrecambio compuesto de las variables analizadas en el capítulo 4 “Efecto de la inclusión de heno de lotus grande a una dieta basal de heno de kikuyo sobre la producción de metano en ovinos” <sup>1</sup> .....	117

## Lista de figuras

**Pág.**

<b>Figura 2-1:</b> Efecto del estado de madurez sobre la producción <i>in vitro</i> de metano ( $\text{ml g}^{-1}$ MO degradada).....	46
<b>Figura 2-2:</b> Producción <i>in vitro</i> de metano ( $\text{ml g}^{-1}$ MO degradada) de diferentes especies forrajeras presentes en trópico alto colombiano .....	48
<b>Figura 2-3:</b> Relación de la producción de gas y carbohidratos degradados <i>in vitro</i> en diferentes especies forrajes presentes en trópico alto colombiano.....	49
<b>Figura 4-1:</b> Efecto de la inclusión de heno de <i>Lotus uliginosus</i> sobre las emisiones de metano ( $\text{g Kg}^{-1}$ MO consumida) en ovinos durante los periodos de evaluación .....	91



## Lista de tablas

### Pág.

<b>Tabla 2.1:</b> Calidad nutricional dos gramíneas y dos leguminosas en diferentes estados de madurez* (%MS).....	44
<b>Tabla 2.2:</b> Efecto del estado de madurez <sup>1</sup> sobre la fermentación ruminal <i>in vitro</i> de dos gramíneas y dos leguminosas.....	45
<b>Tabla 2.3:</b> Efecto del estado de madurez <sup>1</sup> sobre la producción de gas y de metano <i>in vitro</i> de dos gramíneas y dos leguminosas.....	47
<b>Tabla 3.1:</b> Composición nutricional de dos gramíneas y dos leguminosas .....	64
<b>Tabla 3.2:</b> Efecto de la proporción gramínea: leguminosa sobre fermentación ruminal <i>in vitro</i> .....	65
<b>Tabla 4.1:</b> Composición nutricional de las dietas (n=6) .....	88
<b>Tabla 4.2:</b> Efecto de la inclusión de heno de <i>Lotus uliginosus</i> en una dieta basal de kikuyo sobre el consumo, producción de heces y de orina en ovinos .....	89
<b>Tabla 4.3:</b> Efecto de la inclusión de heno de <i>Lotus uliginosus</i> en una dieta basal de kikuyo sobre características de fermentación ruminal y digestibilidad de ovinos .....	89
<b>Tabla 4.4:</b> Efecto de la inclusión (30%) de heno de <i>Lotus uliginosus</i> a una dieta basal de heno de kikuyo sobre la producción de metano en corderos .....	90



# Introducción

Los gases efecto invernadero (GEI) son mecanismos naturales que han permitido mantener una temperatura cálida en el planeta (15°C en promedio) (González *et al.*, 1999). Desde la revolución industrial se ha evidenciado un aumento en la concentración GEI en la atmósfera asociándose a efectos negativos en el medio ambiente como aumento en la temperatura de la tierra y del océano, el descongelamiento de glaciares, aumento en el nivel del mar y en la incidencia de fenómenos naturales extremos (sequías e inundaciones) (Friedrich-Wilhelm y Werner, 2008; Shallcross *et al.*, 2007; IPCC, 2006).

Por medio de tratados multilaterales, diferentes países han unido esfuerzos en busca de mitigar las emisiones de GEI de origen antropogénico. En el tratado de Kioto celebrado en 1997, 196 países se comprometieron a reducir las emisiones de GEI en un 5% tomando como referencia las emisiones de 1990 (Lascano y Cárdenas, 2010). Colombia comprometida en colaborar con este esfuerzo global y a pesar que su participación en la producción de estos gases llega a ser alrededor de un 0,35% del total (IPCC, 2006) se suscribió a estos acuerdos comprometiéndose a hacer un inventario nacional de las emisiones GEI y desarrollar estrategias que permitan mitigarlos (Cabrera *et al.*, 2010).

Como resultado de este compromiso Cabrera *et al.*, (2010) produjeron un inventario de GEI reportando que Colombia emite 180.008,18 Gg de dióxido de carbono equivalente. Los sectores agrícola y energético son los mayores emisores nacionales de GEI cada uno aportando aproximadamente el 37%. Los GEI más importantes son el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), el metano (CH<sub>4</sub>) y el óxido nitroso (N<sub>2</sub>O), los cuales tienen un potencial de calentamiento, de 1, 23 y 196, respectivamente (Solomon *et al.*, 2007). El metano a pesar que posee un mayor poder de calentamiento respecto al CO<sub>2</sub>, su tiempo de vida media en la atmósfera es de 10 años (Moss *et al.*, 2000) sugiriendo que su mitigación podría a mediano plazo disminuir las emisiones de GEI sectoriales y nacionales (Niggli *et al.*, 2009). El CO<sub>2</sub> es emitido mayoritariamente por la quema de combustibles fósiles, el

metano por la fermentación entérica en rumiantes, y el N<sub>2</sub>O por el uso de fertilizantes nitrogenados en la producción agropecuaria (Cabrera *et al.*, 2010).

En Colombia el metano entérico es uno de los principales GEI provenientes del sector agropecuario representado el 18 y 49% de las emisiones nacionales y sectoriales, respectivamente (Cabrera *et al.*, 2010). La estimación de las emisiones de metano realizado por Cabrera *et al.*, (2010) fueron efectuadas mediante las metodologías Tier I y II propuestas por el IPCC (2006) de acuerdo a coeficientes de emisiones previamente establecidos, según características de una población en particular y de la dieta. Sin embargo, autores han sugerido que estas metodologías son válidas para hacer las primeras aproximaciones, pero en muchos casos podría sobre o sub estimar las emisiones de metano reales (Kebreab *et al.*, 2006). Aunado a esto, existe un limitado acervo investigativo entorno a la cuantificación y desarrollo de estrategias que mitiguen la emisión de metano entérico en los actuales sistemas de producción de bovinos. Por eso se hace indispensable reconocer técnicas apropiadas para determinar las emisiones de metano en los sistemas de producción ganaderos en Colombia y desarrollar estrategias que permitan implementar prácticas culturales que disminuyan las emisiones de metano entérico.

La literatura reporta que el metano entérico puede disminuirse a través de la manipulación en la dieta, nivel de consumo, tasa de pasaje, presencia de compuestos secundarios, inclusión de aditivos y manipulación de los microorganismos ruminales (Jakhmola *et al.*, 2010; Eckard *et al.*, 2010; Lascano y Cárdenas, 2010). Otros autores argumentan que es indispensable mejorar la eficiencia de los animales desarrollando estrategias de selección genética o el potenciamiento de la eficiencia alimenticia, lo que disminuiría la producción de metano entérico por unidad de producto (Beukes *et al.*, 2010; Buddle *et al.*, 2010).

En Colombia los sistemas de producción ganadera están soportados nutricionalmente en especies forrajeras de bajo rendimiento. Sin embargo, en las últimas décadas se ha promovido la adopción de tecnologías que permitan el aumento de la productividad animal (Holman *et al.*, 2003). En este sentido, los sistemas de lechería especializada se caracterizan por el uso de pasturas mejoradas, con altos niveles de fertilización y manejo intensivo, y la suplementación de concentrados y/o conservados en busca de maximizar

la producción de leche por animal (Carulla *et al.*, 2004). Además se han evaluado estrategias como la incorporación de leguminosas que permiten reducir el impacto ambiental, disminuyendo utilización de fertilizantes nitrogenados, y aumentar la productividad animal (Cárdenas y Castro, 2005). De esta manera se destacan en trópico alto colombiano, la presencia en las praderas de gramíneas puras de kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) o rye grass (*Lolium sp.*) (Carulla *et al.*, 2004) y asociaciones con leguminosas tales como el trébol blanco (*Trifolium repens*), trébol rojo (*Trifolium pratense*) y Lotus (*Lotus uliginosus*), esta última con contenidos moderados de taninos condensados (Cárdenas y Castro, 2005).

Por lo anteriormente expuesto, se hizo necesario reconocer a través de una revisión de literatura la influencia de la especie forrajera, la asociación gramínea:leguminosa y el manejo de la pastura sobre la emisiones de metano (capítulo 1). Se evaluó en una técnica *in vitro* la producción de metano de gramíneas y leguminosas en diferentes estados de madurez (capítulo 2) y la inclusión de leguminosas en diferentes proporciones sobre una dieta basal de gramíneas (capítulo 3). Finalmente en un experimento *in vivo* se determinó el efecto de la inclusión de heno de lotus grande (*Lotus uliginosus*) en una dieta basal de heno de kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) sobre la producción de CH<sub>4</sub> (capítulo 4).

## Referencias

Beukes PC., Gregorini P., Romera AJ., Levy G. and Waghorn GC. 2010. Improving production efficiency as a strategy to mitigate greenhouse gas emissions on pastoral dairy farms in New Zealand. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 136: 358-365.

Buddle BM., Denis M., Attwood GT., Altermann E., Janssen PH., Ronimus RS., Pinares-Patiño CS., Muetzel S. and Wedlock DN. 2010. Review: Strategies to reduce methane emissions from farmed ruminants grazing on pastures. *The Veterinary Journal*, 188: 11-17.

Cabrera M., Duarte M., Gutiérrez MM. and Lozano RJ. 2010. Inventario Nacional de Emisiones de Gases de Efecto Invernadero. En: 2ª Comunicación Nacional ante la Convención Marco de las Naciones Unidas Sobre Cambio Climático. IDEAM. Capítulo 2. Bogotá, Colombia.

Cárdenas E. and Castro E. 2005. Adaptation, compatibility and acceptability of grass-legume pastures in the Andean region of Colombia. En: XX International Grassland Congress, Dublín, Irland.

Carulla J., Cárdenas E., Sánchez N. and Riveros C. 2004. Valor nutricional de los forrajes más usados en los sistemas de producción lechera especializada de la zona andina colombiana. En: Memorias del V seminario internacional en reproducción y metabolismo en bovinos. Universidad de Caldas, Manizales.

Eckard RJ., Grainger C. and de Klein CAM. 2010. Options for the abatement of methane and nitrous oxide from ruminant production: A review. *Livestock Science*, 130: 47-56.

Friedrich – Wilhelm G. and Werner P. 2008. Climate development in the last Century – Global regional. *International. Journal of Medical Microbiology*, 298: 5-11.

González BF. and Rodríguez H. 1999. Proyección de las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI), Colombia 1998-2010. *Revista Academica Colombiana de Ciencias*, 23(89): 4907-505.

Holmann F., Rivas., Carulla J., Giraldo L., Guzman S., Martínez M., Rivera B., Medina A. and Farrow, A. 2003. Evolución de los sistemas de producción de leche y su interrelación con los mercados: Un análisis del caso colombiano.

IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). 2006. Guidelines for National Greenhouse Inventories. Vol. 4. Agriculture, forestry and other land use. Ch. 10. Emissions from livestock and manure management. pp. 10.1 – 10.87.

Jakhmola RC., Pahuja T. and Raghuvansi SKS. 2010. Feeding strategies to reduce enteric methane production in ruminants: a review. *Indian Journal of Small Ruminants*, 16:1-17

Kebreab E., France J., McBride BW., Odongo N., Bannink A., Mills JAN. and Dijkstra J. 2006. Evaluation of models to predict methane emissions from enteric fermentation in North American dairy cattle. *Nutrient Digestion and Utilization in Farms Animals: Modelling Approaches*. CAB International. Eds E Kebreab *et al.*

Lascano CE. and Cárdenas E. 2010. Alternatives for methane emissions mitigation in livestock systems. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39:175-182 (Supl. Especial).

Niggli, U., Fliebbach, A., Hepperly, P. and Scialabba, N. 2009. Low Greenhouse gas Agriculture: Mitigation and adaptation potential of sustainable farming systems. FAO, April 2009, Rev 2-2009.

Shallcross D., Khalil M. and Butenhoff C. 2007. The Atmospheric Methane Sink. En: *Greenhouse Gas Sink*. Ed: Reay DS., Hewitt CN., Smith KA. y Grace J. CAB International. Wallingford, UK.

Solomon SD., Qin M., Manning RB., Alley T., Berntsen NL., Bindoff Z., Chen A., Chidthaisong JM., Gregory GC., Hegerl M., Heimann B., Hewitson BJ; Hoskins F., Joos J., Jouzel V., Kattsov U., Lohmann T., Matsuno M., Molina N., Nicholls J., Overpeck J., Raga G., Ramaswamy J., Ren M., Rusticucci R., Somerville TF., Stocker P., Whetton RA., and Wratt D. 2007. Technical Summary. In: *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Editado por Solomon S., Qin D., Manning M., Chen Z., Marquis KB., Averyt M and Miller. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.





# 1. Producción de metano entérico en rumiantes con énfasis en pasturas

## Resumen

Esta revisión explora el conocimiento asociado a los aspectos que determinan la producción de metano en rumiantes en pastoreo. Se aborda el efecto de la especie forrajera, variedades dentro de especies y asociaciones gramínea / leguminosa, además de aspectos de manejo de la pastura como su madurez, carga animal, sistema de pastoreo y nivel de fertilización en la alimentación de rumiantes. Existen diferencias entre especies forrajeras en la producción de metano que están asociadas a diferencias en las concentraciones de fibra, a variaciones en la tasa de paso y la presencia de metabolitos secundarios. Mayores concentraciones de fibra reducen las tasas de paso, el consumo de materia seca y aumenta la producción de metano por unidad de materia seca consumida. El efecto de la inclusión de leguminosas sobre la producción de metano es variable y está influenciado por la presencia de metabolitos secundarios como los taninos y las saponinas. Los resultados de los trabajos revisados sugieren que existen oportunidades para reducir las emisiones de metano por unidad de materia seca consumida cuando las prácticas de manejo de las pasturas aumenten las tasas de paso y el consumo voluntario.

**Palabras claves:** gases efecto invernadero, pasturas, sistemas pastoriles.

## Abstract

This review explores the knowledge associated to aspects that determine methane production in grazing ruminants. The effects of forage specie, varieties within specie and associations grass legume are approached. Pasture management such as maturity, stocking rate, grazing system and level of fertilization are also reviewed. There are

differences within forage species in methane production that are associated to fiber concentration, variation in rate of passage and the presence of secondary metabolites. Higher fiber concentrations reduce passage rates, dry matter intake and increase methane production per unit of dry matter intake. The effect of legume inclusion on methane production is variable and it is influenced by the presence of second metabolites like tannins and saponins. The results of the reviewed papers suggest that there are opportunities to reduce methane emission per unit of dry matter intake when pasture management practices increase rates of passage and voluntary intake.

**Keywords:** greenhouse gases, grasslands, grazing systems

## 1.1 Introducción

En Colombia el sector agropecuario es un importante emisor de gases efecto invernadero (GEI) aportando el 38% de las emisiones nacionales, de las cuales el 49% proviene de la producción de metano de origen entérico (Cabrera *et al.*, 2010). El metano es un GEI con 23 veces mayor poder de calentamiento que el dióxido de carbono y un tiempo de vida media de 10 años en la atmósfera (Solomon *et al.*, 2007). La producción de metano entérico constituye una pérdida energética para el rumiante que representa entre el 2 y el 12% de la energía bruta consumida (Johnson y Johnson, 1995). Es por esto que algunos autores han propuesto que la disminución en las emisiones de metano entérico establece una estrategia para aumentar la productividad animal (al disminuir la pérdidas energéticas) y disminuir el impacto ambiental (al disminuir las emisiones de metano a la atmósfera) (Niggli *et al.*, 2009).

En la literatura se reportan múltiples revisiones sobre la producción de metano por los ruminantes (Johnson y Johnson, 1995; Boadi *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2009; Patra y Saxena *et al.*, 2010), algunas de ellas orientadas a determinar estrategias de alimentación que permitan reducir las emisiones de metano reconociendo factores del animal (tasa de pasaje, consumo residual), de la dieta (composición, relación forraje:concentrado), inclusión de aditivos (ácidos grasos, taninos purificados) y modificadores de las poblaciones ruminales (ionóforos, vacunas). Sin embargo, ninguna de estas ha abordado el tema desde el punto de vista del pastoreo a pesar de que un

35% de la producción de metano entérico proviene de sistemas pastoriles (Neely *et al.*, 2009).

Debido a las limitaciones para determinar la producción de metano entérico en rumiantes alimentados con pasturas, aspectos asociados a la especie vegetal, su madurez y la oferta de forraje no han sido consideradas de manera integral. Esta revisión integró las publicaciones en estas áreas identificando los factores que influyen en la producción de metano entérico, así como áreas en las cuales se requiere investigación con el fin de contribuir y reconocer estrategias de manejo que permitan mitigar las emisiones de metano en los sistemas pastoriles e identificar áreas para futuras investigaciones.

En esta revisión hemos privilegiado la expresión de la producción de metano en términos de la materia seca consumida en los ensayos *in vivo* y en referencia a la materia orgánica degradada en los ensayos *in vitro*, de otra manera se hará explícito en el texto. Es importante considerar que las unidades en las que se expresa la producción de metano permite enfatizar en características fisiológicas, composicionales o productivas que permiten describir la producción de metano debiendo tener precaución al comparar resultados de diferentes experimentos. Sin embargo, es significativo resaltar que en los procesos de mitigación la forma de expresión debe propender por mantener la eficiencia productiva del animal además de disminuir el impacto al medio ambiente (Waghorn y Hegarty, 2011).

## 1.2 Formación de metano entérico

El metano entérico es un producto de la fermentación anaerobia resultado de un complejo sistema simbiótico entre diferentes grupos microbiales presentes a lo largo del tracto digestivo del rumiante (Van Soest, 1994). Los microorganismos del rumen metabolizan los carbohidratos de la dieta convirtiéndolos principalmente en ácidos grasos volátiles como acetato, propionato y butirato. En el proceso de síntesis de acetato y butirato se produce hidrógenos los cuales deben ser removidos para mantener la eficiencia energética durante los procesos de fermentación anaerobia (Beauchemin *et al.*, 2008). Las principales vías de remoción de hidrógenos se hacen a través de la biohidrogenación de ácidos grasos insaturados, la formación de ácido propiónico y de metano (Van Soest, 1994). El metano lo producen un grupo de microorganismos

metanógenos del dominio *Archaea*, entre las que se destacan *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobacterium formicicum* y *Methanomicrobium mobile* a partir de la reducción del dióxido de carbono (Attwood *et al.*, 2008).

### **1.3 Especies forrajeras y la producción de metano entérico**

La literatura sugiere que se pueden encontrar diferencias en la emisión de metano entérico cuando se evalúan diferentes especies forrajeras. Por ejemplo, Mieres *et al.*, (2002) encontraron que el uso de pasturas nativas producía mayores cantidades de metano por unidad de materia seca consumida que una pastura mejorada o introducida resultado de sus características composicionales. Debido a la gran diversidad de especies forrajeras estudiadas en esta revisión hemos clasificado los trabajos publicados en tres grandes grupos donde se compararon gramíneas C3 y C4, variedades dentro de un mismo forraje y gramíneas:leguminosas.

#### **1.3.1 Gramíneas C3 vs C4**

Las plantas C3 y C4 se diferencian en que su primer producto de la fotosíntesis es un compuesto de tres (ácido 3 fosfoglicérico) o cuatro (ácido oxalacético) carbonos, respectivamente (Salisbury y Ross, 2000). En general, las gramíneas forrajeras C3 debido a sus diferencias fisiológicas, están compuestas por una mayor proporción de tejidos de alta digestibilidad respecto a las C4 (Wilson, 1993). Las primeras investigaciones que compararon la producción de metano en especies C3 con especies C4 fueron reportadas por Margan *et al.* (1988), quienes concluyeron que ovejas alimentadas con especies C4 (*Digitaria decumbens* y *Setaria spaelata*) produjeron 14,3% más metano relacionado con la energía digestible consumida que aquellas alimentadas con especies C3 (*Lolium perenne* y *Trifolium repens*). Primavesi *et al.* (2004) encontraron una mayor producción de metano por unidad de materia seca degradada en vacas que consumieron pastos tropicales que aquellas que consumieron pastos de clima templado. Finalmente, el consumo de especies C4 en comparación con las C3 se han relacionado con una menor producción leche y/o carne, lo cual resulta en una mayor emisión de metano por unidad de producto (Waghorn y Hegarty, 2011).

Algunos autores sugieren que la mayor producción de metano en los forrajes C4 puede deberse a un mayor contenido de carbohidratos estructurales y lignina (Kamra *et al.*, 2010), menor consumo y tasa de pasaje (McAllister *et al.*, 1996). Asimismo las ecuaciones desarrolladas por Moe y Tyrrell, (1979) usando 404 ensayos desarrollados con ganado de leche sugieren que dietas a base de carbohidratos estructurales producen mayores proporciones de metano por unidad degradada que aquellas donde prevalecen los carbohidratos no estructurales. Otros autores sugieren que en animales alimentados con forrajes tropicales se produce más metano (>8%) por unidad de materia orgánica degradada que con aquellos de zonas templadas (7%) debido a una mayor proporción de carbohidratos estructurales (Clark *et al.*, 2005)

Sin embargo, otras investigaciones sugieren que no hay efecto del tipo de especie C3 o C4 sobre las emisiones de metano (Klevenhusen *et al.*, 2009). Además en forrajes tropicales y templados no se ha encontrado una clara asociación entre los componentes de la dieta y la producción de metano (Clark *et al.*, 2005). Algunos autores sugieren que las diferencias en la variación en la producción de metano entre especies puede relacionarse en una mayor medida a diferencias en el nivel de consumo (Muetzel *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2011a), tasas de degradación y paso diferencial entre especies forrajeras (Pinares-Patiño *et al.*, 2007a) que a la composición de la dieta (Sun *et al.*, 2011b). Es por esto que hay que ser cuidadoso al generalizar estos resultados y debe hacerse una mayor investigación en torno a la producción de metano en especies C3 y C4 (Kurihara *et al.*, 1999; McCrabb y Hunter, 1999; Clark *et al.*, 2005).

### 1.3.2 Variedades

Muy pocos trabajos se han enfocado en reconocer las diferencias en las emisiones de metano entre diferentes variedades de una misma especie. Es posible que las diferencias en la calidad nutricional de cada variedad dentro de una especie puedan modificar las emisiones de metano. En estudios *in vitro* donde se incluyó *Lolium sp* con 12% más de azúcares solubles mostró una reducción de metano en un 10% (Lovett *et al.*, 2005a). Sin embargo, otros trabajos *in vitro* no han reportado diferencia entre variedades altas y bajas en carbohidratos solubles (Lovett *et al.*, 2004; Zeleke *et al.*, 2006; Navarro-Villa *et al.*, 2011). Misselbrook *et al.* (2010) observaron *in vivo* que variedades de *L. perenne* con mayores contenidos de carbohidratos solubles presentaron una menor producción de metano.

Por su parte, Primavesi *et al.*, (2003) compararon las emisiones de metano provenientes de animales en pastoreo que recibieron suplementación de caña de azúcar con mayor y menor contenido de FDN, reportando un 30% menos metano por unidad de peso vivo en aquellas dietas más ricas en carbohidratos no estructurales. Además estos autores sugirieron que cuando se incluye un alimento balanceado en un 40% de la dieta, con bajo contenido de fibra, produce menos metano por unidad de producto (carne o leche).

De otro lado, una mayor concentración de proteína cruda ha sido asociada con la disminución en las emisiones de metano. En ensayos *in vitro* donde se comparó *Lolium perenne* con 75% mas proteína cruda se reportó 14% menos metano por unidad de materia orgánica degradada (Lovett *et al.*, 2004). Similares resultados reportaron Navarro-Villa *et al.* (2011) al observar una disminución de 7% en la emisión de metano por unidad de materia seca incubada en *L. perenne* cv Greengold con 3% más de proteína cruda.

La poca información relacionada con emisiones de metano asociadas a diferencias en variedades de una misma especie sugeriría que el uso de variedades bajas en fibra y ricas en azúcares y proteína cruda podría ser una opción viable para reducir las emisiones de metano por unidad de producto (carne o leche) al aumentar la productividad animal. En este mismo sentido concluyeron Ellis *et al.* (2012) quienes simularon la producción de metano en relación a la energía consumida en variedades altas en azúcares solubles encontrando un aumento que varió entre 2 y 7%, sin embargo cuando se expresó por unidad de producto disminuyeron las emisiones de metano entre 0 y 2% cuando disminuía la fibra y entre 3 y 13% cuando aumentó la proteína.

### **1.3.3 Gramíneas vs leguminosas**

En estudios *in vitro* la inclusión de leguminosas tropicales bajas en taninos condensados ha presentado un aumento en las emisiones de metano por unidad de materia orgánica fermentada respecto a gramíneas asociado a una mayor degradabilidad de nutrientes (Hess *et al.*, 2003; Tiemann *et al.*, 2008a). Hess *et al.* (2003), evaluaron la inclusión de una leguminosa baja en taninos (*Arachis pinto*) en proporciones crecientes (33, 66 y 100%) en una dieta base de gramínea (*Brachiaria humidicola*) y encontraron una relación lineal creciente entre la inclusión de leguminosa y la producción de metano por unidad de

FDN fermentada. Igualmente Tiemann *et al.*, (2008a) sugieren un aumento del 35% en la producción de metano por unidad de FDN fermentada cuando se incluye una leguminosa baja en taninos (*Vigna unguiculata*) en una dieta a base de gramínea (*Brachiaria humidicola*) en proporción 1:2, comparando con la gramínea pura.

Estudios con leguminosas y gramíneas de zonas templadas muestran resultados completamente diferentes a los estudios con forrajes tropicales. Navarro-Villa *et al.*, (2011) reportaron una disminución de 7% en la producción de metano por unidad de materia seca incubada cuando compara *T. pratense* respecto a *L. perenne*. En estudios *in vivo* McCaughey *et al.* (1999) observaron una reducción de un 25% de las emisiones de metano por energía bruta ingerida cuando se comparó una dieta de gramínea (*Bromus biebersteinii*) con una asociación de gramínea:leguminosa (*Bromus biebersteinii:Medicago sativa*). Otros trabajos donde se ha sustituido la gramínea *Bromus biebersteinii* por *Medicago sativa* han presentado disminuciones del 20% en las emisiones de metano por unidad de materia seca consumida (Chavez *et al.*, 2006), razón por la cual Martin *et al.* (2009) sugirieron que la inclusión de *Medicago sativa* promueve una mayor tasa de pasaje y debido a sus altos contenidos de malato en las hojas, el cual es un intermediario en la vía de producción de propionato, podría disminuir la producción de metano entérico al aumentar la relación propionato:acetato en el rumen. De Klein *et al.* (2008) sugirieron que la inclusión de leguminosas en la dieta podría disminuir la producción de metano por unidad de MS (materia seca) hasta en un 53%. Esto se ha relacionado con un menor contenido de fibra en las dietas con leguminosas, una reducción en el pH, aumento del amonio, AGV y relación propionato:acetato en el rumen, mayor tasa de pasaje y la presencia de algunos metabolitos secundarios (Mieres *et al.*, 2002; Williams *et al.*, 2005; Waghorn y Clark, 2006; Waghorn, 2008; Beauchemin *et al.*, 2008; Eckard *et al.*, 2010).

La inclusión de leguminosas de zona templada en dietas de gramíneas tropicales ha mostrado resultados similares a lo reportado para dietas de zonas templadas. Kurihara *et al.*, (1999) compararon la producción de metano en novillos Brahman que recibieron una dieta de gramíneas tropicales como *Dichanthium aristatum* y *Chloris gayana*, frente a aquellos que consumieron *Medicago sativa*, y reportaron un aumento de 3,9 veces en las emisiones de metano por unidad de ganancia de peso en animales alimentados con gramíneas.

Sin embargo, no todos los estudios con leguminosas de zonas templadas han mostrado una disminución en las emisiones de metano. Por ejemplo estudios reportados por McCaughey *et al.* (1999), Waghorn *et al.* (2002), De Klein *et al.* (2008) y O'Mara *et al.* (2008) han mostrado aumentos en las emisiones de metano por unidad de MS consumida al incluir leguminosas en la dieta, debido a un mayor consumo de materia seca, aumento en digestibilidad de la dieta y modificación de los patrones de fermentación asociados a la inclusión de la leguminosa. Carulla *et al.*, (2005) reportaron un aumento en las emisiones de metano por unidad de MS consumida asociadas a la inclusión de ensilaje de trébol o alfalfa en una dieta de ryegrass. Sin embargo, otros trabajos no han reportado diferencias entre gramíneas y leguminosas (Beever *et al.*, 1985, Van Doland, 2007). Por último, algunos autores han sugerido que la respuesta puede depender de las especies asociadas. Por ejemplo, Knight *et al.*, (2007) reportaron 23% menos metano por unidad de materia seca consumida, en corderos que consumieron *Trifolium repens* respecto a aquellos que consumieron *Lolium* sp. mientras que observaron una mayor emisión (21%) en corderos que consumieron *Trifolium ambiguum* en comparación con *Lolium* sp.

A pesar que no exista un consenso entre el efecto que puede producir animales alimentados con gramíneas C3 y C4 o con diferentes niveles de inclusión de leguminosas en zonas templadas y cálidas sobre la producción de metano entérico, si se han observado diferencias entre leguminosas y su efecto sobre la producción de metano al asociarlas con algunos compuestos secundarios encontrados en ellas como son los taninos y las saponinas. La concentración y tipo de estos compuestos varía entre especies, procedencia, estado fisiológico de la planta, año y época de cosecha lo cual dificulta su estudio. A continuación discutiremos los efectos de los taninos y las saponinas presentes en las especies forrajeras.

- *Taninos condensados* - Los taninos son polifenoles capaces de ligarse a compuestos de la dieta (proteínas, carbohidratos) (Cortés *et al.*, 2009; Patra y Saxena, 2010; Jakmola *et al.*, 2010). Esto podría disminuir la degradabilidad de algunos nutrientes de la dieta, inhibir la actividad enzimática, disminuir las poblaciones de protozoarios o de bacterias celulolíticas y en consecuencia disminuir la producción de metano (McSweeney, 2001; Tavendale *et al.*, 2005;



Johnson *et al.*, 2007; Tiemann *et al.*, 2008a; Hess *et al.*, 2008; Jakmola *et al.*, 2010).

El efecto de los taninos en las leguminosas sobre la producción de metano aparentemente es muy variable y depende del tipo de taninos y su concentración en la planta. Se ha reportado *in vitro* una mayor disminución en las emisiones de metano cuando se incluyen taninos condensados frente a los hidrolizables, debido a una mayor reducción en las poblaciones metanogénicas y de protozoarios (Bhatta *et al.*, 2009). Estos autores en estudios *in vitro* han mostrado una relación inversa y lineal entre la mayor concentración de taninos condensados y una reducción en la producción de metano. Sin embargo, aunque algunos estudios *in vivo* en donde se incluyen taninos condensados en la dieta muestran una disminución en la metanogénesis en ovejas (Carulla *et al.*, 2005) otros no han reportado ningún efecto (Beauchemin *et al.*, 2007).

La presencia de leguminosas taníferas en dietas de bovinos y ovinos se ha relacionado con disminución en las emisiones de metano (Woodward *et al.*, 2001; Pinares-Patiño *et al.*, 2003a). Diferentes estudios con leguminosas de zonas templadas reportan una disminución entre un 12 y un 60% sobre la producción de metano como proporción de la energía bruta consumida cuando se incluye en la dieta una leguminosa con taninos condensados (Woodward *et al.*, 2001; Pinares-Patiño *et al.*, 2003a; Waghorn *et al.*, 2002). Por ejemplo, la inclusión de *Lotus corniculatus* en la dieta de bovinos presentó entre un 16 y 25% menor emisión de metano por unidad de materia seca consumida o por unidad de producto en bovinos y ovinos (Woodward *et al.*, 2001; Waghorn *et al.*, 2002). Estos efectos también han sido corroborados en estudios *in vitro* e *in vivo* con leguminosas tropicales. Por ejemplo, en estudios *in vivo* con ovinos se ha evaluado la inclusión de hojas de leguminosas arbustivas (*Flemingia macrophylla* y *Calliandra calothyrsus*) que contienen taninos condensados, y se encontraron disminuciones en las emisiones de metano entre 20 y 30% explicados principalmente por una reducción en la degradabilidad de la materia seca (Tiemann *et al.*, 2008b). De tal forma Waghorn (2008) y Bouchard (2011) sugieren que la respuesta del animal al consumo de taninos es dependiente de la concentración de éstos en la dieta,

reportándose efectos benéficos cuando la concentración varía entre 2 y 4% y negativos con inclusiones mayores al 6%.

Finalmente, algunos autores han sugerido que taninos condensados de bajo peso molecular, según su estructura química, pueden formar complejos más estables con las enzimas microbiales disminuyendo su actividad, mientras que los de alto peso tienen una menor capacidad de afectar las poblaciones metanogénicas (Fiel et al, 1989). Otros han propuesto que taninos de mayor peso molecular tienen mayor capacidad de reaccionar con los componentes de la dieta (Huang et al., 2011). Waghorn (2008) sugiere que el peso molecular de los taninos no es el único factor que influye en su actividad. La concentración del tanino en la planta y su actividad biológica (Tieman et al., 2008a; Theodoridou et al., 2011) varían dependiendo de las condiciones ambientales (fertilidad del suelo, lluvias o sequía (Chesson y Forsberg, 1997). Adicionalmente, algunos autores sugieren que los microorganismos pueden desarrollar mecanismos de adaptación evitando el efecto de los taninos (Smith et al., 2005). Por lo tanto, el efecto de estos compuestos en la producción de metano depende de muchos factores que deben ser considerados en condiciones específicas de cada especie de leguminosa en un ambiente determinado.

- *Saponinas*- Algunas especies de leguminosas contienen saponinas como es el caso de la alfalfa (*Medicago sativa*). Las saponinas son glucósidos de alto peso molecular que disminuyen la tasa de producción de metano (Guo et al., 2008; Patra y Saxena, 2010). También interactúan con el colesterol presente en la membrana del protozooario causando su lisis (Hess et al., 2003, Jakmola et al., 2010). En varios trabajos la defaunación se ha asociado con la reducción entre un 15 y 40% de la producción de metano (Abreu et al., 2004; McAllister y Newbold, 2008). Se ha sugerido que este efecto se debe a la disminución en la transferencia de hidrógenos desde los protozoarios a las bacterias metanogénicas asociadas a la superficie de éstos y reducción en la digestión de la fibra (Hegarty, 1999; Machmüller et al., 2003; Buddle et al., 2011), además de un aumento en la concentración de ácido propiónico (Guo et al., 2008; Wang et al., 2009) y de biomasa microbial (Makkar et al., 1996).

Sin embargo, no todas las saponinas tienen el mismo efecto (Hess *et al.*, 2003; Beauchemin *et al.*, 2008; Guo *et al.*, 2008). Algunas investigaciones han sugerido que no existe una relación directa entre la adición de saponinas, la defaunación y la reducción en la producción de metano (Hess *et al.*, 2003; Goel *et al.*, 2008). En dietas basadas en forrajes los intentos de defaunación son menos efectivos que en dietas completamente mezcladas (Hegarty, 1999; Goel *et al.*, 2008; Bird *et al.*, 2008). También, se ha sugerido que las poblaciones microbiales se adaptan a la presencia de estos compuesto y los degradan por lo cual su efecto no sería permanente en el tiempo (Hess *et al.*, 2003).

De la información revisada no es posible concluir si la inclusión de una leguminosa en la dieta disminuye las emisiones de metano. Existen diferencias importantes entre leguminosas como su composición nutricional, su digestibilidad y presencia o no de metabolitos secundarios (Tavendale *et al.*, 2005) que sugieren que cada leguminosa debería considerarse de manera individual. Para aquellas leguminosas más comúnmente usadas en zonas templadas como son la alfalfa y el trébol blanco la mayoría de los resultados sugieren que reducen las emisiones de metano por unidad de materia seca consumida debido a un mayor consumo de alimento y aumento en las tasas de paso. En estudios donde no se presentó una disminución de metano con el uso de leguminosas como el caso de Carulla *et al.*, (2005), los consumos no se modificaron posiblemente explicando una respuesta diferencial con otros estudios; adicionalmente, estas leguminosas estaban ensiladas. Por otro lado, las leguminosas tropicales incluyen una gran diversidad de géneros y especies lo cual hace difícil concluir sobre las mismas. Los pocos trabajos que se han realizado con ellas muestran un aumento en la producción de metano cuando estas no contienen factores antinutricionales como los taninos (Hess *et al.*, 2006). Este aumento se debe a una mejoría en las condiciones de fermentación *in vitro* (mayores concentraciones de proteína y digestibilidades). El impacto de estos hallazgos en animales en pastoreo debe ser investigado ya que es probable que bajo estas circunstancias aumente el consumo voluntario y las tasas de paso, reduciendo la producción de metano por unidad de materia seca ingerida o por unidad de producto.

## 1.4 Características de las praderas sobre la producción de metano entérico

### 1.4.1 Madurez de la pradera

En estudios *in vitro* la respuesta de la madurez del forraje sobre la producción de metano ha sido contradictoria. Navarro-Villa *et al.*, (2011) y Purcell *et al.*, (2012) sugirieron que una mayor madurez en *L. perenne* aumenta las emisiones de metano por unidad de materia seca incubada. Sin embargo, para la misma gramínea, Purcell *et al.*, (2011) reportan una disminución en las emisiones de metano por unidad de materia seca incubada cuando aumenta la madurez del forraje. En la literatura pocos trabajos han evaluado el efecto de la madurez de las leguminosas sobre la producción de metano *in vitro*. Estudios *in vivo* con pasturas de zonas templadas como *L. perenne*, *Phleum pratense* y *T. repens* reportan que la mayor madurez del forraje se relaciona con un aumento, aunque no significativo, en la producción de metano por unidad de materia consumida (Beever *et al.*, 1985; Cammel *et al.*, 1986; Pinares-Patiño *et al.*, 2003b; Molano y Clark, 2008). Otros autores sugieren que a pesar de que no se encuentren diferencias significativas en las producción de metano por unidad de materia seca consumida entre forrajes jóvenes y maduros, podría ser menor la producción de metano por unidad de producto en forrajes tiernos debido a una aumento de la productividad animal (Clark *et al.*, 2005)

El efecto de la madurez sobre las emisiones de metano aparentemente no es claro. Sin embargo, en sus revisiones Beauchemin *et al.*, (2008) y Martin *et al.*, (2009) sugieren que la menor producción de metano en forrajes más tiernos podría estar asociada a una mayor concentración de ácido linolénico, azúcares solubles, y una mayor tasa de paso. Otras explicaciones podrían estar asociadas a las mayores digestibilidades de los forrajes tiernos y el cambio que esta mayor digestibilidad genera en el pH ruminal. A continuación se discutirán estos aspectos en detalle.

- **Lípidos** - Beauchemin *et al.* (2008) sugirieron que los ácidos grasos insaturados tienen la capacidad de capturar hidrógenos debido a los procesos de biohidrogenación ruminal, sin embargo su eficiencia es mucho menor que la formación de metano (Johnson y Johnson, 1995); estos autores proponen que un

mayor grado de insaturación tendría mayor capacidad de captura de hidrógenos. A pesar de esto, las concentraciones de lípidos en los forrajes son bajas (2-5%) (Swainson, 2011) y de éstos cerca del 50% son ácidos grasos (Palmquist y Jenkins, 2003) de los cuales el 50-60% son insaturados (Aguilar *et al.*, 2009). Además los forrajes tiernos normalmente contienen mayores concentraciones de lípidos que los maduros (Sun *et al.*, 2010), adicionalmente las proporciones de ácidos grasos insaturados en éstos y particularmente de ácido linolénico son mayores (Aguilar *et al.*, 2009), sugiriendo que pasturas más jóvenes tendría mayor potencial de reducción de metano.

- *Carbohidratos solubles* - Los forrajes maduros tienen una mayor concentración de carbohidratos estructurales (Sun *et al.*, 2010) lo cual ha sido relacionada directamente con una mayor producción de metano (Pinares-Patiño *et al.*, 2007b; Jayanegara *et al.*, 2009). Estos cambios implicarían que en forrajes tiernos con mayores concentraciones de carbohidratos solubles favorecen las rutas de degradación de los carbohidratos hacia propionato (Murphy *et al.*, 1982). Aunque la literatura ha evidenciado que al aumentar los almidones se favorecen estas rutas (Van Soest, 1994) esto ha sido menos evidente para los carbohidratos solubles en los pastos (Purcell *et al.*, 2012) y en algunos casos opuesto (Navarro-Villa *et al.*, 2011). Varios autores no han encontrado cambios en el patrón de AGV asociados a la madurez o concentración de azúcares solubles *in vitro* (Hall *et al.*, 1998; Taweel *et al.*, 2005) aunque otros han reportado mayores proporciones de propionato para forrajes ricos en carbohidratos solubles (Purcell *et al.*, 2011).
- *Tasas de paso*- Pinares-Patiño *et al.* (2003c) y Pinares-Patiño *et al.* (2007a) han relacionado inversamente la tasa de paso con la producción de metano, es difícil explicar esta relación ya que la formación de metano es consecuencia de la actividad microbiana. Adicionalmente, los diferentes carbohidratos tienen rutas de degradación compartidas por lo cual los cambios en la composición del forraje debido a la madurez difícilmente explicarían las variaciones en la producción de metano. Los productos finales de la degradación de los carbohidratos están más asociados a los microorganismos que los degradan, los cuales dependen del ambiente ruminal (tasas de paso, pH) (Murphy *et al.*, 1982). Los cambios en las poblaciones microbiales ruminales debido a mayores tasas de paso en estos

estudios no han sido caracterizadas. Sin embargo, a mayores tasas de paso se disminuyen las proporciones de hongos ruminales y protozoarios (Dehority y Orpin, 1997) además de la digestibilidad de la materia orgánica (Alwash y Thomas, 1971). El rol de los protozoarios en la producción de metano ha sido ampliamente documentada (Williams y Coleman, 1997; Hegarty, 1999) y en menor grado la de los hongos (Orpin y Joblin, 1997), aunado a esto Pinares-Patiño *et al.* (2003c) reportan que el contenido de materia orgánica en el rumen está directamente relacionada con la producción de metano. Esto sugeriría que en las dietas con forrajes jóvenes las poblaciones de hongos y protozoarios son menores, además se reduciría la digestibilidad de la materia orgánica resultando en una disminución de la producción de metano. Esta relación debería ser verificada en estudios donde se evalúe la producción de metano y los cambios en las poblaciones microbiales debido a los cambios de la madurez del forraje y las tasas de pasaje.

- *pH ruminal*- Por último, forrajes jóvenes tienen mayores digestibilidades que aquellos maduros (Navarro-Villa *et al.*, 2011), esta diferencia implicaría una mayor concentración de AGV en el fluido ruminal y por lo tanto un menor pH. Algunos trabajos han reportado menores pH en pasturas tiernas (Purcell *et al.*, 2012; Navarro-Villa *et al.*, 2011), lo que sugeriría también cambios en las poblaciones microbiales asociados a menores pH (Kaufman *et al.*, 1980). Los pH inferiores a 6,2 son menos favorables para el crecimiento de microorganismos fibrolíticos (Van Soest, 1994) que normalmente producen mayores proporciones de acetato en el fluido y por lo tanto mayores cantidades de metano por unidad de materia orgánica degradada (Pinares-Patiño *et al.*, 2007a). El impacto sobre las poblaciones microbiales dependería de las diferencias entre la madurez del forraje y el consumo de alimento.

### **1.4.2 Manejo de la pastura**

Existen pocos trabajos donde se han estudiado los aspectos asociados al manejo de la pastura (sistema de pastoreo, oferta forrajera, carga animal) y su efecto en la producción de metano. DeRamus *et al.*, (2003) reportaron que existe una disminución del 22% en las emisiones de metano por unidad de producto cuando se compara un manejo tradicional

de la pastura (continuo, sin rotación, sin fertilización) con un manejo intensivo rotacional (con fertilización y resiembra), debido a un aumento en la eficiencia animal a través del año. Desafortunadamente, en este ensayo es difícil separar los aspectos asociados a las diferentes variables consideradas como manejo.

Otros estudios han considerado el efecto de la oferta forrajera sobre la producción de metano. Los estudios han sugerido que al aumentar la disponibilidad de forraje en un 60%, se aumentan las emisiones de metano por unidad animal en un 41%, pero disminuyen por unidad de materia seca consumida en un 23%, posiblemente relacionado con un aumento en la tasa de pasaje (Pinares-Patiño *et al.*, 2003d). Otros trabajos argumentan que una menor cantidad de forraje residual en el anterior pastoreo y por lo tanto una mayor presión de pastoreo disminuye la producción de metano, debido a una menor concentración de carbohidratos estructurales en la composición de la pradera (Wims *et al.*, 2010). McCaughey *et al.* (1997) sugieren que al aumentar la carga de 1,1 a 2,2 animales por hectárea, se disminuyen las emisiones de metano por unidad de materia orgánica fermentada en un 15%, debido a una disminución en las concentraciones de carbohidratos estructurales de la pradera, lo que disminuye el tiempo de retención del alimento en el rumen. Estos trabajos parecerían contradictorios pues para lograr un menor forraje residual se requiere una menor oferta forrajera. Por lo tanto, el efecto a largo plazo de una mayor oferta podría considerarse negativo debido a una disminución en la calidad de la pastura en el largo plazo. Aquí se requerirían investigaciones de largo plazo en pastoreo comparando altas y bajas ofertas de forraje que nos permitan evidenciar el efecto de dicho manejo sobre las emisiones de metano.

### 1.4.3 Fertilización

La emisión de metano por unidad de MS consumida disminuye cuando se incrementa el nivel de fertilización de la pastura (Ellis *et al.*, 2012). Bannink *et al.*, (2009) reportan una disminución del 8% en la producción de metano cuando se comparó una fertilización de 450 vs 150 kg de nitrógeno por hectárea año. Sin embargo en pasturas asociadas de gramínea y leguminosa no se presentaron diferencias en las emisiones de metano cuando se aplicó una fertilización nitrogenada (Mbanzamihigo *et al.*, 2002). En estudios *in vitro* Lovett *et al.*, (2004) y Navarro-Villa *et al.*, (2011) encontraron una relación lineal ( $P < 0,0001$ ) entre la aplicación de nitrógeno al suelo y la producción de metano por

unidad de materia orgánica degradada, posiblemente debido a una disminución en la degradabilidad de la materia orgánica en pasturas que recibieron niveles crecientes de N y a mayores concentraciones de nitratos (Leng, 2008).

## 1.5 Conclusiones

Esta revisión de literatura sugiere que existen diferentes herramientas que permitirían disminuir la producción metano por unidad de materia seca ingerida en los sistemas de pastoreo. Algunas de estas asociadas a la calidad del forraje que está determinada por aspectos de las especies, variedades, madurez, presencia de compuestos secundarios y manejo de la pastura. En la mayoría de estudios donde estas herramientas fueron evaluadas muestran que la disminución de metano estuvo asociada a un aumento en el consumo voluntario y las tasas de paso. Varios autores han reconocido que el consumo de materia seca es el principal factor que influye sobre la producción de metano entérico (Buddle *et al.*, 2011). Esta disminución por unidad de materia seca consumida es más evidente en dietas de mayor digestibilidad (Ulyatt y Lassey, 2000). Hay evidencia que hay un aumento en la producción de metano cuando hay una alta proporción de carbohidratos disponibles en la dieta y el consumo de materia seca limitado (Johnson y Johnson, 1995). Las primeras investigaciones que evaluaron el efecto del consumo sobre la producción de metano encontraron una estrecha relación, entre el consumo y la digestibilidad de la dieta (Blaxter y Clapperton, 1965) y es evidente que se presenta una mayor producción de metano por unidad de materia seca ingerida en dietas de baja digestibilidad a un consumo de mantenimiento. Por el contrario, en dietas de alta digestibilidad y con un consumo 3 veces el de mantenimiento se disminuye la producción de metano entérico (Blaxter y Clapperton, 1965; Pinares-Patiño *et al.*, 2010; Buddle *et al.*, 2011).

Esto sugiere que todas aquellas prácticas asociadas a que se aumente el consumo de materia seca de los forrajes serían conducentes a una menor producción de metano por unidad de materia seca ingerida. En este sentido las prácticas de manejo destinadas a una disminución en las concentraciones de fibra serían efectivas en la estrategia de disminuir el metano por unidad de materia seca ingerida ya que una disminución en las concentraciones de fibra demostró un aumento en el consumo (Mertens, 1985). En



investigaciones recientes se reporta una relación positiva entre el consumo de materia seca, la digestibilidad del FDN y la producción de metano proveniente de dietas con una alta proporción de forraje (Lovett *et al.*, 2005b; Pinares-Patiño *et al.*, 2007a; Molano y Clark, 2008). En este mismo sentido el uso de leguminosas en las pasturas (Tiemman *et al.*, 2008a), la reducción en la edad de pastoreo, la madurez del forraje (Pinares-Patiño *et al.*, 2003b) y el aumento en la oferta de forraje (Pinares-Patiño *et al.*, 2007b) han demostrado un aumento en el consumo voluntario y disminución en la producción de metano. Finalmente, la presencia de compuestos secundarios presentes en especies forrajeras (taninos condensados y saponinas) han demostrado que algunas especies tienen un potencial de mitigación de la emisiones de metano (Woodward *et al.* 2001; Waghorn *et al.*, 2002; Hess *et al.*, 2003).

## 1.6 Bibliografía

Abreu, A., Carulla, JE., Lascano, CE., Diaz, TE., Kreuzer, M. and Hess, HD. 2004. Effects of *Sapindus saponaria* fruits on ruminal fermentation and duodenal nitrogen flow of sheep fed a tropical grass diet with and without legume. J Anim Sci, 82:1392-1400.

Abreu, A., Carulla, JE., Kreuzer, M., Lascano, CE., Díaz, TE., Cano, A. and Hess, HD. 2003. Efecto del fruto, del pericarpio y del extracto semipurificado de saponinas de *Sapindus saponaria* sobre la fermentación ruminal y la metanogénesis *in vitro* en un sistema RUSITEC. Rev Col Cienc Pec, 16:2, 147-154.

Aguilar, O., Moreno, B., Cárdenas, E., Pabón, M. and Carulla, J. 2009. Efecto del consumo de kikuyo (*Pennisetum caldestinum*) o ryegrass (*Lolium* spp.) sobre la concentración de ácido linoléico conjugado y el perfil de ácidos grasos de la grasa láctea. Lives Res Rural Develop 21:49.

Alwash, AH. and Thomas, PC. 1971. Effect of the physical form of the diet and the level feeding on the digestion of dried grass by sheep. J Sci Food Agri, 22: 611- 615.

Attwood, G. and McSweeney, C. 2008. Methanogen genomics to discover targets for methane mitigation technologies and options for alternative H<sub>2</sub> utilization in the rumen. *Aust J Exp Agri*, 48:28-37.

Bannink, A., Smits, MCJ., Kebreab, E., Mills, JAN., Ellis, JL., Klop, A., France, J. and Dijkstra, J. 2009. Simulating the effects of grasslands management and grass ensiling on methane emissions from lactating cows. *J Agr Sci*, 148: 55-72.

Beauchemin, KA., Kreuzer, M., O'mara, F. and McAllister, TA. 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Aust J Exp Agri*, 48: 21-27.

Beauchemin, KA., McGinn, SM., Martinez, TF. and McAllister TA. 2007. Use of condensed tannin extract from quebracho trees to reduce methane emissions from cattle. *J Anim Sci*, 85:1990-1996.

Beever, DE., Thomson, DJ., Ulyatt, MJ., Cammell, SB. and Spooner MC. 1985. The digestion of fresh perennial ryegrass (*Lolium perenne* L. cv. Melle) and white clover (*Trifolium repens* L. cv. Blanca) by growing cattle fed indoors. *Brit J Nutr*, 54: 763-775.

Bhatta, R., Uyeno, Y., Tajima, K., Takenaka, A., Yabumoto, Y., Nonaka, I., Enishi, O. and Kurihara, M. 2009. Difference in the nature of tannins on *in vitro* ruminal methane and volatile fatty acid production and on methanogenic archaea and protozoal populations. *J Dairy Sci*, 92: 5512-5522.

Bird, SH., Hegarty, RS. and Woodgate, R. 2008. Persistence of defaunation effects on digestion and methane production in ewes. *Aust J Exp Agri* 48:152-155.

Blaxter, KL. and Clapperton, JL. 1965. Prediction of the amount of methane produced by ruminants. *Brit J Nutr* 19:511-522.

Boadi, D., Benchaar, C., Chiquette, J. and Massé, D. 2004. Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows: Update review. *Can J Anim Sci* 84:319-335.

Bouchard, K. 2011. Methane emissions and rumen microbial changes in steers fed condensed tannin containing diets under western Canadian conditions. Master of Science Thesis. Department of Animal Science. University of Manitoba. Winnipeg, MB. Canada.

Buddle, BM., Denis, M., Attwood, GT., Altermann, E., Janssen, PH., Ronimus, RS., Pinares-Patiño, CS., Muetzel, S. and Wedlock, DN. 2011. Review: Strategies to reduce methane emissions from farmed ruminants grazing on pastures. *The Vet J*, 188: 11-17.

Cabrera, M., Duarte, M., Gutiérrez, MM., and Lozano RJ. 2010. Inventario Nacional de Emisiones de Gases de Efecto Invernadero. In: 2ª Comunicación Nacional ante la Convención Marco de las Naciones Unidas Sobre Cambio Climático. IDEAM. Capítulo 2. Bogotá, Colombia. págs 120-152.

Cammel, SB., Thomson, DJ., Beaver, DE., Haines, MJ., Chanoa, MS. and Spooner, MC. 1986. The efficiency of energy utilization in growing cattle consuming fresh perennial ryegrass (*Lolium perenne* cv. Melle) or white clover (*Trifolium repens* cv. Blanca). *Brit J Nutr*, 55: 669-680.

Carulla, JE., Kreuzer, M., Machmüller, A. and Hess, HD. 2005. Supplementation of *Acacia mearnsii* tannin decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. *Aust J Agr Res*, 56:961-970.

Chavez, AV., Thompson, LC., Iwaasa, AD., Scott, SL., Olson, ME., Benchaar, C., Veira, DM. and McAllister, TA. 2006. Effect of pasture type (alfalfa vs grass) on methane and carbon dioxide production by yearling beef heifers. *Can J Anim Sci*, 86: 409-418.

Chesson, A. and Forsberg, CW. Polysaccharide degradation by rumen microorganisms. In: *The rumen microbial ecosystem*. Ed: Hobson, PN. and Stewart, CS. Blackie Academic & Professional, London, UK. pág 364.

Clark, H., Pinares-Patiño, C. and De Klein, C. 2005. Methane and nitrous oxide emissions from grazed grasslands. In: *Grassland: A global Resource*. Ed: McGilloway DA. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands. págs 279-293.

Cortés, JE., Moreno, B., Pabón, ML., Avila, P., Kreuzer, M., Hess, HD. and Carulla, JE. 2009. Effects of purified condensed tannins extracted from *Calliandra*, *Flemingia* and *Leucaena* on ruminal and posruminal degradation of soybean meal as estimated *in vitro*. *Anim Feed Sci Technol*, 151: 194-204.

Dehority, BA. and Orpin, CG. 1997. Development of, and natural fluctuations in, rumen microbial populations. In: *The rumen microbial ecosystem*. Ed: Hobson, PN. and Stewart, CS.. Blackie Academic & Professional, London, UK. págs 204-218.

De Klein, CAM., Pinares-Patiño, C. and Waghorn, GC. 2008. Greenhouse gas emissions. In: *Environmental impacts of pasture-based farming*. Ed: McDowell RW. CAB International. London, UK. págs 1-32.

DeRamus, HA., Clement, TC., Giampola, DD. and Dickison, PC. 2003. Methane emissions of beef cattle on forage: Efficiency of grazing management system. *J Environ Qual*, 32:269-277.

Eckard, RJ., Grainger, C. and De Klein, CAM. 2010. Options for the abatement of methane and nitrous oxide from ruminant production: A review. *Livest Sci*, 130: 47-56.

Ellis, JL., Dijkstra, J., France, J., Parson, AJ., Edwards, GR., Rasmussen, S., Kebreab, E. and Bannink, A. 2012. Effect of high-sugar grasses on methane emissions simulated using a dynamic model. *J Dairy Sci*, 95: 272-285.

Field, JA., Kortekaas, S., and Lettinga, G. 1989. The tannin theory of methanogenic toxicity. *Biol Wastes*, 29: 241-261.

Goel, G., Makkar, HPD. and Becker, K. 2008. Effects of *Sesbania sesban* and *Carduus pycnocephalus* leaves and Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) seed and their extracts on partitioning of nutrients from roughage and concentrate based feeds to methane. *Anim Feed Sci Technol*, 147: 72-89.

Guo, YQ., Liu, JX., Lu, Y., Zhu, WY., Denman, SE. and McSweeney, CS. 2008. Effect of tea saponin on methanogenesis, microbial community structure and expression of *mcrA* gene, in cultures of rumen micro-organisms. *Lett Appl Microbiol*, 47:421-426.

Hall, MB., Pell, AN. and Chase, LE. 1998. Characteristics of neutral detergent-soluble fiber fermentation by mixed ruminal microbes. *Anim Feed Sci Technol*, 70: 23-39.

Hegarty, RS. 1999. Reducing rumen methane emissions through elimination of rumen protozoa. *Aust J Agri Res*, 50:1321-1327.

Hess, HD., Mera, ML., Tiemann, TT., Lascano, CE. and Kreuzer, M. 2008. *In vitro* assessment of the suitability of replacing the low-tannin legume *Vigna unguiculata* with the tanniniferous legumes *Leucaena leucocephala*, *Flemingia macrophylla* or *Calliandra calothyrsus* in a tropical grass diet. *Anim Feed Sci Technol*, 147:105-115.

Hess, HD., Tiemann, TT., Noto, F., Carulla, JE. and Kreuzer, M. 2006. Strategic use of tannins as means to limit methane emission from ruminant livestock. *Int Cong Series*, 1293: 164-167.

Hess, HD., Monsalve, LM., Lascano, CE., Carulla, JE., Díaz, TE. and Kreuzer M. 2003. Supplementation of a tropical grass diet with forage legumes and *Sapindus saponaria* fruits: effects on *in vitro* ruminal nitrogen turnover and methanogenesis. *Aust J Agri Res*, 54: 703-713.

Huang, XD., Liang, JB., Tan, HY., Yahya, R., Khamseekhiew, B. and Ho, YW. 2011. Molecular weight and protein binding affinity of *Leucaena* condensed tannins and their effects on *in vitro* fermentation parameters. *Anim Feed Sci Technol*, 166-167, 373-376.

Jayanegara, A., Togtokhbayar, N., Makkar, HPS. and Becker, K. 2009. Tannins determined by various methods as predictors of methane production reduction potential of plants by an *in vitro* rumen fermentation. *Anim Feed Sci Technol*, 150: 230-237.

Jakhmola, RC., Pahuja, T. and Raghuvansi, SKS. 2010. Feeding strategies to reduce enteric methane production in ruminants: a review. *Indian J Small Ruminants*, 16:1-17

Johnson, JMF., Franzluebbbers, AJ., Lachnicht, S. and Reicosky, DC. 2007. Review: agricultural opportunities to mitigate greenhouse gas emissions. *Environ Pollut*, 150:107-124.

Johnson, KA. and Johnson, DE. 1995. Methane emissions from cattle. *J Anim Sci*, 73: 2483-2492.

Kamra, ND., Agarwal, N. and Chaudhary, LC. 2010. Effect of tropical feeds and plants containing secondary metabolites on methane emission by ruminants. *Trop Anim Health Pro*, 1701: 1-23.

Kaufmann, W., Hagemeister, H. and Dirksen, G. 1980. Adaptation to changes in dietary composition, level and frequency of feeding. In: *Digestive Physiology and Metabolism in Ruminants*. Ed: Ruckebusch, Y. and Thivend, P. AVI Publishing Co. Westport, CT. pág 587.

Klevenhusen, F., Bernasconi, SM., Hofstetter, T., Bolotin, J., Kunz, C. and Soliva, CR. 2009. Efficiency of monolaurin in mitigating ruminal methanogenesis and modifying C-isotope fractionation when incubating diets of either C3 or C4 plants in a rumen simulation technique (Rusitec) system. *Brit J Nutr*, 18:6, 1-11.

Knight, TW., Molano, G., Nichols, W. and Clark, H. 2007. Effect of feeding caucasian clover, white clover, ryegrass and combinations of ryegrass and clovers on methane emissions of weather lambs. In: *Greenhouse Gases and Animal Agriculture Conference*. Poster Sesion 1. P1.23. Christchurch. New Zealand.

Kurihara, M., Magner, T., Hunter, RA. and McCrabb, GJ. 1999. Methane production and energy partition of cattle in the tropics. *Brit J Nutr*, 81: 227-234.

Leng, RA. 2008. The potential of feeding nitrate to reduce enteric methane production in ruminants. A Report. The Department of Climate Change. Commonwealth Government of Australia. Canberra. Australia.

Lovett, DK., McGilloway, D., Bortolozzo, A., Hawkins, M., Callan, J., Flynn, B. and O'Mara, FP. 2005a. *In vitro* fermentation patterns and methane production as influenced by cultivar and season of harvest of *Lolium perenne* L. Grass Forage Sci. 61:9-21.

Lovett, DK., Stack, LJ., Lovell, S., Callan, J., Flynn, B., Hawkins, M., and O'Mara, FP. 2005b. Manipulating enteric methane emissions and animal performance of late-lactation dairy cows through concentrate supplementation at pasture. J Dairy Sci, 88: 2836-2842.

Lovett, DK., Bortolozzo, A., Conaghan, P., O'Kiely, P. and O'Mara, FP. 2004. *In vitro* total and methane gas production as influenced by rate of nitrogen application, season of harvest and perennial ryegrass cultivar. Grass Forage Sci, 59:227-232.

Machmüller, A., Soliva, CR. and Kreuzer, M. 2003. Effect of coconut oil and defaunation treatment on methanogenesis in sheep. Reprod Nutr Dev, 43:41-55.

Makkar, HPS., Blümmel, M. and Becker, K. 1996. *In vitro* effects of and interactions between tannins and saponins and fate of tannins in the rumen. J Sci Food Agr 69: 481-493.

Margan, DE., Graham, NM., Minson, DJ. and Searle, TW. 1988. Energy and protein values of four forages, including a comparison of tropical and temperate species. Aust J Exp Agri, 28:729-736.

Martin, C., Morgavi, DP. and Doreau, M. 2009. Methane mitigation in ruminants: from microbe to farm scale. The Animal Consortium 2009. Anim 1-15.

Mbanzamihigo, L., Fievez, V., da Costa-Gomez, C., Piattoni, F., Carlier, L. and Demeyer D. 2002. Methane emissions from rumen of sheep fed a mixed grass-clover pasture at two fertilization rates in early and late season. Can J Anim Sci, 82: 69-77.

McAllister, TA. and Newbold, CJ. 2008. Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. Aust J Exp Agri, 48: 7-13.

McAllister, TA., Okine, EK., Mathison, GW. and Cheng, KJ. 1996. Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. *Can J Anim Sci*, 76: 231-243.

McCaughey, WP., Wittenberg, K. and Corrigan D. 1999. Impact of pasture on methane production by lactating beef cows. *Can J Anim Sci*, 79: 221-226.

McCaughey, WP., Wittenberg, K. and Corrigan, D. 1997. Methane production by steers on pasture. *Can J Anim Sci*, 77: 519-524.

McCraab, GJ. and Hunter, RA. 1999. Prediction of methane emissions from beef cattle in tropical production systems. *Aust J Agri Res*, 50: 1335-1339.

McSweeney, CS., Palmer, B., Bunch, R. and Krause, DO. 2001. Effect of the tropical forage calliandra on microbial protein synthesis and ecology in the rumen. *J Appl Microbiol*, 90:78-88.

Mertens, DR. 1985. Factors influencing feed intake in lactating dairy cows: from theory to application using neutral detergent fiber. In: *Proc Georgia Nutrition Conference*. Universidad de Georgia, Athens. págs 1-18.

Mieres, J., Olivera, L., Martino, D., La Manna, A., Fernández, E., Palermo, R. and Gremminger, H. 2002. Methane emissions from holstein heifers grazing contrasting pastures in Uruguay. Disponible en:

<http://www.carbosur.com.uy/archivos/Beijing%20Nov%202003.pdf>

Misselbrook, T., Kim, EJ., Bulmer, N., Munrray, R., Scollan, N. and Chadwick, D. 2010. Evaluation of effects of grass water-soluble carbohydrate on methane emissions from grazing lambs. In: *Proceeding of the 4<sup>th</sup> Greenhouse Gases and Animal Agriculture Conference*. Ed: McGeough, EJ. and McGinn, SM. Greenhouse Gases and Animal Agriculture Conference. Banff, Canada.

Moe, PW. and Tyrrell, HF. 1979. Methane production in dairy cows. *J Dairy Sci* 62: 1583-1586.



Molano, G. and Clark, H. 2008. The effect of level of intake and forage quality on methane production by sheep. *Aust J Exp Agri*, 48: 219-222.

Muetzel, S., Knight, TW., Hoskin, SO., Molano, G., Maclean, S., Silva-Villacorta, D. and Clark, H. 2009. Level of intake and physiological state influences methane emissions from sheep fed fresh pasture. En: *Ruminant physiology, digestion metabolism and effects of nutrition on reproduction and welfare*. Ed: Chilliard, Y., Glasser, F., Faulconnier, Y., Bocquier, F., Vissier, I. and Doreau, M. *Proceedings of the XI International Symposium on Ruminant Physiology*.

Murphy, MR., Baldwin, RL. and Koong, LJ. 1982. Estimation of stoichiometric parameters for rumen fermentation of roughage and concentrate diets. *J Animal Sci*, 55: 411-421.

Navarro-Villa, A., O'Brien, M., López, S., Boland, TM. and O'Kiely, P. 2011. *In vitro* rumen methane output of red clover and perennial ryegrass assayed using the gas production technique (GPT). *Anim Feed Sci Technol*, 168: 152-164.

Neely, C., Bunning, S. and Wilkes A. 2009. Review of evidence on drylands pastoral systems and climate change. Implications and opportunities for mitigation and adaptation. *Land and Water Discussion Paper 8*. FAO. Roma, Italia.

Niggli, U., Fliebbach, A., Hepperly, P. and Scialabba, N. 2009. Low Greenhouse gas Agriculture: Mitigation and adaptation potential of sustainable farming systems. FAO, April 2009, Rev 2-2009.

O'Mara, FP., Beauchemin, KA., Kreuzer, M. and McAllister, TA. 2008. Reduction of greenhouse gas emissions of ruminants through nutritional strategies. *Proceeding International Conference. Livestock and Global Climate Change 2008*. Ed: Rowlinson, P., Steele, M. and Nefzaoui A. Hammamet, Tunisia.

Orpin, CG. and Joblin, KN. 1997. The rumen anaerobic fungi. In: *The rumen microbial ecosystem*. Ed: Hobson, PN. and Stewart, CS. Blackie Academic & Professional, London, UK. pág 174.

Palmquist, DL. and Jenkins, TC. 2003. Challenges with fats and fatty acid methods. *J Anim Sci*, 81: 3250-3254.

Patra, AK. and Saxena, J. 2010. Review: A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*, 71: 1198-1222.

Pinares-Patiño CS., Laubach J., Molano G., Cárdenas EA., McLean S., Sandoval E. y Taylor G. 2010. Methane emissions from cattle stocked at high density and fed three different feeding levels. In: *Proceeding of the 4<sup>th</sup> Greenhouse Gases and Animal Agriculture Conference*. Ed: McGeough, EJ. and McGinn, SM. *Greenhouse Gases and Animal Agriculture Conference*. Banff, Canada.

Pinares-Patiño, CS., Waghorn, GC., Machmüller, A., Vlaming, B., Molano, G., Cavanagh, A. and Clark, H. 2007a. Methane emissions and digestive physiology of non-lactating dairy cows fed pasture forage. *Can J Anim Sci*, 86: 601-613.

Pinares-Patiño, CS., D'Hour, P., Jouany, JP. and Martin, C. 2007b. Effects of stocking rate on methane and carbon dioxide emissions from grazing cattle. *Agr Ecosystems Environ*, 121: 30-46.

Pinares-Patiño, CS., Ulyatt, MJ., Waghorn, GC., Lassey, KR., Barry, TN., Holmes, CW. and Johnson, DE. 2003a. Methane emissions by alpaca and sheep fed on Lucerne hay or grazed on pastures of perennial ryegrass/white clover or birdsfoot trefoil. *J Agr Sci*, 140: 215-226.

Pinares-Patiño, CS., Baumont, R. and Martin, C. 2003b. Methane emissions by Charolais cows grazing a monospecific pasture of timothy at four stages of maturity. *Can J Anim Sci*, 83: 769-777.

Pinares-Patiño, CS., Ulyatt, MJ., Lassey, KR., Barry, TN. and Holmes, CW. 2003c. Rumen function and digestion parameters associated with differences between sheep in methane emissions when fed chaffed lucerne hay. *J Agr Sci*, 140: 205-214.

Pinares-Patiño, CS., Ulyatt, MJ., Lassey, KR., Barry, TN. and Holmes, CW. 2003d. Persistence of differences between sheep in methane emission under generous grazing conditions. *J Agr Sci*, 140: 227-233.

Primavesi, O., Frighetto, RTS., Pedreira, MS., Lima, MA. and Berchielli, TT. 2004. Metano entérico de bovinos leiteiros em condições tropicais brasileiras. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*. Brasilia. v 39:277-283.

Primavesi, O., Frighetto, RTS., Pedreira, MS., Lima, MA., Berchielli, TT. and Rodrigues, AA. 2003. Low-fiber sugarcane to improved meat production with less methane emissions in tropical dry season. Disponible en:

<http://www.coalinfo.net.cn/coalbed/meeting/2203/papers/agriculture/AG066.pdf>

Purcell, PJ., O'Brien, M., Navarro-Villa, A., Boland, TM., McEvoy, M., Grogan, D. and O'Kiely, P. 2012. *In vitro* rumen methane output of perennial ryegrass varieties and perennial grass species harvested throughout the growing season. *Grass Forage Sci*. doi: 10.1111/j.1365-2494.2011.00845.x.

Purcell, PJ., O'Brien, M., Boland, TM., O'Donovan, M. and O'Kiely, P. 2011. Impacts of herbage mass and sward allowance of perennial ryegrass sampled throughout the growing season on *in vitro* rumen methane production. *Anim Feed Sci Technol*, 166-167:405-411.

Salisbury, FB. and Ross, CW. 2000. Fisiología de las plantas 2. Bioquímica vegetal. Ed: Thomson Editores Spain. Traducción Alonso, JM. Madrid, España. págs 359-374.

Smith, AH., Zoetendal, EG. and Mackie, RI. 2005. Bacterial mechanisms to overcome inhibitory effects of dietary tannins. *Microb Ecol*, 50:197-205.

Solomon SD., Qin M., Manning RB., Alley T., Berntsen NL., Bindoff Z., Chen A., Chidthaisong JM., Gregory GC., Hegerl M., Heimann B., Hewitson BJ, Hoskins F., Joos J., Jouzel V., Kattsov U., Lohmann T., Matsuno M., Molina N., Nicholls J., Overpeck J., Raga G., Ramaswamy J., Ren M., Rusticucci R., Somerville TF., Stocker P., Whetton

RA., and Wratt D. 2007. Technical Summary. In: Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Ed: Solomon S., Qin D., Manning M., Chen Z., Marquis KB., Averyt M and Miller. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.

Sun, XZ., Hoskin, SO., Zhang, GG., Molano, G., Muetzel, S., Pinares-Patiño, CS., Clark, H. and Pacheco, D. 2011a. Sheep fed forage chicory (*Cichorium intybus*) or perennial ryegrass (*Lolium perenne*) have similar methane emissions. Anim Feed Sci Technol, 172: 217-225.

Sun, XZ., Hoskin, SO., Muetzel, S., Molano, G. and Clark, H. 2011b. Effects of forage chicory (*Cichorium intybus*) and perennial ryegrass (*Lolium perenne*) on methane emissions *in vitro* and from sheep. Anim Feed Sci Technol. 166-167: 391-397.

Sun, XZ., Waghorn, GC. and Clark, H. 2010. Cultivar and age of regrowth effects on physical, chemical and *in sacco* degradation kinetics of vegetative perennial ryegrass (*Lolium perenne* L). Anim Feed Sci Technol, 155: 172-185.

Swainson, NM. 2011. Methane emissions and mitigation technologies in cattle, sheep and red deer. Doctor of Philosophy Thesis. Massey University. Palmerstone North. New Zealand.

Tavendale, MH., Meagher, L., Pacheco, D., Walker, N., Attwood, GT. and Sivakumaran, S. 2005. Methane production from *in vitro* rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. Anim Feed Sci Technol, 123-124: 403-419.

Taweel HZ., Tas BM., Smit HJ., Elgersma A., Dijkstra J. and Tamminga S. 2005. Effects of feeding perennial ryegrass with an elevated concentration of water-soluble carbohydrates on intake, rumen function and performance dairy cows. Anim Feed Sci Technol, 121: 243-256.

Theodoridou, K., Aufrère, J., Niderkorn, V., Andueza, D., Morvan, AL., Picard, F. and Baumont R. In vitro study of the effects of condensed tannins in sainfoin on the digestive process in the rumen at two vegetation cycles. *Anim Feed Sci Technol*, 170:147-159.

Tiemann, TT., Avila, P., Ramírez, G., Lascano, CE., Kreuzer, M. and Hess, HD. 2008a. *In vitro* ruminal fermentation of tanniferous tropical plants: Plant-specific tannin effects and counteracting efficiency of PEG. *Anim Feed Sci Technol*, 146: 222-241.

Tiemann, TT., Lascano, CE., Wettstein, HR., Mayer, AC., Kreuzer, M. and Hess, HD. 2008b. Effect of the tropical tannin-rich shrub legumes *Calliandra calothyrsus* and *Flemingia macrophylla* on methane emission and nitrogen and energy balance in growing labs. *Anim*, 2: 790-799.

Ulyatt, MJ. and Lassey, KR. 2000. Methane emissions from pastoral systems: the situation in New Zealand. *Arch Latinoam Produc Anim* 9:118-126.

Van Dorland, HA., Wettstein, HR., Leuenberger, H. and Kreuzer, M. 2007. Effect of supplementation of fresh and ensiled clovers to ryegrass on nitrogen loss and methane emission in dairy cows. *Liv Sci*, 111:57-69.

Van Soest, PJ. 1994. Nutritional ecology of the ruminant. 2 edition. Cornell University Press. USA. págs 253-316.

Waghorn, GC. and Hegarty, RS. 2011. Lowering ruminant methane emissions through improved feed conversion efficiency. *Anim Feed Sci Tech*, 166-167: 291-301.

Waghorn, G. 2008. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production-Progress and challenges. *Anim Feed Sci*. 147:116-139.

Waghorn, GC. and Clark, DA. 2006. Greenhouse gas mitigation opportunities with immediate application to pastoral grazing for ruminants. *Int Congr Series*, 1293:107-110.

Waghorn, GC., Tavendale, MH. and Woodfield, DR. 2002. Methanogenesis from forages fed sheep. P New Zeal Grass Assoc, 64:167-171.

Wang, CJ., Wang, SP. and Zhou, H. 2009. Influences of flavomycin, ropadiar, and saponin on nutrient digestibility, rumen fermentation, and methane emission from sheep. Anim Feed Sci Tech, 148:157-166.

Williams, YJ., Walker, GP., Doyle, PT., Egan, AR. and Stockdale. 2005. Rumen fermentation characteristics of dairy cows grazing different allowance of Persion clover- or perennial ryegrass-dominant swards in spring. Aust J Exp Agri, 45:665-675.

Williams, AG. and Coleman, GS. 1997. The rumen Protozoa. In: The rumen microbial ecosystem. Ed: Hobson, PN. and Stewart, CS. Blackie Academic & Professional, London, UK. pág 82.

Wilsom, JR. 1993. Organization of forage plant tissues. In: Forage cell wall structure and digestibility. Ed: Jung, HG., Buxton, DR., Hatfield RD., and Ralph, J. Winsconsin, USA. págs 1-27.

Wims, CM., Deighton, MH., Lewis, E., O'Loughlin, B., Delaby, L., Boland, TM. and O'Donovan, M. 2010. Effect of pregrazing herbage mass on methane production, dry matter intake and milk production of grazing dairy cows during the mid-lactation period. A Climate for Change, Opportunities for Carbon-Efficient Farming. Association of Applied Biologist.

Woodward, SL., Waghorn, GC., Ulyatt, MJ. and Lassey, KR. 2001. Early indications that feeding Lotus will reduce methane emissions form ruminants. Proc New Zeal Soc An, 61: 23-26.

Zelege, AB., Clément, C., Hess, HD., Kreuzer, M. and Soliva, CR. Effect of foliage from multi-purpose trees and a leguminous crop residue on *in vitro* methanogenesis and ruminal N use. Int Congr Series, 1293: 168-171. indique el contenido del capítulo.







## 2. Cambios en las emisiones de metano debido a la especie y el estado de madurez en forrajes del trópico alto colombiano incubados *in vitro*

### Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la especie y de la madurez del forraje sobre las emisiones de metano de cuatro especies incubadas *in vitro*. Se utilizaron cuatro especies de forrajes del trópico alto colombiano (2540 *msnm*) dos gramíneas (*P. clandestinum* y *L. perenne*) y dos leguminosas (*L. uliginosus* y *T. pratense*), cosechadas de dos lotes diferentes. Los forrajes se cosecharon en tres diferentes estados de madurez (joven, intermedio y maduro) y se liofilizaron. La producción de gas y la proporción de metano en el gas se determinaron después de 48 h de incubación *in vitro*. Los datos se analizaron bajo el diseño de bloques completos (lotes) con arreglo factorial utilizando el procedimiento GLM de SAS. En promedio la leguminosa *L. uliginosus* produjo menos metano que *L. perenne*, *T. pratense* o *P. clandestinum* (35.5 vs 64.7, 55.7 o 51.4 ml g<sup>-1</sup> materia orgánica degradada (MOD) respectivamente). Los forrajes jóvenes produjeron menos metano que los de edades intermedia y madura (42.8 vs 56.3 y 56.4 ml g<sup>-1</sup> MOD respectivamente). La concentración de celulosa y la digestibilidad de la materia orgánica explicaron el 67% (p<0.01) de la producción de metano. La composición de la pastura, la presencia de taninos y los cambios en los patrones de fermentación podrían explicar la diferencia en la producción de metano entre las especies estudiadas.

**Palabras clave:** agricultura, digestibilidad, gases efecto invernadero, taninos.

## Abstract

The objective of this work was to evaluate the effect of forage species and forage maturity on methane emissions of four forage species incubated *in vitro*. Four forage species, two grasses (*P. clandestinum* and *L. perenne*) and two legumes (*L. uliginosus* and *T. pratense*), were harvested in two different paddocks in highlands of Colombia (2540 *mos*). Forages were harvested at three different maturity stages (young, intermediate and mature) and freeze dried. *In vitro* 48 h gas production was measured and methane in gas determined by GC. Data were analyzed for each experiment as randomized complete block (paddocks) design with a factorial arrangement using GLM procedure of SAS. On average *L. uliginosus* produced less methane than *L. perenne*, *T. pratense* or *P. clandestinum* (35.5 vs 64.7, 55.7 o 51.4 ml g<sup>-1</sup> organic matter respectively. Younger forages produced less methane than intermediate and mature forages (42.8 vs 56.3 y 56.4 ml g<sup>-1</sup> degraded organic matter respectively). Cellulose concentration and OMD explained 67% ( $p < 0.01$ ) of methane production. Pasture composition, tannins and changes in fermentation patterns may explain the differences between species.

**Key words:** agriculture digestibility, greenhouse gases, tannins

## 2.1 Introducción

La producción de metano (CH<sub>4</sub>) entérico representa una pérdida energética para el rumiante que varía entre 5 y el 7% de la energía bruta consumida (Johnson y Johnson, 1995). Adicionalmente, el metano es uno de los gases efecto invernadero (GEI) más importantes ya que tiene un poder de calentamiento 23 veces mayor al dióxido de carbono y una vida media en la atmósfera de 10 años (Solomon *et al.*, 2007). Su mitigación podría contribuir a disminuir las emisiones GEI provenientes del sector pecuario en un mediano plazo (Niggli *et al.*, 2009).

En el mundo, una proporción importante de los rumiantes utilizan pasturas como fuente principal de alimento y sus características pueden modificar las emisiones de metano (Johnson y Johnson, 1995, Lovett *et al.*, 2005). Los reportes sobre el efecto de la madurez del forraje sobre las emisiones de metano por unidad de materia seca degradada son contradictorios. Purcell *et al.* (2011) y Navarro *et al.* (2011) sugieren que una mayor madurez en *Lolium perenne* aumenta las emisiones de metano por unidad de materia seca degradada. Sin embargo, Purcell *et al.* (2012) reportan una disminución en

las emisiones de metano, para esta misma gramínea, cuando aumenta la madurez del forraje. En la literatura no encontramos reportes donde se haya evaluado el efecto de la madurez en las leguminosas sobre la emisión de metano *in vitro*. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de tres estados de madurez de dos gramíneas y dos leguminosas sobre la producción de metano *in vitro*.

## **2.2 Materiales y métodos**

### **2.2.1 Especies forrajeras**

En dos lotes diferentes, se cosecharon dos gramíneas, ryegrass (*Lolium perenne*) y kikuyo (*Pennisetum clandestinum*), y dos leguminosas, trébol (*Trifolium repens*) y lotus grande (*Lotus uliginosus*) en una región del trópico alto Colombiano (4°40'89"N, 74°13'13" W; 2540 *msnm*), en tres estados de madurez (joven, intermedio y maduro) según el contenido de fibra en detergente neutro (bajo, medio y alto, respectivamente). El ryegrass fue cosechado a los 15, 35 y 70 días, y el kikuyo, el trébol y el lotus fueron cosechados a los 25, 45 y 90 días de rebrote para los estados de madurez joven, intermedio y maduro, respectivamente. Estos fueron congelados a -20°C, liofilizados (CHRIST®) a una temperatura de -56°C y presión de 0,0035 psi y molidos en un molino de cuchillas (Romer®) con criba de 1 mm.

### **2.2.2 Incubación *in vitro***

Se empleó el procedimiento de incubación *in vitro* descrito por Pell y Scofield (1993). El fluido ruminal fue obtenido de un bovino fistulado en ayunas que pastaba kikuyo. El fluido fue filtrado a través de cuatro capas de gasa y gaseado con CO<sub>2</sub>. Se pesaron 0,1 g de forraje en botellas de 60 ml, provistas de tapones de caucho de butilo y agrafes, se adicionaron 8 ml de buffer (pH 6.5) (Goering y Van Soest, 1970) y 2 ml de fluido ruminal manteniendo un gaseado continuo con CO<sub>2</sub>. Los forrajes de cada lote y un blanco fueron incubados por triplicado durante 48 h manteniendo una temperatura de 39°C y agitación suave (HeidolphTitramax 1000). Finalizada la fermentación, se tomaron 2 ml del sobrenadante, se acidificaron con 200 µl de ácido sulfúrico concentrado y se congelaron a -20°C. El contenido restante del tubo se filtró a través de bolsas de filtro F57 Ankom®.

### 2.2.3 Producción de gas.

La producción de gas se cuantificó a las 0, 2, 4, 8, 12, 18, 24 y 48 horas empleando un transductor manual (Bailey & Mackey Ltda.) que mide la cantidad de gas de acuerdo a la presión acumulada en la botella (Theodorou *et al.* 1994). La producción total de gas fue determinada como la sumatoria de las producciones parciales en las horas de muestreo. Una muestra de gas de cada hora de medición fue conservada en vacutainers al vacío para posterior determinación de la concentración de metano.

### 2.2.4 Análisis químicos

En los forrajes y en los residuos de fermentación, se determinó la materia seca (AOAC, 2005), fibra en detergente neutro (Van Soest *et al.*, 1991) y cenizas (AOAC, 2005) para determinar la digestibilidad de la materia seca, de la materia orgánica y de la fibra en detergente ácido. Adicionalmente para los forrajes se determinó el nitrógeno por el método de Dumas (AOAC, 2005), extracto etéreo (AOAC, 2005), fibra en detergente ácido (Van Soest *et al.*, 1991), energía bruta por calorimetría (Parr® 6510) y taninos condensados por el método de butanol-HCL (Terrill *et al.*, 1992). Para la determinación de la concentración de metano en el gas reservado de cada hora de muestreo y los ácidos grasos volátiles (AGVs) del fluido acidificado, se utilizó un cromatógrafo de gases (Shimadzu GC-2014) equipado con un detector de ionización de llama (FID) utilizando nitrógeno como gas de arrastre según lo descrito por Parra y Ávila (2010) y Betancur (2001), respectivamente.

### 2.2.5 Análisis estadístico

Se utilizó un diseño de bloques completos con arreglo factorial 4\*3, en donde las especies (j= trébol, lotus, ryegrass y kikuyo) y los estados de madurez (k= joven, intermedio y maduro) fueron considerados efectos aleatorios y fijos, respectivamente. El promedio de las tres botellas fue considerado como repeticiones analíticas y los dos lotes (i=1,2) el factor de bloqueo (réplicas). Se utilizó el procedimiento ANOVA de SAS® versión 9.2 para realizar el análisis de varianza y las medias fueron comparadas por medio de la prueba de Tukey con una significancia del 5%. Las variables analizadas cumplieron los supuestos del modelo, presentaron coeficientes de determinación superiores al 60% y coeficientes de variación menores al 20% (Anexo A). En este estudio

el efecto de la edad y la especie fueron independientes para las variables producción de metano y AGV's totales, sin embargo las demás variables evaluadas presentaron una interacción significativa de estos efectos ( $p < 0.05$ ). La relación entre la producción total de gas o metano y la composición de los forrajes fue determinado por regresión múltiple utilizando el procedimiento REG de SAS® versión 9.2

## **2.3 Resultados**

### **2.3.1 Composición nutricional de los forrajes**

Al aumentar la madurez, la concentración de los carbohidratos estructurales y de la materia orgánica (MO) aumentó mientras la concentración de proteína cruda (PC), cenizas y extracto etéreo (EE) disminuyó para todos los forrajes (Tabla 2.1). La concentración de taninos condensados aumentó con la madurez en las leguminosas y para el lotus fue 4.7 veces mayor que para el trébol (Tabla 2.1)

### **2.3.2 pH, AGVs, digestibilidad, producción de gas y de metano.**

El pH en el medio de cultivo a las 48 h de incubación fue igual entre diferentes estados de madurez para las leguminosas mientras que para las gramíneas los forrajes jóvenes presentaron mayores pHs (Tabla 2.2).

La concentración total de AGVs en el medio de incubación después de 48 h fue mayor para el ryegrass respecto a las leguminosas, mientras que el kikuyo presentó una concentración intermedia ( $p < 0.05$ ). Las proporciones de AGVs en el medio de incubación después de 48 h fueron similares entre estados de madurez a pesar de que las digestibilidades de la MS, FDN, carbohidratos y MO fueron mayores para los forrajes jóvenes. La proporción de acetato, propionato y butirato en el medio de incubación a las 48 h y la relación acetato:propionato no fueron diferentes ( $p > 0.05$ ) entre estados de madurez para las leguminosas y el ryegrass. Para estas especies las proporciones de propionato en el medio de incubación fueron ligeramente superiores en los forrajes jóvenes comparados con los más maduros.

**Tabla 2.1:** Calidad nutricional dos gramíneas y dos leguminosas en diferentes estados de madurez\* (%MS).

Composición	Trébol			Lotus			Ryegrass			Kikuyo		
	J	I	M	J	I	M	J	I	M	J	I	M
PC, %	34.7	31.2	31.0	34.7	33.9	27.9	31.7	25.1	13.0	33.4	25.4	20.4
EE, %	5.9	5.5	5.0	3.0	2.1	1.4	6.0	4.1	3.7	5.8	5.1	4.5
FDN, %	29.3	30.8	39.6	29.0	31.6	34.6	43.3	46.4	59.5	39.4	48.3	57.9
FDA, %	14.6	15.9	22.6	17.1	20.6	23.3	22.4	25.5	33.2	16.0	22.5	26.7
Hemicelulosa, %	14.6	15.0	17.0	12.0	11.0	11.3	20.9	20.9	26.3	23.4	25.8	31.2
Celulosa, %	12.3	13.4	17.3	10.8	13.1	15.3	20.6	22.7	29.3	14.1	20.5	24.2
Lignina, %	2.3	2.5	5.3	6.3	7.3	8.0	1.8	2.8	4.0	1.9	2.0	2.5
Carbohidratos no estructurales <sup>1</sup> , %	20.5	23.6	14.1	18.5	19.0	22.7	8.5	16.0	17.1	10.4	11.2	7.4
Carbohidratos totales <sup>2</sup> , %	49.8	54.4	53.7	47.6	50.5	57.3	51.8	62.4	76.6	49.8	59.5	65.3
Cenizas, %	9.6	8.5	7.8	10.6	9.2	8.2	10.4	8.3	6.7	11.0	10.0	9.9
Taninos condensados, %	0.1	0.3	2.5	4.2	4.2	5.2	-	-	-	-	-	-
MO, %	90.4	91.5	92.2	89.4	90.8	91.8	89.6	91.7	93.3	89.0	90.0	90.1
Energía (Kcal g <sup>-1</sup> )	4.7	4.7	4.5	4.6	4.6	4.3	4.4	4.2	4.1	4.3	4.2	4.2

\*J: Joven. I: Intermedio. M: Maduro.

<sup>1</sup>. 100-(PC+FDN+Cenizas+EE+Taninos)

<sup>2</sup>. FDN+CNE-Lignina

**Tabla 2.2:** Efecto del estado de madurez<sup>1</sup> sobre la fermentación ruminal *in vitro* de dos gramíneas y dos leguminosas

Variable	Trébol			Lotus			Ryegrass			Kikuyo			ES	ED	ESxED
	J	I	M	J	I	M	J	I	M	J	I	M			
pH	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8	6.7 <sup>a</sup>	6.7 <sup>ab</sup>	6.6 <sup>b</sup>	6.8 <sup>a</sup>	6.7 <sup>b</sup>	6.7 <sup>ab</sup>	*	*	*
Ácidos grasos volátiles															
Total (mmol/L)	43.6	51.1	50.9	47.3	49.2	47.2	60.5	63.9	65.9	53.0	56.9	58.0	*	ns	ns
Acetato (mol %)	62.3	64.2	66.2	63.4	61.2	63.7	62.6	62.0	65.0	60.8 <sup>b</sup>	67.6 <sup>ab</sup>	70.5 <sup>a</sup>	**	**	*
Propionato (mol %)	22.6	20.5	19.7	22.6	22.4	21.0	22.7	21.9	19.2	23.8 <sup>a</sup>	20.4 <sup>ab</sup>	19.0 <sup>b</sup>	ns	**	*
Butirato (mol %)	7.7	7.8	8.2	8.0	9.1	9.1	8.2	9.2	9.6	6.7	6.9	8.2	*	ns	*
Relación acetato:propionato	2.8	3.1	3.4	2.8	2.7	3.0	2.8	2.8	3.4	2.6 <sup>b</sup>	3.3 <sup>ab</sup>	3.8 <sup>a</sup>	+	**	*
Digestibilidad (%)															
Materia seca	82.1 <sup>a</sup>	69.3 <sup>b</sup>	63.0 <sup>c</sup>	56.4 <sup>b</sup>	61.3 <sup>a</sup>	58.1 <sup>ab</sup>	72.5 <sup>a</sup>	71.8 <sup>a</sup>	63.5 <sup>b</sup>	71.1 <sup>a</sup>	68.1 <sup>ab</sup>	66.3 <sup>b</sup>	*	*	*
Fibra detergente neutro	86.4 <sup>a</sup>	72.0 <sup>b</sup>	45.2 <sup>c</sup>	57.6 <sup>a</sup>	59.5 <sup>a</sup>	38.8 <sup>b</sup>	84.6 <sup>a</sup>	75.9 <sup>a</sup>	59.5 <sup>b</sup>	85.0 <sup>a</sup>	74.4 <sup>b</sup>	56.2 <sup>c</sup>	*	*	*
Carbohidratos	87.5 <sup>a</sup>	79.5 <sup>b</sup>	49.8 <sup>c</sup>	60.7 <sup>a</sup>	60.3 <sup>a</sup>	49.4 <sup>b</sup>	83.6 <sup>a</sup>	77.6 <sup>b</sup>	63.3 <sup>c</sup>	84.4 <sup>a</sup>	75.9 <sup>b</sup>	57.2 <sup>c</sup>	*	*	*
Materia orgánica	86.5 <sup>a</sup>	72.7 <sup>b</sup>	65.8 <sup>c</sup>	58.3 <sup>b</sup>	63.5 <sup>a</sup>	60.5 <sup>ab</sup>	75.9 <sup>a</sup>	76.1 <sup>a</sup>	66.7 <sup>b</sup>	73.4 <sup>a</sup>	71.2 <sup>ab</sup>	69.2 <sup>b</sup>	*	*	*

<sup>abc</sup>. Letras diferentes, diferencias entre edades dentro de la misma especie. \* p<0,01. \*\* p<0,05. + p<0.1. ns: no significativo.

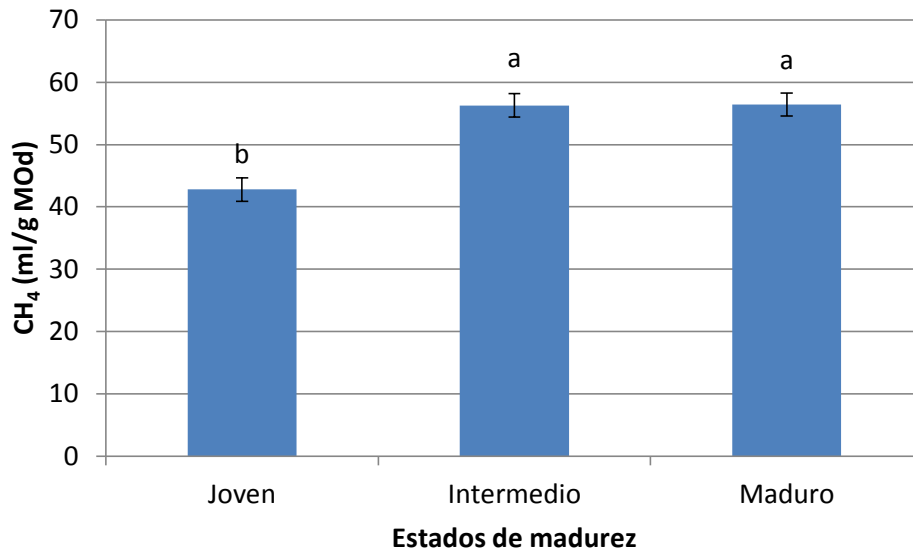
<sup>1</sup>. J: Joven. I: Intermedio. M: Maduro.

<sup>2</sup>. ES: Efecto de la especie. ED: Efecto de la edad. ESxED: Interacción edad y especie

El kikuyo presentó un aumento ( $p < 0.05$ ) en la proporción de acetato y una disminución en la de propionato en el medio de incubación cuando aumentó la madurez (Tabla 2.2).

La digestibilidad de la materia seca (DMS), de la fibra en detergente neutro (DFDN), y los carbohidratos totales (DCH) y de la materia orgánica (DMO) disminuyeron al aumentar el estado de madurez de todas las especies, excepto para el lotus que presentó mayor digestibilidad en la edad intermedia que en la joven o en la madura (Tabla 2.2).

Los forrajes jóvenes con excepción del lotus presentaron una menor producción de gas por unidad de materia orgánica degradada que los forrajes más maduros ( $p < 0.05$ ) (Tabla 2.3). Los forrajes jóvenes incubados *in vitro* durante 48 h produjeron menos metano por unidad de materia orgánica degradada que los forrajes más maduros (Figura 2.1). El lotus produjo menos metano por unidad de materia orgánica degradada respecto al ryegrass y al trébol ( $p < 0.05$ ), mientras el kikuyo presentó una producción intermedia (Figura 2.2).



**Figura 2-1:** Efecto del estado de madurez sobre la producción *in vitro* de metano ( $\text{ml g}^{-1}$  MO degradada).



**Tabla 2.3:** Efecto del estado de madurez<sup>1</sup> sobre la producción de gas y de metano *in vitro* de dos gramíneas y dos leguminosas.

Variable	Trébol			Lotus			Ryegrass			Kikuyo			ES	ED	ESxED
	J	I	M	J	I	M	J	I	M	J	I	M			
Producción de gas															
ml	31.6 <sup>ab</sup>	32.3 <sup>a</sup>	28.2 <sup>b</sup>	24.7	27.4	26.2	31.1	34.5	34.3	27.4 <sup>b</sup>	31.8 <sup>a</sup>	29.5 <sup>ab</sup>	*	*	*
ml g <sup>-1</sup> MSd	434.9 <sup>b</sup>	524.8 <sup>a</sup>	504.5 <sup>ab</sup>	489.3	507.9	512.9	418.1 <sup>b</sup>	533.9 <sup>ab</sup>	601.7 <sup>a</sup>	424.5 <sup>b</sup>	521.4 <sup>a</sup>	495.9 <sup>ab</sup>	*	*	*
ml g <sup>-1</sup> MOd	437.2 <sup>b</sup>	525.4 <sup>a</sup>	504.8 <sup>ab</sup>	502.4	515.3	515.9	488.3 <sup>b</sup>	527.6 <sup>ab</sup>	595.0 <sup>a</sup>	438.0 <sup>b</sup>	528.6 <sup>a</sup>	501.8 <sup>ab</sup>	*	*	*
Producción de metano															
ml	3.7	3.8	3.0	1.3	2.3	1.9	3.8	3.9	4.2	2.2	3.7	3.4	*	*	*
ml g <sup>-1</sup> MSD	50.9	61.1	54.3	25.5	42.0	38.2	58.5	60.9	74.8	33.8	60.1	57.9	*	*	ns
ml g <sup>-1</sup> MOD	51.2	61.5	54.4	25.2	42.9	38.4	59.7	60.5	73.9	35.1	60.2	59.0	*	*	ns
Relación producción metano:gas (%)															
	11.3	11.4	10.7	5.2	8.3	7.3	12.0	11.3	12.4	8.1	11.7	11.6	*	**	**

<sup>abc</sup>. Letras diferentes, diferencias entre edades dentro de la misma especie. \* p<0,01. \*\* p<0,05. + p<0.1. ns: no significativo.

<sup>1</sup>. J: Joven. I: Intermedio. M: Maduro.

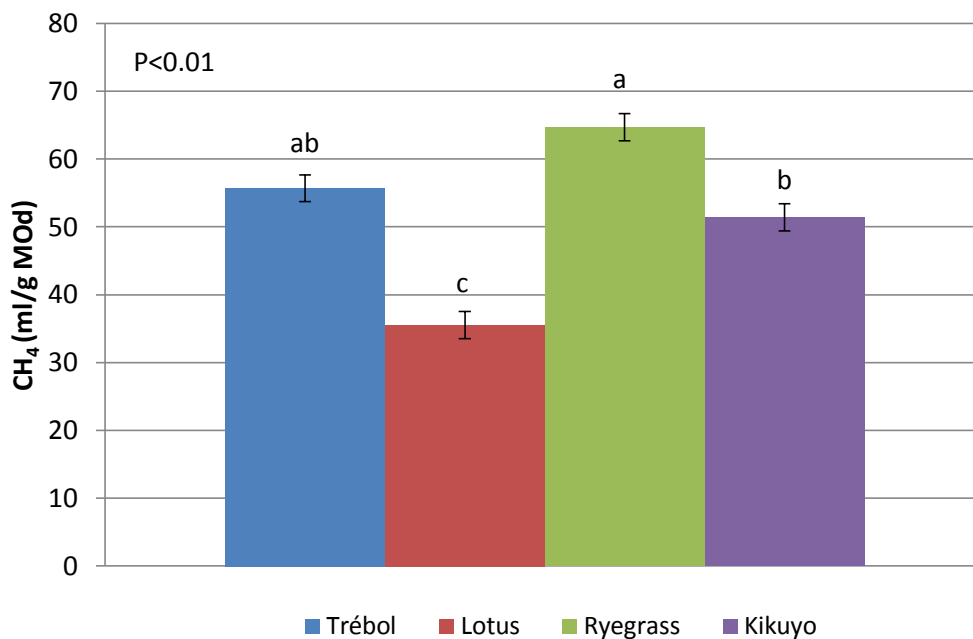
<sup>2</sup>. ES: Efecto de la especie. ED: Efecto de la edad. ESxED: Interacción edad y especie

El análisis de regresión mostró una relación lineal positiva entre la producción de metano (PCH4) y la concentración de CEL y la DMO ( $R^2= 67\%$ ,  $p<0.01$ ) (Ecuación 1).

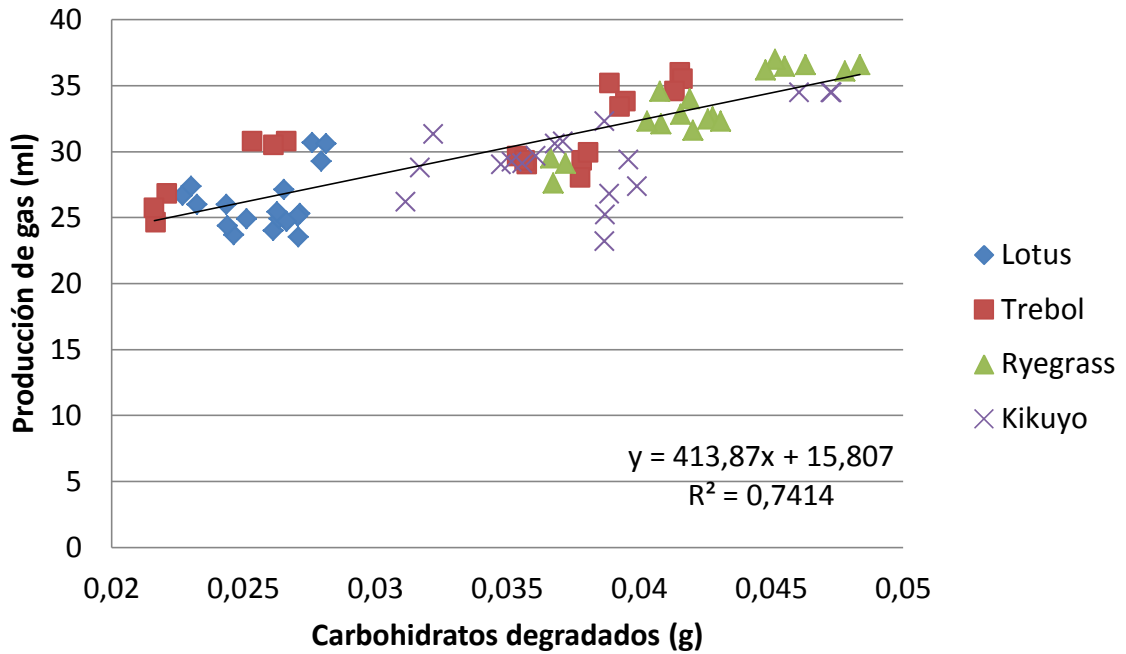
$$\text{PCH4 (ml)} = - 3.58 + 0.11 \times \text{CEL}(\%) + 0.07 \times \text{DMO}(\%) \text{ (Ecuación 1)}$$

La concentración de CEL, cenizas (CEN) y la DCH se relacionaron linealmente con la producción de gas total (PGT) ( $R^2= 69\%$ ,  $p<0.01$ ) (Ecuación 2).

$$\text{PGT (ml)} = 17.44 + 0.37 \times \text{CEL}(\%) + 0.22934 \times \text{DCH}(\%) - 1.27 \times \text{CEN}(\%) \text{ (Ecuación 2)}$$



**Figura 2-2:** Producción *in vitro* de metano ( $\text{ml g}^{-1}$  MO degradada) de diferentes especies forrajeras presentes en trópico alto colombiano



**Figura 2-3:** Relación de la producción de gas y carbohidratos degradados *in vitro* en diferentes especies forrajes presentes en trópico alto colombiano

## 2.4 Discusión

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del estado de madurez y la especie sobre la producción de metano *in vitro*.

- *Metano y estado de madurez*

En este trabajo encontramos que los forrajes jóvenes incubados *in vitro* producían menos metano por unidad de materia orgánica degradada que los forrajes más maduros, similar a lo reportado por otros autores (Puercell *et al.*, 2011 y Navarro-Villa *et al.*, 2011). Las causas de una menor producción de metano en incubaciones *in vitro* por forrajes jóvenes no han sido claramente establecidas. Moss *et al.* (2000) sugieren que forrajes jóvenes presentan una mayor concentración de CNE, lo que promueve la producción de propionato en su fermentación, el cual está relacionado inversamente con la producción de CH<sub>4</sub> (Martin *et al.*, 2009). En nuestro trabajo, las proporciones de propionato en el medio de incubación solo fueron ligeramente superiores en los forrajes jóvenes comparados con los más maduros. Esto sugeriría que en la fermentación de los carbohidratos en forrajes jóvenes se favorece la vía metabólica que conduce a

propionato pero no de manera importante como se demuestra por la ausencia de diferencias significativas en las proporciones molares entre AGVs para diferentes estados de madurez en algunas de las especies estudiadas con excepción del kikuyo. Por último, los cambios en los CNE asociados a la madurez no fueron iguales entre las especies estudiadas. Mientras en el kikuyo y el trébol, los CNE disminuyeron con la madurez no fue así para el ryegrass y el lotus en los cuales la concentración total de CNE aumentó con la edad.

Otros autores han reportado que la madurez del forraje conlleva un incremento en la concentración de carbohidratos estructurales en el forraje (Cassida *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2010; Navarro-Villa *et al.*, 2011). La literatura sugiere que las concentraciones de fibra están asociadas positivamente con la producción de metano (Hindrishen *et al.*, 2005; Moe y Terry, 1979). En el presente experimento, se encontró una correlación positiva entre la concentración de celulosa y la producción de CH<sub>4</sub> (Ecuación 1) sugiriendo que la producción de metano podría ser mayor en forrajes maduros al presentar una mayor concentración de celulosa en su composición (Tabla 2.1). Tiemman *et al.* (2008) reporta un mayor producción de metano asociada a la degradación de hemicelulosa.

En nuestro estudio, las principales diferencias en los forrajes jóvenes con los maduros fue una mayor proporción de proteína y una menor concentración de carbohidratos totales en los forrajes jóvenes (Tabla 2.1). Pelchen y Peters (1998) reportan una relación inversa entre la concentración de PC y la producción de metano. En la fermentación ruminal, las proteínas son utilizadas para la síntesis de proteínas microbiales o degradadas a amonio y AGVs (López, 2005). El primer proceso no produce metano mientras en el segundo la cantidad de metano dependerá del tipo y la proporción de AGV que se produzcan (Leng, 2011). Por lo tanto, la producción de AGV y de metano en el rumen o en un sistema *in vitro* estarían más estrechamente asociados a la fermentación de carbohidratos. En cualquier caso, la contribución de la proteína fermentada a la producción de metano debería ser menor. Este hecho ha sido reconocido en los sistemas de alimentación como el CNCPS, donde se asume que la energía proveniente de AGVs es generada principalmente de los carbohidratos fermentados (Sniffen *et al.*, 1992). En nuestro estudio, las concentraciones de AGVs en el medio de incubación después de 48h fueron similares entre estados de madurez a pesar de que las digestibilidades de la MS y MO fueron mayores para los forrajes jóvenes donde se esperaría una mayor

concentración de AGVs al aumentar la digestibilidad (Purcell *et al.*, 2011). Sin embargo, su concentración estuvo más estrechamente asociada a los carbohidratos fermentados que a la digestibilidad de la MO ( $r = 85$  vs  $45$ , respectivamente). Por último, una menor producción de metano en forrajes jóvenes con mayores concentraciones de proteína que forrajes maduros podría estar asociada a una mayor concentración de nitratos y nitritos en estos forrajes. Se ha demostrado que en estadios tempranos de madurez la concentración de proteínas y de nitratos es mayor (Treviño y Hernández, 1978) y que los nitratos compiten con la producción de metano al actuar como receptores de hidrógenos a nivel ruminal (Leng, 2008).

La técnica de gases ha sido utilizada para estimar las digestibilidades donde mayores producciones de gas han sido asociadas a una mayor digestibilidad (Tavendale *et al.*, 2005, Lovett *et al.*, 2004). En el presente trabajo, la producción total de gas no estuvo asociada a los cambios en la digestibilidad de la MO ya que la producción de gas por unidad de materia orgánica degradada fue diferente entre estados de madurez (Tabla 2.3). Los forrajes jóvenes con excepción del lotus presentaron una menor producción de gas por unidad de materia orgánica de gradada que los forrajes maduros. La producción de gas estuvo más estrechamente relacionada con los carbohidratos fermentados (Figura 2.3.) lo cual explicaría en gran medida las diferencias en producción de metano, ya que las proporciones de metano por unidad de gas producido fueron similares entre edades y especies con excepción del lotus y el kikuyo joven donde la proporción de metano por unidad de gas producido fue menor. En el lotus la menor proporción de metano por unidad de gas producido puede deberse a la presencia de taninos condensados en su composición. Tavendale *et al.*, (2005) sugirieron que la presencia de taninos condensados del lotus afectó las poblaciones metanogénicas, explicando la menor producción de metano respecto a la alfalfa. Algunos autores sugieren que los taninos condensados pueden presentar efectos bacteriostáticos sobre poblaciones de microorganismos ruminales, explicado la menor degradación del materia incubado y posiblemente la menor producción de metano al afectar poblaciones metanogénicas. En el kikuyo joven la menor proporción de metano en relación al gas producido puede deberse posiblemente a una mayor acumulación de nitratos (Leng, 2008).

- *Metano y especies*

En nuestro trabajo se presentaron diferencias en la producción de metano asociadas a la especie. El lotus fue la especie que produjo menos metano por unidad de materia orgánica degradada y el ryegrass la que produjo más (Fig 2-1). Las diferencias entre especie en la producción de metano en sistemas *in vitro* ha sido reportada por otros autores (Meale *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2012). La comparación entre especies se hace difícil debido a las variaciones en los estados de madurez de la planta. En nuestro trabajo, encontramos que independientemente de la madurez, las especies tenían diferencias en las emisiones de metano. La menor producción de metano por el lotus ha sido asociada a la presencia de taninos en esta especie tanto en estudios *in vitro* (Tavendale *et al.*, 2005) como *in vivo* (Woodward *et al.*, 2004). Algunos atribuyen la menor producción de metano en esta especie al efecto negativo que tienen los taninos sobre la degradación de la materia orgánica (Hess *et al.*, 2008), la proteína (Waghorn, 2008) o la fibra (Tiemman *et al.*, 2008). Las menores degradaciones de estos componentes explicarían las menores producciones de gas y metano total pero no podrían sustentar la menor producción de gas por unidad de MO degradada encontradas en nuestro estudio.

Es interesante observar que para el lotus incubado, independientemente de su madurez, las relaciones entre producción de metano con el gas total fueron inferiores a las de las demás especies incubadas con excepción del kikuyo joven. Estos resultados muestran que el lotus produce menos metano por unidad de gas producido. Otros trabajos donde se disminuye la cantidad de metano en el gas muestran que en muchos casos aumentan las concentraciones de H<sub>2</sub> en el gas (Tavendale *et al.*, 2005) sugiriendo que parte de la menor producción de metano se debe a una inhibición de su formación y no al uso de H<sub>2</sub> para la formación de otros compuestos donde se utiliza hidrógeno. Tavendale *et al.* (2005) sugiere que la presencia de taninos condensados en el lotus podría tener un efecto inhibitorio sobre poblaciones algunas metanogénicas. Esto explicaría porque se produce menos metano a pesar de la ausencia de diferencias en las proporciones molares de propionato entre especies.

En nuestro estudio la producción de metano por unidad de materia orgánica degradada fue mayor para el ryegrass comparativamente con las demás especies (trébol, kikuyo). En un meta-análisis realizado por Archimède *et al.* (2011) no se evidenciaron diferencias

en la producción de metano *in vivo* entre leguminosas y gramíneas de zonas templadas. Por otro lado, Navarro-Villa *et al.* (2011) reportan una menor emisión de metano por unidad de materia orgánica degradada en ryegrass respecto a trébol debido a una mayor concentración de carbohidratos solubles, lo que aumentó la relación propionato:acetato y disminuyó la producción de metano. Pocos trabajos han comparado la producción de metano de kikuyo respecto a otras especies forrajeras. En estudios *in vivo* Ulyatt *et al.* (2004) reportaron una mayor producción de metano en kikuyo respecto a pastos de zonas templadas. Sin embargo en ese estudio no se comparó la producción de metano en función al estado de madurez de la planta. En este mismo sentido como resultado de un meta-análisis Archimède *et al.* (2011) reportó una producción de metano 17% mayor en forrajes C4 respecto a los C3 lo cual sugeriría que el kikuyo que es especie una especie C4 produciría más metano que el ryegrass que es una especie C3 diferente a lo encontrado en este estudio. Sin embargo hay que ser cuidadoso al comparar los resultados de experimentos *in vitro* respecto a los *in vivo*. Los ensayos *in vitro* no tienen en cuenta características como la tasa de pasaje, el nivel de consumo y la selectividad que afectan la producción de metano (López, 2005). La mayor producción de metano en el ryegrass respecto al kikuyo puede deberse a una mayor proporción de tejidos de mayor degradación, resultando en una mayor fermentación del material incubado y posiblemente en una mayor producción de hidrógeno que permitirían una mayor reducción de dióxido de carbono a metano.

Nuestro trabajo sugiere que la proporción de metano relacionado con la producción de gas fue similar entre especies y estados de madurez, excepto para el lotus y el kikuyo joven. Estos resultados sugieren que la producción de gas no estaría asociada al tipo de metabolismo de la especie (C3 vs C4) o a su diferencia entre gramínea y leguminosa sino que estaría más estrechamente asociada a la concentración de carbohidratos degradables (Figura 2.3). De acuerdo a las vías metabólicas establecidas para la degradación de los carbohidratos se puede afirmar que estos comparten intermediarios comunes como el piruvato independientemente del tipo (azúcares, celulosa, almidones, pectinas, hemicelulosa) (Van Soest, 1994) y que las diferencias en las proporciones de AGV están asociados a la especie de microorganismos que utilizan el piruvato (Stewart *et al.*, 1997). Murpy *et al.*, (1982) mostró que un mismo carbohidrato puede producir diferentes proporciones de AGVs dependiendo del pH y la dieta. En condiciones como

las de este estudio donde el pH es más o menos constante y los sustratos son forrajes se esperaría que el tipo de microorganismos presentes fuera similar entre tratamientos. Por lo tanto, la producción de gas estaría estrechamente relacionada con la degradación de carbohidratos totales y no con las diferencias en las proporciones de estos. El ryegrass independientemente de la madurez tuvo una mayor concentración de carbohidratos totales y menores de proteína lo cual explicaría una mayor producción total de gas para esta especie.

## 2.5 Conclusiones

En nuestro trabajo, la producción de metano en forrajes jóvenes fue menor respecto a la edad intermedia y madura, 42.8 vs 56.3 y 56.4 ml g<sup>-1</sup>materia orgánica degradada, respectivamente. Esta fue mayor para el ryegrass y el trébol ,64.7 y 55.7 ml g<sup>-1</sup>materia orgánica degradada respectivamente. La menor producción de metano fue para el lotus (35.5 ml g<sup>-1</sup>materia orgánica degradada) mientras que para el kikuyo fue intermedia, 51.4 ml g<sup>-1</sup>materia orgánica degradada. La producción de metano entre especies y estados de madurez estuvo principalmente explicada por las variaciones en la producción de gas total ya que la proporción de metano en el gas entre especies y estados de madurez fue similar, excepto en el lotus y el kikuyo joven donde estas fueron menores. La presencia de taninos condensados en el lotus y posiblemente la acumulación de nitratos en el kikuyo joven podrían explicar las diferencias en estas especies. La producción de gas total se relacionó positivamente con la proporción de celulosa en los forrajes y con la degradación de los carbohidratos.

## 2.6 Agradecimientos

Los autores agradecen al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR) por la financiación de este trabajo.

## 2.7 Bibliografía

A.O.A.C. (Association of Official Agricultural Chemists). 2005. Official methods of analysis. Washington D.C, USA



Archimède H., Eugène M., Marie C., Boval M., Martin C., Morgavi DP., Lecomte P. y Doreau M. 2011. Comparison of methane production between C3 y C4 grass and legume. *Animal Feed Science and Technology*, 166-167: 54-64.

Bentacourt M. 2001. Efecto de la melaza, ácido fórmico y tiempo de fermentación sobre la ensilabilidad de la *Leucaena Leucocephala*. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

Cassida KA., Griffin TS., Rodriguez SC., Patching OB. y Rust SR. 2000. Protein degradability and forage quality in maturing alfalfa, red clover, and birdsfoot trefoil. *Crop Science*, 40: 209-215.

Goering HK., y Van Soest PJ. 1970. Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). *Agricultural Handbook*. No 379. ARS-USDE. Washington, DC.

Hess HD., Mera ML., Tiemann TT., Lascano CE. y Kreuzer, M. 2008. *In vitro* assessment of the suitability of replacing the low-tannin legume *Vigna unguiculata* with the tanniferous legumes *Leucaena leucocephala*, *Flemingia macrophylla* or *Calliandra calothyrsus* in a tropical grass diet. *Animal Feed Science and Technology*, 147:105-115.

Hindrichsen IK., Wettstein HR., Machmüller A., Jörg B. J. y Kreuzer M. 2004. Effects of the carbohydrate composition of feed concentrates on methane emission from dairy cows and their slurry. *Environmental Monitoring Assessment*, 107: 329-350.

Johnson, KA. y Johnson, DE. 1995. Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*, 73: 2483-2492.

Leng RA. 2011. The rumen- a fermentation vat or a series of organized structured microbial consortia: implications for the mitigation of enteric methane production by feed additives. *Livestock Research for Rural Development* 23, Article #258.

Leng, RA. 2008. The potential of feeding nitrate to reduce enteric methane production in ruminants. A Report. The Department of Climate Change. Commonwealth Government of Australia. Canberra, Australia.

López S. 2005. *In vitro* and *in situ* techniques for estimating digestibility. En: Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism. Ed: Dijkstra J., Forbes JM. y France J. CABI Publishing. Second Edition. Wallingford, UK.

Lovett, DK., McGilloway, D., Bortolozzo, A., Hawkins, M., Callan, J., Flynn, B. y O'Mara, FP. 2005. *In vitro* fermentation patterns and methane production as influenced by cultivar and season of harvest of *Lolium perenne* L. Grass and Forage Science, 61: 9-21.

Lovett, DK., Bortolozzo, A., Conaghan, P., O'Kiely, P. and O'Mara, FP. 2004. *In vitro* total and methane gas production as influenced by rate of nitrogen application, season of harvest and perennial ryegrass cultivar. Grass and Forage Science, 59: 227-232.

Martin C., Morgavi DP. y Doreau M. 2009. Methane mitigation in ruminants: from microbe to farm scale. The Animal Consortium 2009. Animal, 4(3): 1-15.

Meale SJ., Chaves AV., Baah J., y McAllister TA. 2012. Methane production of different forages in *in vitro* ruminal fermentation. Asia-Australia Journal of Animal Science 25(1): 86-91.

Moe PW. y Tyrrell HF. 1979. Methane production in dairy cows. Journal of Dairy Science, 62:1583-1586.

Moss A., Jouany JP., y Newbold J. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. Annales Zootechnie, 29: 231-253.

Murphy MR., Baldwin RL., y Koong LJ. 1982. Estimation of stoichiometric parameters for rumen fermentation of roughage and concentrate diets. Journal of Animal Science, 55: 411-421.

Navarro-Villa A., O'Brien M., López S., Boland TM. y O'Kiely, 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.

Niggli U., Fliebbach A., Hepperly P., y Scialabba N. 2009. Low Greenhouse gas Agriculture: Mitigation and adaptation potential of sustainable farming systems. FAO, April 2009, Rev 2-2009.

Parra DM., y Avila MJ. 2010. Determinación de los parámetros fisiológicos y dinámica ruminal de bovinos en condiciones de poli-túnel para evaluar emisiones de metano en trópico alto y bajo colombiano. Tesis para optar por el grado de Zootecnista. Programa de Zootecnia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Cundinamarca. Fusagasugá, Cundinamarca.

Pelchen A., y Peters KJ. 1998. Methane emissions from sheep. *Small Ruminant Research*, 27: 137-150.

Pell AN., y Scofield P. 1993. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. *Journal of Dairy Science*, 76: 1063-1073.

Purcell PJ., O'Brien M., Navarro-Villa A., Boland TM., McEvoy M., Grogan D., y O'Kiely P. 2012. *In vitro* rumen methane output of perennial ryegrass varieties and perennial grass species harvested throughout the growing season. *Grass and Forage Science*, 67: 280-298.

Purcell PJ., O'Brien M., Boland TM., O'Donovan M., y O'Kiely, P. 2011. Impacts of herbage mass and sward allowance of perennial ryegrass sampled throughout the growing season on *in vitro* rumen methane production. *Animal Feed Science and Technology*, 166-167:405-411.

SAS (Statistical Analysis System). 2003. Online Doc 9.1.3. Cary, USA: SAS Institute Inc.

Singh S., Kushwaha BP., Nag SK., Mishra AK., Singh A., y Anele UY. *In vitro* ruminal fermentation, protein and carbohydrate fractionation, methane production and prediction of twelve commonly used Indian green forages. *Animal Feed Science and Technology* 178(1): 2-11.

Sniffen CJ., O'Connor JD., Van Soest PJ., Fox DG., y Russell JB. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *Journal of Animal Science*. 70: 3562-3577.

Solomon SD., Qin M., Manning RB., Alley T., Berntsen NL., Bindoff Z., Chen A., Chidthaisong JM., Gregory GC., Hegerl M., Heimann B., Hewitson BJ; Hoskins F., Joos J., Jouzel V., Kattsov U., Lohmann T., Matsuno M., Molina N., Nicholls J., Overpeck J., Raga G., Ramaswamy J., Ren M., Rusticucci R., Somerville TF., Stocker P., Whetton RA., y Wratt D. 2007. Technical Summary. In: *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Editado por Solomon S., Qin D., Manning M., Chen Z., Marquis KB., Averyt M and Miller. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.

Stewart CS., Flint HJ., y Bryant MP. 1997. The rumen bacteria. Ed: Hobson PN., y Stewart CS. pp 10-72. Blackie Academic & Professional, London, UK.

Sun XZ., Waghorn GC., y Clark H. 2010. Cultivar and age of regrowth effects on physical, chemical and *in sacco* degradation kinetics of vegetative perennial ryegrass (*Lolium perenne* L). *Animal Feed Science and Technology*, 155: 172-185.

Tavendale MH., Meagher L., Pacheco D., Walker N., Attwood GT. y Sivakumaran S. 2005. Methane production from *in vitro* rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. *Animal Feed Science and Technology*, 123-124: 403-419.

Terrill TH., Rowan AM., Douglas GB., y Barry TN. 1992. Determination of extractable and bound condensed tannin concentration in forage plants, protein concentrated meals and cereal grains. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 58:321-329.

Theodorou MK., Williams BA., Dhanoa MS., McAllan AB. y France. 1994. A simple gas method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of the ruminant feeds. *J. Animal Feed Science and Technology*, 48: 185-197.

Tiemann TT., Avila P., Ramírez G., Lascano CE., Kreuzer M., y Hess HD. 2008. *In vitro* ruminal fermentation of tanniferous tropical plants: Plant-specific tannin effects and counteracting efficiency of PEG. *Animal Feed Science and Technology*, 146: 222-241

Treviño J., y Hernández M. 1978. Efecto del estado de madurez de la planta sobre la composición de la fracción nitrogenada de la alfalfa de aragón (*Medicago sativa L.*). *Pastos* 8 (1): 133-139.

Ulyatt MJ., Lassey KR., Shelton ID., y Walker CF. 2004. Methane emissions from dairy cows and wether sheep fed subtropical grass-dominant pastures in midsummer in New Zealand. *New Zealand Journal of Agriculture Research*, 45: 227-234.

Van Soest P. 1994. *Nutritional ecology of the ruminant*. 2 edition. Cornell University Press. USA, p 271.

Van Soest P., Robertson., y Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral fiber and no starch polysaccharides in relation to nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74: 3583-3597.

Waghorn G. 2008. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production-Progress and challenges. *Animal Feed Science and Technology*, 147:116-139.

Woodward SL., Waghorn GC., y Laboyrie PG. 2004. Condensed tannins in birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) reduce methane emissions from dairy cows. *Proceeding of New Zealand Society of Animal Production*, 64: 160-164.



### 3. Producción de metano *in vitro* en mezclas de gramíneas y leguminosas del trópico alto colombiano

#### Resumen

Se determinó la producción de metano *in vitro* en mezclas de gramínea:leguminosa presentes en el trópico alto colombiano. Utilizando la técnica de producción de gas, se evaluaron cuatro mezclas, kikuyo y lotus, kikuyo y trébol blanco, ryegrass y lotus y ryegrass y trébol en tres diferentes proporciones gramínea:leguminosa (90:10, 70:30 y 50:50). Cuando se aumentaron las proporciones de trébol, la producción de metano por unidad de materia orgánica degradada disminuyó en un 13% para el caso del kikuyo, pero no para el caso del ryegrass. La producción de metano por unidad de materia orgánica degradada disminuyó en 16% cuando se incrementó la proporción de lotus en la mezcla con el kikuyo. En el caso del *L. uliginosus*, una leguminosa tanífera, al aumentar su proporción en la mezcla disminuyó la producción de total de metano sin importar la gramínea. La presencia de una leguminosa tanífera disminuyó la relación metano y gas, sugiriendo un efecto sobre poblaciones metanogénicas

**Palabras clave:** agricultura, digestibilidad, gases efecto invernadero, taninos

#### Abstract

*In vitro* methane production was determined in mixtures of grasses and legumes of Colombian highlands. Four mixtures, kikuyu and lotus, kikuyu and white clover, ryegrass and lotus and ryegrass and clover in three different ratios, grass: legume (90:10, 70:30 and 50:50) were evaluated using the gas production technique. Methane production per unit of degraded organic matter decreased 16% when the proportions of Lotus increased. When

clover proportions were increased, methane production per unit of degraded organic matter decreased in the mixture with kikuyu (13%) but for ryegrass no differences were found between proportions. When the proportion of *L. uliginosus*, a tanniferous legume was increased total methane production decreased independently of the grass. The presence of a tanniferous legume decreased methane to gas production ratio suggesting an effect in the methanogenic population.

**Key words:** agriculture, digestibility, greenhouse gases, tannins

### 3.1 Introducción

La incorporación de leguminosas en la dieta de rumiantes ha presentado aumentos en la productividad animal (Castro *et al.*, 2008) y mejoramiento en el balance de N en sistemas pastoriles (Castro, 2006). Sin embargo, pocos trabajos han evaluado el efecto de diferentes mezclas de gramíneas y de leguminosas sobre la producción de metano *in vitro*. Hess *et al.* (2003) utilizando el sistema Rusitec y evaluando especies de trópico cálido, encontraron que las emisiones de metano ( $\text{mmol g}^{-1}$  materia orgánica degradada) aumentan al incluir leguminosas con bajas concentraciones de taninos condensados, aunque disminuye cuando la leguminosa contiene alta concentración de taninos (Hess *et al.*, 2003). El objetivo de este trabajo es determinar el efecto de cuatro mezclas de leguminosas y gramíneas en tres proporciones sobre las emisiones de metano *in vitro*.

### 3.2 Materiales y métodos

#### 3.2.1 Especies forrajeras

En dos lotes diferentes, se cosecharon dos gramíneas, ryegrass (*Lolium perenne*) y kikuyo (*Pennisetum clandestinum*), y dos leguminosas, trébol blanco (*Trifolium repens*) y lotus grande (*Lotus uliginosus*) en la estación Corpoica Tibaitatá ( $4^{\circ}40'89''\text{N}$ ,  $74^{\circ}13'13''\text{W}$ ; 2540 *msnm*). El ryegrass fue cosechado a los 35 días, y el kikuyo, el trébol y el lotus fueron cosechados a los 45 días de rebrote. Los forrajes fueron congelados a  $-20^{\circ}\text{C}$ , liofilizadas (CHRIST®) a una temperatura de  $-56^{\circ}\text{C}$  y presión de 0,0035 psi. y molidos en un molino de cuchillas (Romer®) con criba de 1 mm.



### **3.2.2 Incubación *in vitro***

Las mezclas utilizadas fueron ryegrass y lotus, ryegrass y trébol blanco, kikuyo y lotus, kikuyo y trébol blanco, en tres proporciones gramínea:leguminosa (90:10, 70:30 y 50:50). Para este trabajo se utilizó el mismo procedimiento *in vitro* y se realizaron los mismos análisis descritos en el capítulo 2.

### **3.2.3 Análisis estadístico**

Se utilizó un diseño de bloques completos con arreglo factorial 2\*2\*3, dos gramíneas (ryegrass y kikuyo), dos leguminosas (trébol blanco y lotus) y tres proporciones (90:10, 70:30 y 50:50) que fueron considerados efectos aleatorios. La respuesta promedio de las tres botellas fue considerada como repeticiones analíticas y los dos lotes ( $i=1,2$ ) como el factor de bloqueo (réplicas). Se utilizó el procedimiento ANOVA de SAS® versión 9.2 para realizar el análisis de varianza y las medias fueron comparadas por medio de la prueba de Tukey con una significancia del 5%. Las variables analizadas cumplieron los supuestos del modelo, presentaron coeficientes de determinación superiores al 80% y coeficientes de variación menores al 20% (Anexo B). La relación entre la producción total de gas o metano y la composición de los forrajes fue determinado por regresión múltiple utilizando el procedimiento REG de SAS® versión 9.2.

## **3.3 Resultados**

### **3.3.1 Composición bromatológica de los forrajes**

Las leguminosas presentaron un mayor contenido de energía, proteína cruda (PC), carbohidratos no estructurales (CNE), taninos condensados (TC) y lignina (LIG) comparativamente con las gramíneas. Las gramíneas presentaron una mayor concentración de carbohidratos asociados a la pared (Tabla 3.1).

### **3.3.2 Digestibilidad, pH, producción de gas, concentración de metano y AGV's**

El pH en el medio de incubación a las 48 h no presentó diferencias asociadas a la inclusión de leguminosas a las gramíneas. La producción de AGV's disminuyó ( $p<0.05$ ) al

incluir leguminosas en la mezcla y esto dependió de su nivel de inclusión (Tabla 3.2). Para el ryegrass, la disminución debido al aumento de lotus en la mezcla no fue clara.

**Tabla 3.1:** Composición nutricional de dos gramíneas y dos leguminosas

Composición	Trébol	Lotus	Ryegrass	Kikuyo
PC, %	31.2	33.9	25.2	25.4
EE, %	5.5	2.2	4.1	5.1
FDN, %	30.8	31.6	46.5	48.3
FDA, %	15.9	20.6	25.5	22.5
Hemicelulosa, %	15.0	11.0	21.0	25.8
Celulosa, %	13.4	13.2	22.7	20.5
Lignina, %	2.5	7.3	2.8	2.0
Carbohidratos no estructurales <sup>1</sup> , %	23.6	19.0	16.0	11.2
Carbohidratos totales <sup>2</sup> , %	51.9	43.3	59.6	57.5
Cenizas, %	8.5	9.2	8.3	10.1
Taninos condensados, %	0.3	4.2	0.0	0.0
MO, %	91.5	90.8	91.7	90.0
Energía (Kcal g <sup>-1</sup> )	4.7	4.6	4.2	4.2

<sup>1</sup>. 100-(PC + FDN + cenizas + EE + Taninos)

<sup>2</sup>. FDN+CNE-Lignina

Las proporciones molares de acetato fueron menores para el kikuyo que para el ryegrass mientras que las de propionato fueron mayores. La respuesta en la proporción de acetato cuando se aumentó la proporción de leguminosa en la mezcla dependió de su especie. El aumento en la proporción de lotus disminuyó la proporción de acetato y no fue así para el trébol donde la concentración de acetato no cambio al aumentar su proporción en la mezcla. La concentración de propionato fue mayor para las mezclas que contenían kikuyo comparativamente con aquellas que contenían ryegrass. La mayor inclusión de leguminosas en las mezclas aumentó las proporciones de propionato independientemente de la gramínea. Sin embargo, la adición de lotus al kikuyo tuvo un efecto mayor sobre las concentraciones de propionato que en el ryegrass. La proporción molar de acetato fue mayor para las combinaciones de kikuyo con trébol. Las mayores adiciones de leguminosas tendieron a aumentar las proporciones de butirato excepto en la mezcla de kikuyo y trébol blanco ( $p < 0.05$ ). La relación acetato:propionato presentó una interacción significativa ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos (Tabla 3.2).



**Cont. Tabla 3. 2:** Efecto de la proporción gramínea: leguminosa sobre fermentación ruminal *in vitro*.

Variable	Proporción Gra:Leg	Kikuyo		Ryegrass		X	G	L	P	GxL P <sup>1</sup> <	LxP	GxP	LxGxP
		Trebol	Lotus	Trébol	Lotus								
Butirato (mol %)							*	*	**	*	ns	ns	ns
	90:10	8.5	5.5	6.2	6.0	6.6							
	70:30	8.5	6.3	6.3	6.0	6.8							
	50:50	8.0	6.6	6.9	7.7	7.3							
	X	8.3	6.1	6.5	6.6								
Relación acetato:propionato							*	**	*	*	ns	ns	**
	90:10	2.4	2.0	3.1	3.3 <sup>a</sup>	2.7							
	70:30	2.4	1.8	3.1	3.7 <sup>a</sup>	2.8							
	50:50	2.2	1.7	2.9	2.9 <sup>b</sup>	2.4							
	X	2.3	1.8	3.0	3.3								

<sup>abc</sup>. Letras diferentes, diferencias significativas entre proporciones dentro de la asociación. \* p<0.01, \*\* p<0.05, ns: no significativo

<sup>1</sup>. G: Efecto de la gramínea. L: Efecto de la leguminosa. P: Efecto de la proporción. GxL: Interacción gramínea y leguminosa. LxP: Interacción leguminosa y proporción. GxP: Interacción gramínea y proporción. GxLxP: Interacción gramínea, leguminosa y proporción.

El efecto de la adición de leguminosas a las gramíneas sobre la digestibilidad de la materia seca y la materia orgánica dependió tanto de la especie de gramínea como de la leguminosa. En el caso del kikuyo la adición de trébol mejoró la DMS y DMO de la mezcla mientras que disminuyó con la adición de lotus. Para el ryegrass, la adición de trébol blanco no afectó la DMS o la DMO de la mezcla mientras que la adición de lotus la disminuyó (Tabla 3.3). El efecto de la adición de leguminosas a las gramíneas sobre la digestibilidad del FDN y de los carbohidratos (DFDN y DCH, respectivamente) fue similar entre especies de gramínea pero varió dependiendo de la leguminosa. La digestibilidad de la fibra en detergente neutro y los carbohidratos disminuyó al adicionar lotus mientras aumentó con la adición de trébol ( $p < 0.05$ ) (Tabla 3.3).

La producción total de gas fue similar entre especies de gramínea y disminuyó con la adición de las leguminosas en el caso del kikuyo pero no del ryegrass. El efecto de la adición de leguminosas a las gramíneas sobre la producción de gas por unidad de materia orgánica degradada dependió de la especie de gramínea y de leguminosa. Para el kikuyo al aumentar la inclusión de trébol disminuyó la producción de gas por unidad de materia orgánica degradada mientras la adición de lotus no tuvo un efecto sobre este parámetro. En el caso de ryegrass, la producción de gas por unidad de materia orgánica degradada como consecuencia de la adición de trébol blanco no fue diferente mientras que la adición de lotus la incrementó (Tabla 3.4)

La producción total de metano fue similar entre especies de gramínea y disminuyó con la adición de las leguminosas (Tabla 3.4). La producción de metano por unidad de materia orgánica degradada dependió de la especie de gramínea y de leguminosa. La producción de metano por unidad de materia orgánica degradada fue mayor para las mezclas que contenían kikuyo que para aquellas que contenían ryegrass. Para el kikuyo, la producción de metano por unidad de materia orgánica degradada fue mayor cuando se adicionó trébol blanco que cuando se adicionó lotus. Al aumentar la proporción de trébol blanco o lotus este parámetro disminuyó en el kikuyo mientras que no tuvo ningún efecto en el ryegrass (Tabla 3.4). La relación metano:gas fue menor para el ryegrass que para el kikuyo. Para ambas gramíneas el aumento en la proporción de trébol blanco no tuvo ningún efecto mientras que la adición de lotus disminuyó esta relación (Tabla 3.4).

**Tabla 3.3.** Efecto de la proporción gramínea: leguminosa sobre digestibilidad *in vitro*.

Variable	Proporción Gra:Leg	Kikuyo		Ryegrass		G	L	P	GxL	LxP	GxP	LxGxP
		Trébol	Lotus	Trébol	Lotus							
Materia seca						*	*	ns	*	*	*	ns
	90:10	63.6 <sup>b</sup>	64.4 <sup>a</sup>	67.6	64.8 <sup>a</sup>							
	70:30	65.6 <sup>b</sup>	63.6 <sup>ab</sup>	68.4	63.8 <sup>a</sup>							
	50:50	68.4 <sup>a</sup>	61.8 <sup>b</sup>	68.3	60.4 <sup>b</sup>							
Materia orgánica						*	*	ns	*	*	*	+
	90:10	85.1 <sup>b</sup>	86.1 <sup>a</sup>	89.9	86.9 <sup>a</sup>							
	70:30	87.3 <sup>b</sup>	85.4 <sup>ab</sup>	90.5	85.6 <sup>a</sup>							
	50:50	90.6 <sup>a</sup>	83.5 <sup>b</sup>	90.3	82.2 <sup>b</sup>							
Fibra detergente neutro						*	*	*	*	*	*	*
	90:10	62.7 <sup>b</sup>	61.8 <sup>a</sup>	64.9 <sup>b</sup>	64.2 <sup>a</sup>							
	70:30	63.7 <sup>b</sup>	58.0 <sup>b</sup>	68.0 <sup>a</sup>	60.8 <sup>b</sup>							
	50:50	65.6 <sup>a</sup>	55.7 <sup>c</sup>	68.2 <sup>a</sup>	54.9 <sup>c</sup>							
Carbohidratos						*	*	*	**	*	*	**
	90:10	67.1 <sup>c</sup>	65.3 <sup>a</sup>	69.8 <sup>b</sup>	68.3 <sup>a</sup>							
	70:30	69.4 <sup>b</sup>	61.7 <sup>b</sup>	73.2 <sup>a</sup>	65.0 <sup>b</sup>							
	50:50	72.2 <sup>a</sup>	59.4 <sup>c</sup>	74.4 <sup>a</sup>	60.0 <sup>c</sup>							

<sup>abc</sup>. Letras diferentes, diferencias significativas entre proporciones dentro de la asociación. \* p<0.01, \*\* p<0.05, ns: no significativo  
<sup>1</sup>. G: Efecto de la gramínea. L: Efecto de la leguminosa. P: Efecto de la proporción. GxL: Interacción gramínea y leguminosa. LxP: Interacción leguminosa y proporción. GxP: Interacción gramínea y proporción. GxLxP: Interacción gramínea, leguminosa y proporción.

**Tabla 3.4.** Efecto de la proporción gramínea:leguminosa sobre la producción de gas, de metano y la relación metano:gas *in vitro*

Variable	Proporción Gra:Leg	Kikuyo		Ryegrass		X	G	L	P	GxL	LxP	GxP	LxGxP
		Trébol	Lotus	Trébol	Lotus								
Producción de gas ml							ns	*	ns	ns	*	*	ns
	90:10	29.6 <sup>a</sup>	27.7 <sup>ab</sup>	27.7	27.0	28.0							
	70:30	27.3 <sup>b</sup>	28.0 <sup>a</sup>	28.0	27.5	27.7							
	50:50	27.3 <sup>b</sup>	26.2 <sup>b</sup>	28.6	28.1	27.6							
	X	28.1	27.3	28.1	27.5								
ml g <sup>-1</sup> MO degradada							*	**	ns	+	*	*	ns
	90:10	428.6 <sup>a</sup>	394.4	372.3	363.0 <sup>b</sup>	389.6							
	70:30	384.0 <sup>b</sup>	404.1	374.3	389.1 <sup>b</sup>	387.9							
	50:50	371.5 <sup>b</sup>	387.6	385.6	417.1 <sup>a</sup>	390.5							
	X	394.7	395.4	377.3	390.0								
Producción de metano ml							*	*	*	*	*	*	*
	90:10	3.4 <sup>a</sup>	3.1 <sup>a</sup>	2.9 <sup>b</sup>	2.8 <sup>a</sup>	3.1							
	70:30	3.2 <sup>b</sup>	2.8 <sup>b</sup>	3.0 <sup>a</sup>	2.7 <sup>a</sup>	2.9							
	50:50	3.2 <sup>b</sup>	2.5 <sup>c</sup>	3.0 <sup>a</sup>	2.6 <sup>b</sup>	2.8							
	X	3.3	2.8	3.0	2.7								

<sup>abc</sup>. Letras diferentes, diferencias significativas entre proporciones dentro de la asociación. \* p<0.01, \*\* p<0.05, ns: no significativo

<sup>1</sup>. G: Efecto de la gramínea. L: Efecto de la leguminosa. P: Efecto de la proporción. GxL: Interacción gramínea y leguminosa. LxP: Interacción leguminosa y proporción. GxP: Interacción gramínea y proporción. GxLxP: Interacción gramínea, leguminosa y proporción.

**Cont. Tabla 3.4:** Efecto de la proporción gramínea:leguminosa sobre la producción de gas, de metano y la relación metano:gas *in vitro*

Variable	Proporción Gra:Leg	Kikuyo		Ryegrass		X	G	L	P	GxL	LxP	GxP	LxGxP
		Trébol	Lotus	Trébol	Lotus								
ml g <sup>-1</sup> MO degradada	90:10	50.2 <sup>a</sup>	44.5 <sup>a</sup>	38.3	38.1	42.8	*	*	*	*	ns	*	*
	70:30	44.7 <sup>b</sup>	40.1 <sup>b</sup>	40.5	38.5	40.9							
	50:50	43.5 <sup>b</sup>	37.1 <sup>c</sup>	40.0	38.6	39.8							
	X	46.1	40.6	39.6	38.4								
	Relación metano:gas							*	*	*	*	*	**
Relación metano:gas	90:10	11.5	11.4 <sup>a</sup>	10.3	10.4 <sup>a</sup>	10.9							
	70:30	11.5	10.0 <sup>b</sup>	10.8	9.9 <sup>ab</sup>	10.6							
	50:50	11.7	9.5 <sup>b</sup>	10.2	9.1 <sup>b</sup>	10.1							
	X	11.6	10.3	10.4	9.8								

<sup>abc</sup>. Letras diferentes, diferencias significativas entre proporciones dentro de la asociación. \* p<0.01, \*\* p<0.05, ns: no significativo

<sup>1</sup>. G: Efecto de la gramínea. L: Efecto de la leguminosa. P: Efecto de la proporción. GxL: Interacción gramínea y leguminosa. LxP: Interacción leguminosa y proporción. GxP: Interacción gramínea y proporción. GxLxP: Interacción gramínea, leguminosa y proporción.



La producción de metano (PCH<sub>4</sub>) mostró una relación positiva con la DMO pero negativa con la DMS (R<sup>2</sup>=68, p<0.01) (Ecuación 1).

$$\text{PCH}_4 \text{ (ml)} = 0.27 \times \text{DMO}(\%) - 0.24 \times \text{DMS}(\%) - 4.76 \text{ (Ecuación 1)}$$

La DFDN y DMO se relacionaron positivamente con la producción de gas total (PGT), mientras que la DMS se relacionó negativamente. (R<sup>2</sup>=67, p<0.01) (Ecuación 2)

$$\text{PGT (ml)} = 2.49 + 0.08 \times \text{DFDN}(\%) + 1.36 \times \text{DMO}(\%) - 1.50 \times \text{DMS}(\%) \text{ (Ecuación 2)}$$

### 3.4 Discusión

La introducción de leguminosas en pasturas basadas en gramíneas ha sido promovida en muchos sistemas de producción con rumiantes debido al efecto positivo que tienen sobre el consumo de alimento y la producción animal (León, 2011; Castro *et al.*, 2008). El impacto de estas prácticas debe considerar no solamente los aspectos productivos de la producción sino incluir los aspectos ambientales (Beaukes *et al.*, 2009). Algunos trabajos han estudiado el efecto de adicionar una leguminosa a una gramínea en la producción de metano *in vitro* (Stürm *et al.*, 2007; Hess *et al.*, 2003) e *in vivo* (Lee *et al.*, 2004; Woodward *et al.*, 2004). Las conclusiones que se pueden derivar de estos trabajos no son claras pues en algunos casos la adición de la leguminosa incrementó la producción de metano (Carulla *et al.*, 2005) mientras en otros casos la disminuyó (Lee *et al.*, 2004). Nosotros hemos sugerido que la diferencia en la producción de metano *in vitro* entre especies forrajeras podría estar explicada por las diferencias en la proporción de carbohidratos digeribles en los forrajes y la proporción de celulosa (Vargas *et al.*, datos sin publicar). El objetivo del presente experimento fue evaluar el efecto de adicionar una leguminosa (trébol blanco o lotus) a una gramínea (kikuyo o ryegrass) en proporciones crecientes (90:10, 70:30 y 50:50) sobre la producción de metano *in vitro*. En este trabajo encontramos que el efecto de adicionar lotus al kikuyo o ryegrass era similar mientras que para el caso del trébol el efecto era diferente para cada una de estas gramíneas por lo cual se discutirá independientemente el efecto de las mezclas de las gramíneas con lotus y trébol.

- *Adición de trébol a las gramíneas y producción de metano*

En nuestro trabajo a medida que aumenta la proporción de trébol en la mezcla con kikuyo la producción de metano total y por unidad de materia orgánica degradada disminuyó mientras que con el ryegrass la producción total de metano aumentó pero fue similar entre diferentes proporciones de esta gramínea cuando se expresó por unidad de MO degradada. Vargas *et al.* (datos sin publicar) encontraron que las producciones de gas y las de metano *in vitro* estaban asociadas a la concentración de carbohidratos fermentables en estos sistemas. Van Soest, (1994) sugirió que la fermentación de carbohidratos estaba estrechamente asociada con la producción de AGVs, gas y metano. En el caso del este trabajo, la adición de trébol al kikuyo y el ryegrass disminuyó los carbohidratos totales debido a una menor concentración de estos en la leguminosa pero aumentó la digestibilidad de la MO para el kikuyo. Se observó una disminución en la concentración de carbohidratos totales como consecuencia de la adición de trébol que varió entre 4 y 7%. Adicionalmente, encontramos una relación positiva entre los carbohidratos fermentados y la producción de AGVs ( $r=0.74$ ,  $p<0.01$ ). Sin embargo, la inclusión de trébol aumentó la digestibilidad de los carbohidratos totales entre un 6 y 7% resultando en concentraciones similares de carbohidratos totales degradados como consecuencia de la adición de trébol. Por lo cual en este trabajo, los cambios en los carbohidratos fermentables no se relacionaron significativamente con la producción de metano cuando se adicionó trébol a las gramíneas.

Contrario a lo encontrado aquí, Hess *et al.* (2003) encontraron un aumento en la producción de metano al adicionar una leguminosa a un forraje tropical de baja calidad. Estos autores sugieren que el aumento en la digestibilidad del material incubado podría aumentar la producción de metano al incrementar la disponibilidad de H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> producto de la fermentación resultando posiblemente en una mayor producción de metano. Otros autores también han asociado la mayor digestibilidad del material incubado con una mayor producción de gas y metano (Tavendale *et al.*, 2005). Sin embargo, en el presente trabajo a pesar que aumentó la digestibilidad cuando se incrementó la proporción de trébol blanco en mezcla con el kikuyo no aumentó la producción de metano, gas o AGVs.

Las inclusiones de leguminosas han sido asociadas con el aumento en las concentraciones de proteína cruda y la disminución de los carbohidratos totales en la

mezcla (Hess *et al.*, 2003). En nuestro trabajo, el aumento en la concentración de proteína entre la menor y la mayor inclusión de trébol varió del 9 a 10%. López (2005) sugiere que la producción de gas *in vitro* de sustratos altos en proteína no siempre está relacionada con la digestibilidad del material fermentado. La fermentación de las proteínas a nivel ruminal pueden resultar en la síntesis de proteína microbial, producción de amonio o AGVs, gas y metano dependiendo del tipo de proteína fermentada, condiciones de fermentación y microorganismos involucrados (Leng, 2011). En nuestro trabajo, se presentó una relación inversa entre la producción de AGVs y la concentración de proteína en las mezclas ( $r = -0.61$ ,  $p < 0.01$ ). Sin embargo, la relación entre la producción de metano y la concentración de proteína no fue significativa. Esto explica parcialmente las menores concentraciones de estos ácidos como consecuencia de la adición de trébol al kikuyo o al ryegrass. Sin embargo, el aumento en la concentración de proteína solo podría explicar la disminución en la producción de gas y de metano cuando se aumentó la proporción de trébol en las mezclas con kikuyo. Adicionalmente, el aumento en los niveles de proteína debido a la adición de trébol al ryegrass no modificó la producción total de gas pero aumentó la de metano. Es interesante observar que en el caso del kikuyo la adición de la leguminosa aumentó la digestibilidad de la MO pero no fue así con el ryegrass por lo cual se esperarían tendencias en la producción de gas y metano inversas a las observadas en nuestro experimento. Es decir, que habría un aumento en la producción de gas para las mezclas con kikuyo y una producción estable de gas en las mezclas con ryegrass.

Finalmente, el aumento en la degradación del forraje incubado acompañado por la menor producción de gas y AGVs cuando aumentó la proporción de trébol en la mezcla con el kikuyo y no en el ryegrass podría explicarse por un aumento en la síntesis de proteína microbial en el primero pero no en el segundo. Blümmel *et al.* (1997) sugieren que los productos de la fermentación se distribuyen entre la producción de gas, síntesis de AGVs y formación de proteína microbial. Por lo tanto, un aumento en la producción de proteína microbial implicaría una disminución en la producción de gas y/o AGVs. En este mismo sentido, Hess *et al.* (2003) sugieren que la inclusión de niveles crecientes de una leguminosa con bajos contenidos de taninos aumenta la proporción de nitrógeno empleado en la síntesis de proteína microbial. Una tendencia diferente entre el kikuyo y el ryegrass en la síntesis de proteína microbial como consecuencia de la adición del

trébol blanco podría ayudar a explicar la respuesta diferencial entre las dos gramíneas a la adición de trébol. Se ha sugerido que una mayor síntesis de masa microbial disminuye la producción de metano ya que parte de la MO queda retenida en la masa microbial (Blümmel *et al.*, 1997). Por lo tanto, esto implicaría porqué en el caso de este estudio la adición de trébol al kikuyo generó un mayor crecimiento de microorganismos que cuando este se adicionó al ryegrass. Aunque en nuestro trabajo no evaluamos ningún indicador de crecimiento microbial, se sabe que un aumento en la fermentabilidad de la MO en el rumen está asociada a una mayor síntesis de proteína microbial (Russell *et al.*, 1992). En nuestro estudio, la digestibilidad de la MO aumentó como consecuencia de la adición del trébol al kikuyo pero no al ryegrass por lo cual se podría sugerir que el rendimiento microbial aumentó para el kikuyo pero no para el ryegrass. Una menor producción de metano y gas como consecuencia de una mejoría en la degradabilidad de la MO se daría siempre y cuando exista suficiente proteína en el medio de cultivo para el uso de esta energía adicional. Se ha demostrado que existen relaciones óptimas entre energía y proteína que maximizan la síntesis microbial (Russell *et al.*, 1992). Por lo cual se podría especular, que la producción de gas y de metano no solo dependería de la fermentabilidad de los carbohidratos como sugerimos en el capítulo anterior sino que las relaciones energía proteína serían también determinantes en este proceso.

- *Producción de metano en las mezclas de gramíneas con lotus en diferentes proporciones.*

En el presente trabajo el aumento en la proporción de lotus disminuyó las emisiones totales de metano (ml) sin importar la gramínea al cual estuvo asociado (Tabla 3.4). El *Lotus uliginosus* es una leguminosa con moderados niveles de taninos condensados (Tabla 3.1) (Waghorn, 2008). La inclusión de leguminosas taníferas se han relacionado con una disminución en la producción de metano tanto en estudios *in vitro* (Hess *et al.*, 2008; Hess *et al.*, 2006) como en ensayos *in vivo* (Woodward *et al.*, 2004; Woodward *et al.*, 2001). Se han reportado algunos mecanismos que podrían explicar el efecto de los taninos condensados sobre la disminución en la producción de metano. Waghorn (2008) sugiere que los taninos condensados forman complejos indigeribles con algunos nutrientes de la dieta que evitan que se degraden a nivel ruminal. Por ejemplo, los taninos condensados presentes en el lotus ha sido relacionados con la disminución de la digestibilidad de la MS y la proteína *in vitro* (Chipatecua *et al.*, 2007). En este mismo

sentido Hess *et al.* (2008) reporta una menor digestibilidad *in vitro* de la MO y la fibra cuando se incluyen leguminosas taníferas. La disminución en la digestibilidad del material fermentado ha sido atribuida además a la posible formación de complejos entre los taninos y las enzimas del hospedero y/o de los microorganismos del rumen resultando en la inactivación de los complejos enzimáticos encargadas de la hidrólisis de los nutrientes (Patra y Saxena, 2010). Finalmente, se ha sugerido que los taninos condensados podrían tener efectos bacteriostáticos sobre algunas poblaciones ruminales, lo que podría resultar en una menor digestibilidad del material fermentado (Patra y Saxena, 2010). En síntesis, la disminución en la digestibilidad de los nutrientes a nivel ruminal resulta en una menor producción de H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, disminuyendo la producción de metano. Esto permitiría explicar los resultados observados en este trabajo. Adicionalmente, en nuestro trabajo el aumento en la inclusión de lotus disminuyó la producción de AGV. Como se mencionó anteriormente, la producción de AGV esta relacionada de una manera importante con la degradación de carbohidratos. La disminución en la concentración de carbohidratos totales y su menor digestibilidad entre la menor y mayor inclusión podría explicar la menor producción de AGV cuando aumenta la proporción de lotus en la mezcla y parcialmente a una menor producción de metano.

En nuestro trabajo el aumento en la proporción de lotus disminuyó la proporción de acetato. Algunos autores han sugerido que los patrones de fermentación podrían explicar la producción de metano. Moss *et al.* (2000) sugieren que la producción de metano presenta una relación directa con las concentraciones de acetato. Sin embargo, el propionato presenta una relación inversa con la producción de metano. La síntesis de acetato libera H<sub>2</sub> mientras que la de propionato requiere H<sub>2</sub> para su síntesis (Russell, 1998). De esta manera la síntesis de metano y propionato competirían por los H<sub>2</sub> presentes en el medio presentando un comportamiento inverso, mientras que los H<sub>2</sub> resultantes de la síntesis de acetato podrían ser utilizados en la síntesis de metano (Moss *et al.*, 2000). Sin embargo, la disminución en la producción de metano debido a la modificación en la proporción de AGV no se hace evidente al presentarse pequeños cambios en la relación acetato:propionato que difícilmente explicarían la disminución en la producción de metano. Por otra parte, la inclusión de leguminosas con taninos condensados ha sido relacionada un posible efecto bacteriostático o bactericida sobre algunas poblaciones ruminales. Patra y Saxena (2010) sugieren un posible efecto

deletéreo sobre algunas poblaciones fibrolíticas. La menor digestibilidad del FDN y la disminución en la concentración de acetato cuando aumenta la proporción de lotus en la mezcla podría sugerir dicho efecto. La disminución en la producción de metano por unidad de gas producido sugiere que el aumento en la inclusión de lotus podría disminuir la síntesis de metano. En este mismo sentido, en el capítulo dos, se observó una menor producción de metano en relación a la producción de gas del lotus respecto a las demás especies evaluadas. Tavendale *et al.* (2005) sugieren que los taninos condensados del lotus podrían tener efecto bacteriostático sobre algunas poblaciones metanogénicas, explicando la disminución en la producción de metano por unidad de gas producido. Estos mismos autores sugieren que la disminución en la síntesis de metano promueve la liberación de H<sub>2</sub>. La acumulación excesiva de H<sub>2</sub> en el rumen ha sido asociada con la disminución de la degradación de la materia orgánica a nivel ruminal al no poderse oxidar los cofactores asociados a los procesos de fermentación anaerobia (Van Soest, 1994) explicando una menor degradación de la MO cuando aumenta la proporción de lotus en la mezcla.

### 3.5 Conclusiones

En nuestro trabajo el efecto de añadir una leguminosa a una gramínea sobre la producción de metano *in vitro* dependió de las especies mezcladas. Al adicionar trébol, la producción de metano disminuyó para el caso del kikuyo pero no para el caso del ryegrass. En el caso del *L. uliginosus* al aumentar la proporción de la leguminosa en la mezcla disminuyó la producción de total de metano sin importar la gramínea. La presencia de una leguminosa tanífera disminuyó la relación producción de metano y gas, sugiriendo un efecto sobre poblaciones metanogénicas. Posiblemente la presencia de taninos condensados en el lotus afecte poblaciones fibrolíticas y metanogénicas explicando la menor degradabilidad de la fracción fibrosa de la dieta, disminución en la proporción de acetato y en la menor proporción de metano en el gas. El incremento en la proporción de leguminosas se relacionó con el aumento en la concentración de proteína presentándose una relación inversa con la producción de AGVs. Posiblemente la relación de los carbohidratos degradados y la proteína podría explicar las diferencias en la producción de gas y de metano cuando se incluyó trébol en la mezcla. El aumento en la síntesis de proteína microbiana al aumentar la degradabilidad del material incubado cuando

se aumenta la proporción de trébol en mezclas con kikuyo podría explicar la menor producción de gas y de metano.

### 3.6 Agradecimientos

Los autores agradecen a Diana Parra por su colaboración en el desarrollo de los procedimientos de laboratorio de este experimento. Además a los integrantes de Laboratorio de Nutrición Animal y Microbiología de Corpoica-Tibaitata y el Grupo de Investigación en Nutrición Animal (GINA) de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.

### 3.7 Bibliografía

Beukes PC., Gregorini P., Romera AJ., Levy G. y Waghorn GC. 2009. Modelling the efficacy and profitability of mitigation strategies for reducing greenhouse gas emissions on pastoral dairy farms in New Zealand. 18<sup>th</sup> World IMACS/MODSIM Congress. Cairns, Australia.

Blümmel M., Makkar HPS., y Becker K. 1997. *In vitro* gas production: a technique revisited. Journal of Animal and Physiology and Animal Nutrition, 77:24-34

Carulla JE., Kreuzer M., Machmüller A., y Hess HD. 2005. Supplementation of Acacia mearnsii tannin decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. Australian Journal of Agricultural Research, 56:961-970.

Castro E., Mojica JE., León JM., Pabón ML., Carulla JE. y Cárdenas EA. 2008. Productividad de pasturas y producción de leche bovina bajo pastoreo de gramínea y gramínea + *Lottus uliginosus* en Mosquera, Colombia. Rev. Med. Vet. Zoot. 55:9-21.

Castro E. Balance de nitrógeno en pasturas asociadas gramínea y leguminosa en sabana occidente de Bogotá. 2006. Tesis para optar por el título de Zootecnista. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

Chipatecua MR., Pabón ML., Cárdenas EA., y Carulla JE. 2007. Efecto de la combinación de una leguminosa tanífera (*Lotus uliginosus* cv Maku) con *Pennisetum clandestinum*, sobre la degradación *in vitro* de proteína y materia seca. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, 20: 40-48.

Hess HD., Mera ML., Tiemann TT., Lascano CE. y Kreuzer M. 2008. *In vitro* assessment of the suitability of replacing the low-tannin legume *Vigna unguiculata* with the tanniniferous legumes *Leucaena leucocephala*, *Flemingia macrophylla* or *Calliandra calothyrsus* in a tropical grass diet. Animal Feed Science and Technology, 147:105-115.

Hess HD., Tiemann., Noto F., Carulla. y Kreuzer M. 2006. Strategic use of tannins as means to limit methane emission from ruminant livestock. International Congress Series. 1293: 164-167.

Hess HD., Monsalve LM., Lascano CE., Carulla JE., Díaz TE. y Kreuzer M. 2003. Supplementation of a tropical grass diet with forage legumes and *Sapindus saponaria* fruits: effects on *in vitro* ruminal nitrogen turnover and methanogenesis. Australian Journal of Agricultural Research 54: 703-713.

Lee JM., Woodward SL., Waghorn GC., y Clark DA. 2004. Methane emissions by dairy cows fed increasing proportions of white clover (*Trifolium repens*) in pasture. Proceedings of the New Zealand Grassland Association, 66: 151-155.

Leng RA. 2011. The rumen- a fermentation vat or a series of organized structured microbial consortia: implications for the mitigation of enteric methane production by feed additives. Livestock Research for Rural Development 23, Article #258.

León JM. 2011. Efecto de la incorporación de leguminosas en pasturas de trópico alto sobre el contenido de ácido linoleico conjugado ALC de la leche. Tesis para optar por el título de Magister en Producción Animal. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.



López S. 2005. *In vitro* and *in situ* techniques for estimating digestibility. En: Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism. Ed: Dijkstra J., Forbes JM. y France J. CABI Publishing. Second Edition. Wallingford, UK.

Moss A., Jouany JP. y Newbold J. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Annales Zootechnic.* 29: 231-253.

Patra AK. y Saxena J. 2010. Review: A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*, 71: 1198-1222.

Russell JB. 1998. The importance of pH in the regulation of ruminal acetate propionate ratio and methane production *in vitro*. *Journal of Dairy Science*, 81: 3222-3230.

SAS (Statistical Analysis System). 2003. Online Doc 9.1.3. Cary, USA: SAS Institute Inc.

Stürm CD., Tiemann TT., Lascano CE., Kreuzer M., y Hess HD. 2007. Nutrient composition and *in vitro* ruminal fermentation of tropical legume mixtures with contrasting tannin contents. *Animal Feed Science and Technology*, 138: 29-46.

Tavendale MH., Meagher L., Pacheco D., Walker N., Attwood GT., y Sivakumaran S. 2005. Methane production from *in vitro* rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. *Animal Feed Science and Technology*, 123-124: 403-419.

Van Soest P. 1994. Nutritional ecology of the ruminant. 2 edition. Cornell University Press. USA, p 271.

Waghorn G. 2008. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production-Progress and challenges. *Animal Feed Science and Technology*, 147:116-139.

Woodward SL., Waghorn GC., y Laboyrie PG. 2004. Condensed tannins in birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) reduce methane emissions from dairy cows. Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production, 64: 160-164.

Woodward SL., Waghorn GC., Ulyatt MJ., y Lassey KR. 2001. Early indications that feeding Lotus will reduce methane emissions from ruminants. Proc New Zeal Soc An, 61: 23-26.





## **4. Producción de metano por corderos consumiendo mezclas de henos de *Lotus uliginosus* y de *Pennisetum clandestinum***

### **Resumen**

El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto de inclusión de una leguminosa tanífera (*Lotus uliginosus*) a una dieta basal de heno de kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) sobre la producción de metano en ovinos. Doce machos criollos, con peso promedio  $23 \pm 2$  kg, fueron asignados aleatoriamente en un diseño de sobre-cambio compuesto a 2 tratamientos y 3 periodos de medición. Los tratamientos consistieron en 100% heno de kikuyo y 70% heno de kikuyo 30% heno de lotus con 6 animales por tratamiento. Cada uno de los tres periodos tuvo una duración de 20 d, los primeros 15 días de adaptación a la dieta y los cinco finales de medición. Los animales se distribuyeron en jaulas metabólicas, se alimentaron diariamente al 90% del consumo voluntario y agua a voluntad. El consumo, producción de heces y digestibilidad fue determinada para cada animal. La producción de metano fue medida para cada grupo de animales (6 ovejos) en un poli-túnel. Se realizó un ANOVA utilizando la función GLM de SAS. Se hicieron comparaciones entre tratamientos por Tukey. El consumo de materia orgánica (MO) aumentó en un 23% ( $p < 0.05$ ) cuando la leguminosa fue incluida en la dieta ( $418$  vs  $514$  g  $d^{-1}$ ), sin embargo el consumo de FDN fue similar entre tratamientos ( $332$  vs  $360$  g  $d^{-1}$ ). Cuando la leguminosa fue incluida en una dieta basal, la digestibilidad de la MO presentó una tendencia ( $p < 0.1$ ) a incrementar en 2% ( $587$  vs  $599$  g  $kg^{-1}$ ) y la digestibilidad del FDN disminuyó ( $p < 0.05$ ) en 4.6% ( $615$  vs  $587$  g  $kg^{-1}$ ). La adición de leguminosa redujo la producción total metano ( $51.6$  vs  $43.1$  g  $d^{-1}$ ;  $p < 0.01$ ), metano por unidad de materia seca consumida ( $18.8$  vs  $12.2$  g  $kg^{-1}$  MSC;  $p < 0.01$ ), metano por materia orgánica degradada ( $36.1$  vs  $23.4$  g  $kg^{-1}$  MOD;  $p < 0.01$ ) y metano por FDN degradado ( $43.5$  vs  $34.0$  g  $kg^{-1}$  FDND;  $p < 0.01$ ). La inclusión de 30% de heno de lotus en una dieta basal de heno de kikuyo incrementó el consumo de MO en un 23% y disminuyó

la emisión total de metano en un 16%. Se presentó un efecto residual del lotus sobre la producción de metano sugiriendo posiblemente una reducción en la metanogénesis ruminal. El lotus podría reducir las emisiones de metano entérico en sistemas de producción de trópico alto colombiano

**Palabras clave:** gases efecto invernadero, *Lotus uliginosus*, *Pennisetum clandestinum*.

## Abstract

The effects of introducing a tanniferous legume (*Lotus uliginosus*) to a kikuyu (*Pennisetum clandestinum*) hay basal diet fed to sheep on methane production were evaluated. Twelve indigenous breed growing rams, with an average weight of 23±2 kg, were assigned randomly to one of two treatments and three measurement periods in a 2x3 switchover design. Treatments consisted of 100 % kikuyu hay or 70% kikuyu hay: 30% lotus hay with 6 rams per treatment. Each of the three periods lasted 20 d, where the first 15 days were for adaption to the diet and the last five days for measurements. Rams were allocated in metabolic cages, fed once a day (8 AM) to 90% voluntary intake and with free access to water. Intake, fecal production and digestibility were determined for each ram. Methane production was measured for each treatment group (6 rams) in a poly tunnel. Data were analyzed using ANOVA and GLM procedure of SAS. Multiple comparisons among treatment means were performed by Tukey's. Organic matter (OM) intake increased by 23% ( $p < 0.01$ ) when legume was included in the basal diet (418 vs. 514 g/d) but NDF intake was similar between treatments (332 vs. 360 g/d). When legume was included in the basal diet, OM digestibility tended ( $p < 0.1$ ) to increase in 2% (587 vs. 599 g/kg) and NDF digestibility decreased ( $p < 0.05$ ) by 4.6% (615 vs. 587 g/kg). Legume addition reduced total methane production (51.6 vs. 43.1 g/d;  $p < 0.01$ ), methane per DMI (18.8 vs. 12.2 g/kg DMI;  $p < 0.01$ ), methane per DOMI (36.1 vs. 23.4 g/kg DOM;  $p < 0.01$ ) and methane per DNDFI (43.5 vs 34.0 g/kg DNDF;  $p < 0.01$ ). Addition of 30% lotus hay to a kikuyu basal diet fed to rams increased total OMI by 23% and decreased total methane emission by 16%. There was a residual effect of lotus inclusion on methane emissions suggesting a reduction in ruminal methanogenesis. Lotus could be a suitable legume to reduce methane emissions in grazing systems in the highlands of Colombia.

**Key words:** greenhouse gases, *Lotus uliginosus*, *Pennisetum clandestinum*.

## 4.1 Introducción

En el mundo, una proporción importante de los rumiantes utilizan pasturas como fuente principal de alimento y sus características pueden modificar las emisiones de metano (Johnson y Johnson, 1995, Lovett *et al.*, 2005). En estudios *in vivo* la inclusión de leguminosas con bajos contenidos de taninos en dietas basales de gramínea han presentado respuestas contradictorias. Carulla *et al.* (2005) sugirieron que las emisiones de metano por unidad de materia seca consumida por ovinos aumentaban cuando se incluía trébol en una dieta basal de ryegrass. En cambio, Lee *et al.* (2004) reportaron una disminución en la producción de metano por unidad de materia seca consumida por bovinos cuando se incrementó la proporción de trébol blanco en la dieta. Resultados similares fueron reportados cuando se incluyen leguminosas taníferas en dietas de ovinos y bovinos (Woodward *et al.*, 2004; Tiemman *et al.*, 2008).

El objetivo del presente experimento fue determinar la producción de metano por corderos cuando se incluye una leguminosa tanífera (*Lotus uliginosus*) a una dieta basal de kikuyo (*Pennisetum clandestinum*).

## 4.2 Materiales y métodos

Todos los procedimientos fueron aprobados por el comité de bioética de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia a (Acta 007 de 2010 con número CBE-FMVZ-026)

### 4.2.1 Localización

El experimento se realizó en el centro de investigación Corpoica Tibaitatá, ubicado en el municipio de Mosquera (Cundinamarca); con una altitud de 2650 msnm, temperatura promedio 13°C con fluctuaciones entre 0°C y 20°C. La precipitación anual promedio es de 528.9 mm con distribución bimodal de dos períodos lluviosos, uno entre los meses de abril-mayo y el otro desde septiembre hasta noviembre y humedad relativa de 80-85%.

## 4.2.2 Especies forrajeras

En dos lotes diferentes, se cosecharon una gramínea, kikuyo (*Pennisetum clandestinum*), y una leguminosa, lotus grande (*Lotus uliginosus*), ambos de aproximadamente 50 días de rebrote. Estos se henificaron en invernadero, se empacaron y se almacenaron a temperatura ambiente.

## 4.2.3 Animales y diseño experimental

Doce corderos criollos machos en crecimiento con peso vivo  $23 \pm 2$  kg fueron ubicados en jaulas metabólicas individuales y asignados aleatoriamente a dos grupos de 6 animales cada uno. Los grupos fueron asignados a un diseño experimental de sobre-cambio de 2 (tratamientos) x 3 (periodos). Los tratamientos experimentales fueron una dieta de 100% de kikuyo y otra de 70% heno de kikuyo y 30% heno de lotus. Cada grupo de 6 animales en sus jaulas fue ubicado en uno de dos túneles de 7 m de largo, 5 de ancho y 2.6 de alto, para un volumen total de  $83.5 \text{ m}^3$ , para la medición de metano de acuerdo a la metodología descrita por Munrray *et al.* (2007)

El experimento tuvo una duración de 60 días divididos en tres periodos experimentales de 20 días cada uno. Los primeros 7 días de cada periodo se suministró alimento a voluntad para determinar el consumo voluntario. Los siguientes 13 días se restringió la oferta al 90% del consumo voluntario para disminuir la selectividad y garantizar el consumo total de la dieta.

Se promedió el consumo de materia seca, la excreción de heces y orina de los últimos 5 días de cada periodo experimental para cada animal y se hizo una mezcla compuesta del alimento ofrecido, de las excretas y de la orina. La orina se acidificó con ácido clorhídrico 6N y se conservó a  $-20^\circ\text{C}$ . En los últimos tres días de cada periodo, se tomó una muestra de gas de los túneles (5 ml) cada hora, que fueron reservadas en vacutainers al vacío para posterior análisis de metano (Murray *et al.* 2007). El último día de cada periodo se extrajeron dos alícuotas de 15 ml de fluido ruminal de cada animal a través de una sonda oro-ruminal. En una alícuota se determinó el pH utilizando un potenciómetro (Hanna HI 98140) y la otra fue conservada a  $-20^\circ\text{C}$ .



#### **4.2.4 Análisis de laboratorio**

Para los forrajes y las heces se determinó la materia seca (AOAC, 2005), proteína cruda por el método de Dumas (AOAC, 2005), extracto etéreo (AOAC, 2005), fibra en detergente neutro y fibra en detergente ácido (Van Soest *et al.*, 1991), cenizas (AOAC, 2005) y energía bruta por calorimetría (Parr® 6510). Adicionalmente, se determinó la concentración de taninos condensados en los forrajes por el método de butanol-HCL (Terrill *et al.*, 1992). Finalmente, la concentración de nitrógeno amoniacal en el fluido ruminal fue determinada por colorimetría según el procedimiento descrito por Parra y Avila (2010).

Para la determinación de la concentración de metano en el gas reservado de cada hora de muestreo y los AGV's del fluido ruminal, se utilizó un cromatógrafo de gases (Shimadzu GC-2014) equipado con un detector de ionización de llama (FID) utilizando nitrógeno como gas de arrastre según lo descrito por Parra y Ávila (2010) y Betancur (2001), respectivamente.

#### **4.2.5 Análisis estadístico**

Se utilizó un modelo de sobre-cambio compuesto con dos tratamientos (gramínea pura y mezcla gramínea:leguminosa) aplicados en secuencia a través de los tres periodos de evaluación. Para el análisis de varianza se utilizó el procedimiento GLM de SAS® versión 9.2 de acuerdo a lo descrito por Martínez *et al.* (2011). Las medias fueron comparadas por medio de la prueba de Tukey con una significancia del 5%. En el caso de las variables asociadas al consumo, la excreción y la digestibilidad se consideró el animal como unidad experimental mientras que para las variables asociadas a la producción de metano se consideró el grupo de 6 animales como unidad experimental.

El modelo de sobre-cambio compuesto permitió reconocer la significancia del efecto residual en la mayoría de las variables evaluadas, por tal motivo fue incluido en el modelo (Anexo C). Las variables analizadas tuvieron coeficientes de determinación mayores al 75% y de variación menores del 20%. Todas las variables evaluadas cumplieron los supuestos del modelo (Anexo D).

## 4.3 Resultados

### 4.3.1 Composición bromatológica de los forrajes

El contenido de proteína, lignina y carbohidratos no estructurales fue mayor en la leguminosa pero la concentración de carbohidratos estructurales fue menor que en la gramínea (Tabla 4.1).

**Tabla 4.1:** Composición nutricional de las dietas (n=6)

Composición	Kikuyo: Lotus	Kikuyo
PC, %	16.8	11.8
EE, %	1.2	1.3
FDN, %	61.2	69.9
FDA, %	31.3	31.6
Hemicelulosa, %	29.9	38.4
Celulosa, %	23.7	27.8
Lignina, %	7.6	3.8
Cenizas, %	12.9	12.1
Taninos condensados, %	1.3	0.0
Carbohidratos no estructurales <sup>1</sup> , %	6.6	4.9
Carbohidratos totales <sup>2</sup> , %	60.2	71.0
MO, %	87.1	87.9
Energía (Kcal/g)	3.9	3.9

<sup>1</sup>. 100-(PC+FND+cenizas+EE+Taninos condensados)

<sup>2</sup>. FDN+CNE-Lignina

### 4.3.2 Consumo, excreción y digestibilidad de nutrientes

El consumo de materia seca (MS), orgánica (MO), lignina (LGN) y fibra en detergente ácido (FDA), fue mayor para la dieta kikuyo:lotus que para la de kikuyo ( $p < 0.05$ ) pero el consumo de FDN no fue diferente entre las dos dietas. La excreción de MS, MO, LGN, FDN y FDA fue mayor en los animales que recibieron la dieta kikuyo:lotus (Tabla 4.2). La digestibilidad de la MS y MO fue mayor en lo animales que recibieron la mezcla ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, la digestibilidad del FDN y el FDA fue mayor en los animales que recibieron la gramínea pura ( $p < 0.05$ ) (Tabla 4.3.).

**Tabla 4.2:** Efecto de la inclusión de heno de *Lotus uliginosus* en una dieta basal de kikuyo sobre el consumo, producción de heces y de orina en ovinos

Variable	Kikuyo	Asociación	Tratamiento P<	Residual P<
Consumo (g)				
Materia seca	475.8 <sup>b</sup>	589.3 <sup>a</sup>	*	*
FDN	332.9	360.9	ns	*
FDA	150.3 <sup>b</sup>	184.6 <sup>a</sup>	*	*
Lignina	18.2 <sup>b</sup>	45.0 <sup>a</sup>	*	*
Materia orgánica	418.4 <sup>b</sup>	513.6 <sup>a</sup>	*	*
Heces (g)				
Materia seca	211.3 <sup>b</sup>	242.8 <sup>a</sup>	**	*
Fibra detergente neutro	128.9 <sup>b</sup>	149.7 <sup>a</sup>	**	*
Fibra detergente ácido	70.7 <sup>b</sup>	94.9 <sup>a</sup>	*	*
Lignina	26.8 <sup>b</sup>	46.0 <sup>a</sup>	*	**
Materia orgánica	174.6 <sup>b</sup>	206.6 <sup>a</sup>	*	*
Orina (ml)				
Total	758.8 <sup>b</sup>	1211.3 <sup>a</sup>	*	*

<sup>a,b</sup>. Letras diferentes dentro de filas diferencia entre tratamientos. ns: no significativo, \*\* p<0.05, \*p<0.01

**Tabla 4.3:** Efecto de la inclusión de heno de *Lotus uliginosus* en una dieta basal de kikuyo sobre características de fermentación ruminal y digestibilidad de ovinos

Variable	Kikuyo	Asociación	Tratamiento P<	Residual P<
pH	7.4	7.6	ns	**
Amonio (mmol/L)	5.4 <sup>b</sup>	7.9 <sup>a</sup>	*	*
Ácidos grasos volátiles				
Total (mmol/L)	42.9	37.2	ns	**
Acetato (mol %)	79.4 <sup>a</sup>	76.0 <sup>b</sup>	*	ns
Propionato (mol %)	15.7 <sup>b</sup>	16.7 <sup>a</sup>	+	ns
Butirato (mol %)	4.0 <sup>b</sup>	6.0 <sup>a</sup>	*	ns
Relación acetato:propionato	5.1 <sup>a</sup>	4.6 <sup>b</sup>	**	ns
Digestibilidad aparente (%)				
Materia seca	56.0 <sup>b</sup>	58.9 <sup>a</sup>	*	*
Fibra detergente neutro	61.5 <sup>a</sup>	58.7 <sup>b</sup>	**	*
Fibra detergente ácido	53.4 <sup>a</sup>	48.8 <sup>b</sup>	**	**
Materia orgánica	58.7 <sup>b</sup>	59.9 <sup>a</sup>	+	*

<sup>a,b</sup>. Letras diferentes dentro de filas diferencia entre tratamientos. ns: no significativo, \*\* p<0.05, \*p<0.01

### 4.3.3 Amonio, pH, AGV's y producción de metano

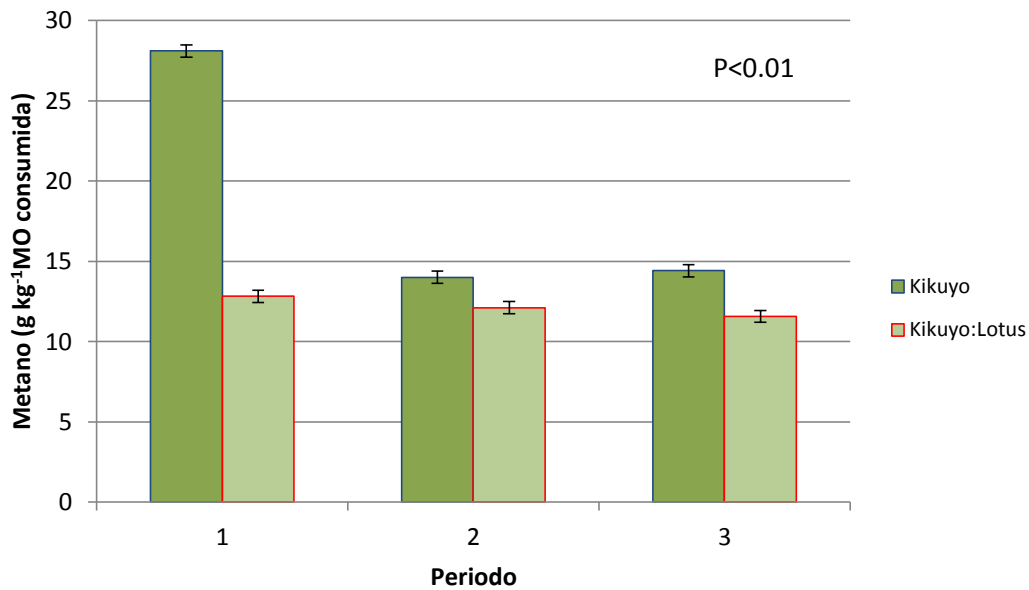
El nitrógeno amoniacal en el fluido ruminal fue mayor ( $p < 0.05$ ) en animales que consumieron kikuyo:lotus que para los que consumieron kikuyo solo (7.95 vs 5.44 mmol/L) (Tabla 4.3). El pH y la producción total de AGVs no fueron diferentes entre tratamientos. La concentración de acetato en el fluido ruminal fue menor y la de propionato y butirato mayor para la dieta kikuyo:lotus que para el kikuyo solo ( $p < 0.05$ ) (76.0 vs 79.4, 15.7 vs 16.7, 4.0 vs 5.9, respectivamente) (Tabla 4.3) La relación acetato:propionato fue mayor ( $p < 0.05$ ) en los animales que consumieron la gramínea pura (5.1 vs 4.6) (Tabla 4.3).

En los corderos que consumían kikuyo:lotus la producción total de metano disminuyó independientemente de la manera expresada (Tabla 4.4). Se observó un efecto residual de la dieta con lotus donde la producción de metano del grupo de animales que previamente habían recibido la dieta asociada fue menor (Figura 4.1).

**Tabla 4.4:** Efecto de la inclusión (30%) de heno de *Lotus uliginosus* a una dieta basal de heno de kikuyo sobre la producción de metano en corderos

Variable	Kikuyo	Kikuyo:Lotus	Tratamiento	Residual
			P<	
g	51.6 <sup>a</sup>	43.1 <sup>b</sup>	*	*
g kg <sup>-1</sup> MS consumida	18.8 <sup>a</sup>	12.2 <sup>b</sup>	*	*
g kg <sup>-1</sup> FDN consumida	26.9 <sup>a</sup>	19.9 <sup>b</sup>	*	*
g kg <sup>-1</sup> MO consumida	21.4 <sup>a</sup>	14.0 <sup>b</sup>	*	*
g kg <sup>-1</sup> MS degradada	33.2 <sup>a</sup>	20.7 <sup>b</sup>	*	*
g kg <sup>-1</sup> FDN degradada	43.5 <sup>a</sup>	33.9 <sup>b</sup>	*	*
g kg <sup>-1</sup> MO degradada	36.1 <sup>a</sup>	23.4 <sup>b</sup>	*	*

<sup>a,b</sup>. Letras diferentes dentro de filas diferencia entre tratamientos. \*  $p < 0.01$



**Figura 4-1:** Efecto de la inclusión de heno de *Lotus uliginosus* sobre las emisiones de metano (g Kg<sup>-1</sup>MO consumida) en ovinos durante los periodos de evaluación

## 4.4 Discusión

El kikuyo es la principal especie utilizada en los sistemas de producción bovina en el trópico alto Colombiano (Carulla *et al.*, 2004). Recientemente se han introducido a esta región la leguminosa *Lotus uliginosus* con excelentes resultados productivos (Castro *et al.*, 2008). Algunos trabajos sugieren que el uso de leguminosas y particularmente leguminosas taníferas pueden reducir la producción de metano por los rumiantes en pastoreo (Waghorn 2008; Woodward *et al.*, 2001). El objetivo del presente experimento evaluó el efecto de la inclusión de heno de lotus en una dieta basal de heno de kikuyo sobre la emisión de metano en ovinos.

En nuestro trabajo la inclusión de 30% de heno de lotus a una dieta basal de kikuyo disminuyó la emisión de metano por unidad de materia seca consumida en ovinos. La emisión de metano por rumiantes alimentados con mezclas que incluyen leguminosas ha presentado respuestas contradictorias. La inclusión de henolaje de trébol a una dieta basal de henolaje de ryegrass aumentó las emisiones de metano por unidad de materia seca consumida en ovinos (Carulla *et al.*, 2005). Otros trabajos encontraron que el aumento en la proporción de trébol a una dieta basal de ryegrass disminuye la emisión

de metano por unidad de materia seca consumida en bovinos (Lee *et al.*, 2004). Estos experimentos presentan algunas diferencias que podrían explicar el comportamiento contradictorio entre estos trabajos. En el trabajo de Carulla *et al.* (2005) la oferta de alimento se restringió a un nivel de 75 g kg<sup>-1</sup> peso metabólico. Por su parte, en el experimento de Lee *et al.* (2004) no se restringió la oferta de forraje.

Algunos trabajos muestran que una mayor oferta de forraje aumenta el consumo de materia seca de los animales (Ribehiro-Filho *et al.*, 2005; Escobar y Carulla *et al.*, 2003) y otros han señalado que uno de los principales efectos de la inclusión de leguminosas a dietas basadas en gramíneas es un aumento en el consumo (McCaughey *et al.*, 1999; Minson, 1990). Varios trabajos señalan que cuando aumentan el consumo y/o la digestibilidad de los forrajes disminuyen las emisiones de metano por unidad de materia seca consumida (Blaxter y Clapperton, 1965).

En nuestro trabajo, las dietas se ofrecieron a voluntad y se determinó el consumo voluntario de los animales durante la primera parte de cada periodo experimental. Posteriormente, la oferta se restringió al 90% del consumo voluntario. A pesar de esta restricción, el consumo de materia seca aumentó como consecuencia de la adición de la leguminosa a la dieta. El mayor consumo en dietas con leguminosas se ha relacionado con el aumento en la velocidad de paso del alimento a través del retículo-rumen, debido a una disminución en la concentración de carbohidratos estructurales (Pinares-Patiño, 2007). Pinares-Patiño *et al.* (2003) reportan una relación inversa entre la tasa de paso y la producción de metano entérico. El aumento en la tasa de paso disminuye el tiempo de permanencia del alimento en el rumen lo cual limita la degradación de nutrientes y la producción de H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> que potencialmente podría producir metano. Sin embargo, en nuestro trabajo la digestibilidad aparente de la MS y de la MO fueron superiores en la dieta con la leguminosa aunque la degradabilidad del FDN fue menor. Un mayor consumo de MS y una mayor digestibilidad implicarían mayores emisiones de metano y no menores como lo observado en este trabajo.

Otras posibles explicaciones de las menores emisiones de metano en la dieta con leguminosa podrían estar relacionadas con los cambios en los patrones de fermentación. En nuestro trabajo, aunque la producción de AGV no presentó diferencias significativas entre tratamientos se observó una mayor concentración ruminal de AGV en los corderos

que recibieron la gramínea pura. Similar comportamiento se observó *in vitro* en mezclas de gramínea y de leguminosa cuando aumentó la proporción de lotus en la mezcla disminuyendo la producción de AGV que se atribuyó a una mayor concentración de proteína en la dieta (Vargas *et al.*, datos sin publicar). Además se observó que la inclusión de heno de lotus aumentó las concentraciones de propionato y butirato y disminuyó las de acetato y la relación acetato:propionato en fluido ruminal (Tabla 4.4.). La formación de metano al igual que la de propionato requiere  $H_2$  para su síntesis y por el contrario en la síntesis de acetato se libera  $H_2$ . En algunos trabajos la emisión de metano entérico y las proporciones molares de propionato en el rumen presentan una relación inversa (Russell 1998). Tanto la formación de metano como la de propionato requieren  $H_2$ , mientras que las proporciones molares acetato y la producción de metano presentan una relación directa debido a que la síntesis de acetato produce  $H_2$  que pueden ser utilizados en la formación de metano (Van Soest, 1994) por lo cual la disminución en la relación acetato:propionato se ha relacionado con una disminución en la producción de metano (Moss *et al.*, 2000). La disminución en la relación acetato:propionato como consecuencia de la adición de una leguminosa a una gramínea ha sido reportada por otros autores en estudios *in vitro* (Stürm *et al.*, 2007). Sin embargo, en otros trabajos *in vitro* (Hess *et al.*, 2003) o *in vivo* (Carulla *et al.*, 2005) no se reportan diferencias.

Las diferencias en los patrones de fermentación se relacionan con la composición de los forrajes consumidos y no con su especie (Lovett *et al.*, 2004). La fermentación de dietas ricas en carbohidratos estructurales resulta en una mayor proporción de acetato (Annison y Anrmstrong 1970). En nuestro estudio, la dieta de solo kikuyo tenía una mayor proporción de carbohidratos estructurales que la que contenía el lotus aunque los consumos de FDN fueron similares (Tabla 4.2.). Así mismo, los carbohidratos estructurales del kikuyo tenían una mayor digestibilidad que los de la mezcla. Murphy *et al.* (1982) reportaron que los productos de la fermentación de un mismo carbohidrato en el rumen pueden ser diferentes cuando se modifican las poblaciones microbiales de acuerdo a las características de la dieta y del ambiente ruminal. En las condiciones de nuestro experimento, dietas ricas en forrajes, las características del ambiente ruminal no fueron muy diferentes, excepto por una mayor proporción de amonio en el fluido ruminal de aquellos animales a los que se les incluyó el heno de lotus, debido a la degradación de una mayor concentración de proteína en la dieta. Por lo cual, consideramos que es

poco probable modificaciones en la dieta debido a los cambios menores en la composición de los carbohidratos de la dieta. Otros factores como la presencia de taninos en el lotus podrían ayudar a explicar estos cambios, pues algunos trabajos han reportado cambios en el perfil de los AGVs debido a la inclusión de taninos (Bhatta *et al.*, 2009).

El *L. uliginosus* es una leguminosa con moderados contenidos de taninos condensados y en nuestro caso la mezcla contenía pequeñas concentraciones de estos compuestos (Tabla 4.1). La inclusión de leguminosas taníferas en la dieta de rumiantes ha sido relacionada con la disminución en las emisiones de metano (Waghorn 2008; Woodward *et al.*, 2004, Woodward *et al.*, 2001). En estudios con animales consumiendo leguminosas taníferas *Lotus corniculatus* y *Hedysarum coronarium*, se han reportado reducciones en las emisiones de metano por unidad de materia seca tanto en ovinos de 18% y como en bovinos entre un 18 y un 23% (Woodward *et al.*, 2004; Waghorn *et al.*, 2002; Woodward *et al.*, 2001). En el presente trabajo, la inclusión de 30% de heno de lotus disminuyó las emisiones de metano por unidad de materia seca consumida en un 35%. Waghorn (2008) sugiere que la presencia de taninos condensados limita la degradación de los nutrientes al afectar su disponibilidad, la actividad enzimática o las poblaciones ruminales disminuyendo la producción de metano. En ensayos *in vitro* observamos una menor digestibilidad del lotus respecto a las otras especies evaluadas (Vargas *et al.*, datos sin publicar), así como una menor digestibilidad de una mezcla de forrajes cuando se aumentaba su inclusión (Vargas *et al.*, datos sin publicar). Sin embargo, en el presente experimento, la digestibilidad de la MS y MO fue mayor en los animales que recibieron la mezcla de kikuyo y lotus por lo cual la menor digestibilidad como consecuencia de la adición de taninos no puede ser la explicación a la menor producción de metano en este experimento. Finalmente, Tavendale *et al.* (2005) sugieren que los taninos condensados del lotus podrían afectar poblaciones metanogénicas específicas y nosotros encontramos que la incubación del lotus *in vitro* disminuía la producción de metano por unidad de gas producido (Tavendale *et al.*, 2005; Vargas *et al.*, datos sin publicar). El efecto inhibitorio de los taninos condensados sobre las poblaciones metanogénicas resulta en un re-direccionamiento de las rutas que utilizan H<sub>2</sub> tales como la síntesis de propionato, reducción de óxidos de nitrógeno y biohidrogenación de lípidos (Moss *et al.*, 2000) o un aumento en la emisión de H<sub>2</sub> en el gas exhalado por los animales (Pinares-Patiño *et al.*, 2011). También se ha sugerido que la presencia de



taninos condensados podría afectar las bacterias celulolíticas (Patra y Saxena, 2010) disminuyendo la degradación de la fracción fibrosa, disminuyendo la producción de acetato y como consecuencia disminuyendo la emisión de metano. En este estudio, la degradación de la porción fibrosa de la dieta disminuyó como consecuencia de la adición de lotus, como también lo hizo la proporción acetato, pero solo encontramos una tendencia a aumentar las proporciones de propionato que explicaría parcialmente las menores emisiones de metano.

En nuestro trabajo se apreció un efecto residual de la inclusión de lotus a las dietas para la mayoría de las variables evaluadas a pesar de haber realizado un periodo de adaptación de 15 días después del cambio de la dieta. Por ejemplo, a pesar que la producción de metano por unidad de materia seca consumida es menor en animales que recibieron la dieta con 30% de heno de lotus, se observó que el consumo de la dieta asociada presenta un efecto residual sobre la producción de metano en aquellos animales alimentados con kikuyo (Figura 4.1). Esta observación indica que la producción de metano es menor en animales que previamente han consumido la dieta asociada. La disminución en la producción de metano posiblemente es debido a un efecto inhibitorio de los taninos sobre algunas poblaciones ruminales, que se mantiene en el tiempo, por lo menos para este experimento, durante 15 días. No se han encontrado trabajos en la literatura donde se evalúe el efecto de los taninos sobre la producción de metano en el tiempo. Sin embargo trabajos realizados con modificadores de la fermentación ruminal, por ejemplo monensinas, presentan una disminución en las emisiones de metano durante dos semanas de administración del producto y posterior recuperación de las emisiones iniciales de metano, debido a procesos de adaptación de la población ruminal (Waghorn *et al.*, 2007). Posiblemente las características de los taninos condensados presentes en el *L. uliginosus* podrían mantener un efecto en el tiempo re direccionando las rutas de fermentación o inhibiendo poblaciones de microorganismos asociados con la producción de metano.

Los resultados de este trabajo sugieren que la adición de *L. uliginosus* podría ser una estrategia válida para disminuir las emisiones de metano en animales que pastorean kikuyo. Esta característica sumada a una mayor producción animal de la mezcla kikuyo lotus reportada por otros autores en el altiplano cundiboyacence (Castro *et al.*, 2008,

León, 2012). Sin embargo, estas propuestas deben ser posteriormente analizadas utilizando la metodología de huella de carbono y ciclo de vida con el fin de determinar de una manera global las emisiones de CO<sub>2eq</sub> al sustituir esta leguminosa en una dieta basal de gramíneas.

## 4.5 Conclusiones

La inclusión de 30% de heno de lotus disminuyó en 35% las emisiones de metano por unidad de materia seca consumida en ovinos. El mayor consumo en animales que recibieron la dieta asociada, acompañado posiblemente por una mayor tasa de pasaje podría explicar la menor producción de metano. Finalmente, la presencia de taninos condensados en el lotus podía afectar algunas poblaciones ruminales explicando la menor degradación de la fracción fibrosa de la dieta, menor proporción de acetato, menor producción de metano y el efecto residual que la dieta asociada sobre la producción de metano en el tiempo.

## 4.6 Agradecimientos

Los autores agradecen a Mauricio Ávila por su colaboración en el desarrollo de los procedimientos de campo y laboratorio de este experimento. Además a los integrantes del grupo de Avicultura y del Laboratorio de Nutrición Animal y Microbiología de Corpoica-Tibaitatá y el Grupo de Investigación en Nutrición Animal (GINA) de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.

## 4.7 Bibliografía

A.O.A.C. (Association of Official Agricultural Chemists). 2005. Official methods of analysis. Washington D.C, USA.

Annisson EF., y Armstrong DG. 1970. En: Physiology of digestion and metabolism in the ruminant. Ed: Phillipson AT. Oriel Press, Ltd. Newcastle, England.

Bhatta R., Uyeno Y., Takenaka A., Yabumoto Y., Nonaka I., Enishi O y Kurihara M. 2009. Defference in the nature of tannins on in vitro ruminal methane and volatile

Bentacourt M. 2001. Efecto de la melaza, ácido fórmico y tiempo de fermentación sobre la ensilabilidad de la *Leucaena Leucocephala*. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

Blaxter KL., y Clapperton JL. 1965. Prediction of the amount of methane produced by ruminants. *British Journal of Nutrition*, 19:511-522.

Carulla JE., Kreuzer M., Machmüller A., y Hess HD. 2005. Supplementation of *Acacia mearnsii* tannin decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. *Australian Journal of Agricultural Research*, 56:961-970.

Carulla J., Cárdenas E., Sánchez N. y Riveros C. 2004. Valor nutricional de los forrajes más usados en los sistemas de producción lechera especializada de la zona andina colombiana. En: *Memorias del V seminario internacional en reproducción y metabolismo en bovinos*. Universidad de Caldas, Manizales.

Castro E., Mojica JE., León JM., Pabón ML., Carulla JE. y Cárdenas EA. 2008. Productividad de pasturas y producción de leche bovina bajo pastoreo de gramínea y gramínea + *Lottus uliginosus* en Mosquera, Colombia. *Rev. Med. Vet. Zoot.* 55:9-21.

Escobar A., y Carulla JE. 2003. Efecto de la oferta forrajera sobre los parámetros productivos y composicionales de la leche en la sabana de Bogotá. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 16(supl): 67.

Hess HD., Monsalve LM., Lascano CE., Carulla JE., Díaz TE. y Kreuzer M. 2003. Supplementation of a tropical grass diet with forage legumes and *Sapindus saponaria* fruits: effects on in vitro ruminal nitrogen turnover and methanogenesis. *Australian Journal of Agricultural Research*, 54: 703-713.

Johnson KA., y Johnson, DE. 1995. Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*, 73: 2483-2492.

Lee JM., Woodward SL., Waghorn GC., y Clark DA. 2004. Methane emissions by dairy cows fed increasing proportions of white clover (*Trifolium repens*) in pasture. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association*, 66: 151-155.

León JM. 2011. Efecto de la incorporación de leguminosas en pasturas de trópica alto sobre el contenido de ácido linoleico conjugado ALC de la leche. Tesis para optar por el título de Magister en Producción Animal. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

Lovett DK., McGilloway D., Bortolozzo A., Hawkins M., Callan J., Flynn B., y O'Mara FP. 2005. In vitro fermentation patterns and methane production as influenced by cultivar and season of harvest of *Lolium perenne* L. *Grass and Forage Science*, 61:9-21.

Lovett DK., Bortolozzo A., Conaghan P., O'Kiely P. y O'Mara FP. 2004. In vitro total and methane gas production as influenced by rate of nitrogen application, season of harvest and perennial ryegrass cultivar. *Grass and Forage Science*, 59:227-232.

Martínez R., Martínez N., y Martínez MV. 2011. Diseño de experimentos en ciencias agropecuarias y biológicas con SAS, SPSS, R y Statistix. Fondo Nacional Universitario. Primera Edición. Bogotá, Colombia.

McCaughey WP., Wittenberg K., y Corrigan D. 1999. Impact of pasture on methane

- production by lactating beef cows. *Canadian Journal of Animal Science*, 79: 221-226.
- Minson DJ. 1990. *Forage in ruminant nutrition*. Academic Press Limited. California, EU.
- Moss A., Jouany JP., y Newbold J. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Annales Zootechnic*, 29: 231-253.
- Murphy MR., Baldwin RL., y Koong LJ. 1982. Estimation of stoichiometric parameters for rumen fermentation of roughage and concentrate diets. *Journal of Animal Science*, 55: 411-421.
- Murray PJ., Chadwick DC., Newbold CJ., y Lockyer DR. 2007. Measurement of methane from grazing animals - the tunnel method. In: H. P. S. Makkar and P. E. Vercoe (eds), *Measuring Methane Production from Ruminants*. IAEA. 105 -109.
- Parra DM., y Avila MJ. 2010. Determinación de los parámetros fisiológicos y dinámica ruminal de bovinos en condiciones de poli-túnel para evaluar emisiones de metano en trópico alto y bajo colombiano. Tesis para optar por el grado de Zootecnista. Programa de Zootecnia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Cundinamarca. Fusagasugá, Cundinamarca.
- Patra AK., y Saxena J. 2010. Review: A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*, 71: 1198-1222.
- Pinares-Patiño CS., McEwan JC., Dodds KG., Cardenas EA., Hegarty RS., Koolaard JP., y Clark H. 2011. Repeatability of methane emissions from sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 166: 210-218.
- Pinares-Patiño CS., Waghorn GC., Machmüller A., Vlaming B., Molano G., Cavanagh A y Clark H. 2007. Methane emissions and digestive physiology of non-lactating dairy cows fed pasture forages. *Canadian Journal of Animal Science*, 87: 601-613.
- Pinares-Patiño CS., Ulyatt MJ., Lassey KR., Barry TN., y Holmes CW. 2003. Rumen function and digestion parameters associated with differences between sheep in methane emissions when fed chaffed Lucerne hay. *Journal of Agricultural Science*, 140: 205-214.
- Ribeiro-Filho HMN., Delagarde R., y Peyraud JL. 2005. Herbage intake and milk yield of dairy cows grazing perennial ryegrass swards or white clover/perennial ryegrass swards at low and medium herbage allowance. *Animal Feed Science and Technology*, 119: 13-27.
- Russell JB. 1998. The importance of pH in the regulation of ruminal acetate propionate ratio and methane production *in vitro*. *Journal of Dairy Science*, 81: 3222-3230.
- SAS (Statistical Analysis System). 2003. Online Doc 9.1.3. Cary, USA: SAS Institute Inc.
- Stürm CD., Tiemann TT., Lascano CE., Kreuzer M., y Hess HD. 2007. Nutrient composition and *in vitro* ruminal fermentation of tropical legume mixtures with contrasting tannin contents. *Animal Feed Science and Technology*, 138: 29-46.

Tavendale MH., Meagher L., Pacheco D., Walker N., Attwood GT., y Sivakumaran S. 2005. Methane production from in vitro rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. *Animal Feed Science and Technology*, 123-124: 403-419.

Terrill TH., Rowan AM., Douglas GB., y Barry TN. 1992. Determination of extractable and bound condensed tannin concentration in forage plants, protein concentrated meals and cereal grains. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 58:321-329.

Tiemann TT., Lascano CE., Wettstein HR., Mayer AC., Kreuzer M., y Hess HD. 2008. Effect of the tropical tannin-rich shrub legumes *Calliandra calothyrsus* and *Flemingia macrophylla* on methane emission and nitrogen and energy balance in growing labs. *Anim*, 2: 790-799.

Van Soest P. 1994. *Nutritional ecology of the ruminant*. 2 edition. Cornell University Press. USA.

Van Soest P., Robertson., y Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral fiber and starch polysaccharides in relation to nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74: 3583-3597

Waghorn G. 2008. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production-Progress and challenges. *Animal Feed Science and Technology*, 147:116-139.

Waghor G., Clark H., Taufa V., y Cavanagh A. 2007. Monensin controlled release capsules for improved production and mitigating methane in dairy cows fed pasture. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, 67: 266-271.

Waghorn GC., Tavendale MH. Y Woodfield DR. 2002. Methanogenesis from forages fed to sheep. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association*, 64: 167-171.

Woodward, SL., Waghorn, GC., y Laboyrie, PG. 2004. Condensed tannins in birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) reduce methane emissions from dairy cows. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, 64: 160-164.

Woodward SL., Waghorn GC., Ulyatt MJ., y Lassey KR. 2001. Early indications that feeding *Lotus* will reduce methane emissions form ruminants. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, 61: 23-26.



## 5. Discusión general

En Colombia los sistemas ganaderos soportados en pasturas son predominantes a lo largo del territorio nacional, es reconocida su importancia debido a la generación de empleo, dinamismo de la economía, soporte de la seguridad alimenticia. Sin embargo, se considera que contribuyen de manera importante a las emisiones de gases efecto invernadero (GEI). La producción de metano entérico constituye una quinta parte de las emisiones de GEI nacionales (Cabrera *et al.*, 2010).

Johnson y Johnson (1995) sugieren que la producción de metano representa una pérdida energética para el rumiante que varía entre 4 y 8% de la energía bruta consumida. Las características de la dieta, la inclusión de concentrados, la presencia de compuestos secundarios y los compuestos modificadores (ionoforos) de las poblaciones ruminales explican las variaciones en las emisiones de metano. Lovett *et al.* (2004) proponen que las emisiones de metano entérico proveniente de rumiantes en pastoreo pueden ser moduladas a través de la modificación de las características de la pradera (especie, madurez, asociación gramínea leguminosa). Por lo tanto, una de las herramientas de manejo que tiene el productor asociadas al pastoreo para la reducción de las emisiones de metano estaría relacionada a la edad de cosecha de la pastura o las especies que se plantan.

En este trabajo se hicieron tres experimentos para evaluar el efecto de algunas características de la pradera sobre las emisiones de metano. En los primeros dos experimentos se evaluó el efecto de la especie forrajera, la madurez y la relación gramínea:leguminosa sobre la producción de metano *in vitro*. El tercer experimento evaluó el efecto de la inclusión de lotus a una dieta basal de kikuyo sobre la producción de metano *in vivo*. Es importante reconocer que las unidades con las cuales se realizó la comparación de las herramientas de manejo deben mejorar la eficiencia del sistema sin detrimento de la digestibilidad; es por esto que la producción *in vitro* de metano por

unidad de materia orgánica degradada ( $\text{ml g}^{-1}$  materia orgánica degradada, CHMOd) y la emisión de metano por materia seca consumida ( $\text{g kg}^{-1}$  materia seca consumida, CHMSc) *in vivo*, son las unidades de comparación que fueron utilizadas en el presente trabajo.

Los resultados de nuestro trabajo sugerirían que forrajes más jóvenes producen menos metano por unidad de MO degradada. Los aspectos más relevantes que explicaron esta disminución estuvieron asociados a un aumento en las concentraciones de proteína en los forrajes jóvenes y una menor concentración en los carbohidratos totales. Estas relaciones entre carbohidratos totales y proteína también explicaron parcialmente las diferencias en producción de metano entre especies. Sin embargo, para el lotus se evidenció una menor producción de metano (35%) al compararla con las demás especies que no pudo ser explicado por cambios en su composición nutricional. Para esta especie, la menor producción de metano estuvo asociada a cambios en las proporciones de metano por unidad de gas producido lo cual lo cual indicaría cambios en las rutas metabólicas de la producción de metano o posiblemente un efecto sobre poblaciones metanogénicas (Tavendale *et al.*, 2005). La disminución en la producción de metano por MO degradada observada *in vitro* en el primer ensayo para el lotus se evidenció también cuando esta especie se mezcló con ryegrass *in vitro* o con kikuyo *in vivo*. Para el caso de la mezcla de lotus y kikuyo *in vitro*, el aumento de lotus en la mezcla no evidenció una disminución de las concentraciones de metano. No es claro porque en el ensayo con mezcla de kikuyo y lotus no se presentaron disminuciones en la producción de metano *in vitro* mientras si se presentó una clara diferencia *in vivo* (35%) y cuando se incubo solo. Hay claras diferencias entre los ensayos *in vivo* e *in vitro* y en nuestro ensayo *in vivo* hubo mayores consumos de materia seca cuando se incluyó la leguminosa en la dieta. Incrementos en el consumo han sido asociados a disminuciones en la producción de metano por unidad de MO digerida por lo cual parte de las diferencias podrían explicarse por estos cambios (Lee *et al.*, 2004).

En la literatura, las diferencias en las emisiones de metano asociadas a la madurez han sido atribuidas a una mayor concentración de carbohidratos estructurales que producen fermentaciones con mayores proporciones de acetato y menores de propionato (Martin *et al.*, 2009). Van Nevel y Demeyer (1996) han sugerido que en la formación de acetato se libera moléculas de hidrógeno, las cuales son empleadas en la reducción del dióxido de carbono a metano por los microorganismos metanogénicos mientras que la síntesis de



propionato compite con la producción de metano al utilizar hidrógenos. En nuestro primer experimento, el aumento en la producción de gas y de metano con la madurez se asoció a una mayor degradación de carbohidratos totales, coincidente con lo sugerido por Sniffen *et al.* (1992) para sistemas *in vitro*. En el segundo experimento, las disminuciones de metano se asociaron a relaciones entre la concentración de proteína y la digestibilidad de la MS en las mezclas. Blümmel *et al.*, (1997) sugieren que la síntesis de proteína microbial podría explicar la disminución en la producción de AGVs, de gas y de metano. Los hallazgos de estos dos experimentos sugerirían que las diferencias en las emisiones de metano debido a la especie estarían determinadas por su composición nutricional que está determinada por su genética y el estado de madurez.

En el caso particular del Lotus otros aspectos como los taninos podrían explicar diferencias adicionales en la producción de metano. La inclusión de leguminosas taníferas en la alimentación animal se ha asociado con una reducción en la producción de metano entérico. Waghorn (2008) menciona que concentraciones de taninos condensados menores al 5% podrían disminuir las emisiones de metano sin afectar la digestibilidad de la dieta ni el consumo animal y en estudios *in vivo* se reporta que la inclusión de forrajes con taninos disminuye las emisiones de metano (Waghorn *et al.*, 2002; Woodward *et al.*, 2001), similar a lo observado en nuestro estudio *in vivo*.

Por último, el uso de leguminosas para disminuir las emisiones de metano ha sido estudiada *in vivo* y algunos autores han reportado una disminución en la emisión de metano entérico atribuido a un mayor consumo de materia seca, menor concentración de carbohidratos estructurales y aumento en la tasas de paso, resultando en una menor degradación de la dieta (Pinares-Patiño *et al.*, 2003; Beauchemin *et al.*, 2008; Eckard *et al.*, 2010). Otros trabajos no han reportado diferencias en la producción de metano cuando se incluye una leguminosa en una dieta basal de gramínea (Beever *et al.*, 1985, Van Doland, 2007) o un aumento en las emisiones de metano (Carulla *et al.*, 2005, McCaughey *et al.*, 1999). Al parecer dichas diferencias estarían asociadas a las calidades de la gramínea y la leguminosa. Con forrajes de buena calidad la adición de la leguminosa disminuiría las emisiones de metano mientras que con forrajes de baja calidad de esta podría aumentar las emisiones de metano como lo reporta Tiemann *et al.* (2008). Estos resultados sugieren que puede presentarse un comportamiento diferencial entre asociaciones gramínea:leguminosa que es necesario reconocer, además de

desarrollar experimentación *in vivo* para determinar si estas diferencias son válidas en modelos animales.

## 5.1 Bibliografía

Beauchemin, KA., Kreuzer, M., O'mara, F. and McAllister, TA. 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Aust J Exp Agri*, 48: 21-27.

Beever, DE., Thomson, DJ., Ulyatt, MJ., Cammell, SB. y Spooner, MC. 1985. The digestion of fresh perennial ryegrass (*Lolium perenne* L. cv. Melle) and white clover (*Trifolium repens* L. Cv. Blanca) by growing cattle fed indoors. *Brit J Nutr*, 54: 763-775.

Blümmel M., Makkar HPS., y Becker K. 1997. In vitro gas production: a technique revisited. *Journal of Animal and Physiology and Animal Nutrition*, 77:24-34

Cabrera M., Duarte M., Gutiérrez MM. y Lozano RJ. 2010. Inventario Nacional de Emisiones de Gases de Efecto Invernadero. En: 2ª Comunicación Nacional ante la Convención Marco de las Naciones Unidas Sobre Cambio Climático. IDEAM. Capítulo 2. Bogotá, Colombia.

Carulla JE., Kreuzer M., Machmüller A., y Hess HD. 2005. Supplementation of *Acacia mearnsii* tannin decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. *Australian Journal of Agricultural Research*, 56:961-970.

Eckard, RJ., Grainger, C. and De Klein, CAM. 2010. Options for the abatement of methane and nitrous oxide from ruminant production: A review. *LivestSci*, 130: 47-56.

Johnson KA. y Johnson DE. 1995. Methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.* 73: 2483 – 2492.

Lee JM., Woodward SL., Waghorn GC., y Clark DA. 2004. Methane emissions by dairy cows fed increasing proportions of white clover (*Trifolium repens*) in pasture. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association*, 66: 151-155.

Lovett DK., Bortolozzo A., Conaghan P., O'Kiely P. y O'Mara FP. 2004. Vitro total and methane gas production as influenced by rate of nitrogen application, season of harvest and perennial ryegrass cultivar. In *Grass and Forage Science* 59:227-232.

Martin C., Morgavi DP. y Doreau M. 2009. Methane mitigation in ruminants: from microbe to farm scale. *The Animal Consortium* 2009. *Animal* 1-15.

McCaughey, WP., Wittenberg, K. and Corrigan D. 1999. Impact of pasture on methane production by lactating beef cows. *Can J AnimSci*, 79: 221-226.

Pinares-Patiño, CS., Ulyatt, MJ., Lassey, KR., Barry, TN. and Holmes, CW. 2003. Rumen function and digestion parameters associated with differences between sheep in methane emissions when fed chaffed lucerne hay. *J AgrSci*, 140: 205-214.

Sniffen CJ., O'Connor JD., Van Soest PJ., Fox DG., y Russell JB. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *Journal of Animal Science*. 70: 3562-3577.

Tavendale MH., Meagher L., Pacheco D., Walker N., Attwood GT. y Sivakumaran S. 2005. Methane production from in vitro rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. *Animal Feed Science and Technology*, 123-124: 403-419.

Tiemann TT., Ramírez G., Lascano CE., Kreuzer M. y Hess HD. 2008. The ruminal degradability of fibre explains part of the low nutritional value and reduce methanogenesis in highly tanniferous tropical legumes. *J Sci Food Agric* 88:1794-1803.

Van Dorland, HA., Wettstein, HR., Leuenberger, H. and Kreuzer, M. 2007. Effect of supplementation of fresh and ensiled clovers to ryegrass on nitrogen loss and methane emission in dairy cows. *LivSci*, 111:57-69.

Van Nevel CJ. y Demeyer DI. 1996. Control of rumen methanogenesis. *Environmental Monitoring and Assessment* 42:73-97.

Waghorn G. 2008. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production-Progress and challenges. *Animal Feed Science and Technology*, 147:116-139.

WaghornGC.,Tavendale MH. yWoodfield DR. 2002. Methanogenesis from forages fed sheep. *Proceedings of New Zealand Grassland Association* 64:167-171.

Woodward SL., Waghorn GC.,Ulyatt MJ. Y Lassey KR. 2001. Early indications that feeding Lotus will reduce methane emissions form ruminants. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* 61: 23-26.





## 6. Conclusiones y recomendaciones

### 6.1 Conclusiones

El estado fisiológico de los forrajes modificó las emisiones de metano ( $\text{ml g}^{-1}$  materia orgánica degradada). Forrajes más jóvenes produjeron 24% menos metano que intermedios y maduros. La producción de metano por unidad de materia orgánica degradada fue diferente entre especies, el lotus emitió 41% menos metano que el ryegrass y el trébol. Estas diferencias son debidas al aumento en la concentración de carbohidratos estructurales, especialmente una mayor concentración de celulosa, debido a una mayor madurez del forraje. Además, la digestibilidad de los carbohidratos totales se relacionó positivamente con la producción de gas y de metano, sugiriendo que forrajes con mayor proporción de carbohidratos digestibles, producen más gas y metano. La presencia de taninos condensados en el lotus disminuyó las emisiones de metano reduciendo la digestibilidad de la dieta y posiblemente afectando algunas poblaciones ruminales.

El aumento en la inclusión de leguminosas cuando se asociaron con gramíneas presentó un comportamiento diferencial. Cuando se mezcló el kikuyo con el trébol disminuyó la producción de metano debido a un aumento en la digestibilidad, posiblemente debido a un aumento en la síntesis de proteína microbial. Sin embargo la mezcla de trébol y ryegrass no presentó diferencias en la digestibilidad, producción de gas y de metano. Posiblemente la degradación de los carbohidratos y de la proteína en la dieta explique las diferencias entre leguminosas cuando fueron mezcladas con el trébol. La inclusión de una leguminosa tanífera disminuyó la digestibilidad en las mezclas y la proporción de metano en el gas. Posiblemente la presencia de taninos condensados afecten algunas poblaciones de microorganismos en el rumen.

La inclusión de lotus en la dieta de ovinos disminuyó las emisiones de metano en un 35%. Este comportamiento es explicado por la disminución en la concentración de

carbohidratos estructurales de la dieta y aumento en el consumo, lo que podría modificar los patrones de fermentación (aumento en la tasa de paso, disminución de la relación acetato:propionato, disminución en la digestibilidad de la fibra), resultado en una menor producción de metano. Además, la presencia de taninos condensados podría afectar poblaciones metanogénicas disminuyendo la emisión de metano. Es importante destacar el efecto residual de la inclusión de lotus sobre la emisión de metano, abriendo nuevas perspectivas de investigación utilizando esta especie forrajera.

## 6.2 Recomendaciones

- Este trabajo permitió reconocer estrategias de manejo que pueden disminuir las emisiones de metano entérico en sistemas pastoriles, sin embargo es importante confirmar estos resultados con mayor experimentación *in vivo*, además determinar las emisiones de una gran variedad de especies forrajeras presentes en los sistemas de producción bovina en trópico alto y bajo colombiano.
- En futuros ensayos *in vitro* se recomienda determinar la producción de amonio e indicadores de crecimiento microbial que permitan precisar las dinámicas de fermentación.
- Valorar la producción de metano para otras especies forrajeras presentes en trópico alto y bajo colombiano.
- Diseñar ensayos en donde se evalúen superficies de respuesta de asociaciones gramínea:leguminosa, características fisiológicas contrastantes o presencia de metabolitos secundarios que permitan reconocer estrategias que permitan mitigar las emisiones de metano.
- Desarrollar trabajos de investigación tendientes a determinar tiempos de adaptación necesarios para evitar efectos residuales.
- Determinar el posible efecto residual del lotus y su permanencia en el tiempo sobre las poblaciones metanogénicas o variable fisiológicas que puedan afectar las emisiones de metano.
- Se hace necesario reconocer en experimentos *in vivo* variables animales (eficiencia alimenticia, nivel de consumo, tasas de paso, selectividad) y de manejo (oferta forrajera, nivel de fertilización) que puedan mitigar las emisiones de metano en sistemas pastoriles.



- Se hace evidente desarrollar mayor investigación para reconocer las potencialidades de los sistemas de producción ganadero en Colombia para mitigar las emisiones de GEI.
- Finalmente se debe desarrollar trabajos tendientes a determinar de una forma global, a través de la metodología de huella de carbono o ciclo de vida, diferentes estrategias que permitan mitigar las emisiones de GEI provenientes del sector pecuario.

Es necesario confirmar el efecto residual cuando se incorpora lotus sobre la producción de metano (capítulo 4), pudiendo afectar poblaciones metanogénicas específicas o modificando patrones de fermentación que podrían permanecer en el tiempo, permitiendo a futuro desarrollar estrategias de mitigación que permitan ser adoptadas en los sistemas de producción pastoriles.



# Anexos

**A. Anexo:** Supuestos del modelo de bloques completos al azar con estructura factorial 4\*3 de las variables analizadas en el capítulo 2 “Efecto de la madurez del forraje sobre la producción de metano *in vitro* de gramíneas y leguminosas presentes en trópico alto colombiano” <sup>1</sup>

Variable	R <sup>2</sup>	CV	CMc modelo	CMc error	Homogeneidad de varianzas	Normalidad	Independencia	Modelo	Especie	Edad	EdxEs	P<	
pH	68.2	0.8	0.03	0.00	SC	ns	**	*	*	*	*		
Ácidos grasos volátiles													
Total	70.6	20.3	1805.9	153.1	SC	ns	**	*	*	ns	ns		
Acético	69.4	5.5	58.9	12.3	SC	ns	**	*	**	**	*		
Propiónico	62.6	8.6	12.5	3.4	SC	ns	**	*	ns	**	*		
Butírico	60.5	12.0	4.5	0.9	SC	**	**	*	*	ns	*		
Relación A:P	63.1	14.4	0.7	0.2	SC	ns	ns	*	ns	**	*		
Digestibilidad													
Materia seca	97.6	1.8	279.1	1.4	SC	ns	ns	*	*	*	*		
Fibra detergente neutro	94.2	6.4	1416.9	17.8	SC	*	**	*	*	*	*		
Carbohidratos	96.9	3.8	1065.6	6.9	SC	*	**	*	*	*	*		
Materia orgánica	96.6	2.2	331.1	2.4	SC	ns	ns	*	*	*	*		
Producción de gas													
ml g <sup>-1</sup> MS degradada	80.3	5.8	16730.9	837.5	SC	ns	**	*	*	*	*		
ml g <sup>-1</sup> MO degradada	88.8	5.3	27682.7	712.5	SC	ns	*	*	*	*	*		
Producción de metano													
ml g <sup>-1</sup> MS degradada	76.1	17.5	752.2	80.9	SC	ns	ns	*	*	*	ns		
ml g <sup>-1</sup> MO degradada	76.3	18.0	820.7	87.4	SC	ns	ns	*	*	*	ns		
Relación metano:gas	74.6	14.8	0.0	0.0	SC	0.8	ns	*	*	**	*		

<sup>1</sup>. R<sup>2</sup>, coeficiente de determinación. CV, coeficiente de variación. CMc, cuadrado medio calculado. SC, si cumple. \* p<0,01; \*\* p<0,05; ns: no significativo

**B. Anexo:** Supuestos de bloques completos al azar con estructura factorial 4\*3 de las variables analizadas en el capítulo 3 “Efecto de la asociación gramínea:leguminosa en diferentes proporciones sobre la producción de metano *in vitro*”<sup>1</sup>

Variable	R <sup>2</sup>	CV	CM modelo	CM error	Homogeneidad de varianzas	P<										
						Norm	Inde	Modelo	G	L	P	LxG	GxP	LxP	GxLXP	
pH	97.9	0.6	0.2	0.0	SC	ns	**	*	*	**	ns	ns	ns	ns	ns	
Ácidos grasos volátiles																
Total	94.1	5.6	287.6	8.7	SC	ns	ns	*	*	*	*	*	*	*	*	
Acético	90.3	2.9	72.7	3.8	SC	**	ns	*	*	*	*	*	ns	ns	**	
Propiónico	92.2	6.2	67.9	2.8	SC	ns	ns	*	*	*	*	*	ns	ns	**	
Butírico	64.5	14.4	3.7	1.0	SC	**	ns	*	*	*	**	*	ns	ns	ns	
Relación A:P	88.3	10.5	1.2	0.1	SC	**	ns	*	*	**	*	*	ns	ns	**	
Digestibilidad																
Materia seca	91.5	1.6	25.4	1.1	SC	ns	**	*	*	*	ns	*	*	*	ns	
Fibra detergente neutro	98.2	1.5	100.6	0.9	SC	ns	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
Carbohidratos																
Materia orgánica	91.7	1.4	32.2	1.4	SC	ns	ns	*	*	*	ns	*	*	*	ns	
Producción de gas																
MI	94.3	2.9	22.6	0.7	SC	ns	ns	*	ns	*	ns	ns	*	*	ns	
ml g <sup>-1</sup> MS degradada	93.6	3.6	8732.7	288.1	SC	**	ns	*	**	*	ns	**	*	*	ns	
ml g <sup>-1</sup> MO degradada	91.5	3.4	3920.6	173.4	SC	**	ns	*	*	**	ns	ns	*	*	ns	
Producción de metano																
MI	99.9	0.9	0.8	0.0	SC	ns	ns	*	*	*	*	*	*	*	*	
ml g <sup>-1</sup> MS degradada	99.4	2.2	234.9	1.3	SC	**	ns	*	*	*	*	*	*	ns	**	
ml g <sup>-1</sup> MO degradada	99.5	1.9	134.7	0.6	SC	**	ns	*	*	*	*	*	*	ns	**	
Relación metano:gas	97.2	3.2	0.0	0.0	SC	ns	ns	*	*	*	*	*	**	*	ns	

1. R<sup>2</sup>, coeficiente de determinación. CV, coeficiente de variación. CMc, cuadrado medio calculado. SC, si cumple. \* p<0,01; \*\* p<0,05; ns: no significativo

**C. Anexo:** Comparación del modelo de sobre cambio con y sin estimación del efecto residual en el capítulo 4 “Efecto de la inclusión de heno de lotus grande a una dieta basal de heno de kikuyo sobre la producción de metano en ovinos”

Variable	Efecto residual en el error		Efecto residual en el modelo	
	R <sup>2</sup>	Modelo (p<)	R <sup>2</sup>	Modelo (p<)
<b>Consumo</b>				
Materia seca	76.41	0.173	90.67	0.015
Fibra detergente neutro	65.08	0.543	87.53	0.046
Fibra detergente ácido	75.70	0.192	90.45	0.016
Lignina	96.76	0.000	97.93	0.000
Materia orgánica	75.65	0.194	90.44	0.016
<b>Heces</b>				
Materia seca	54.62	0.837	85.65	0.076
Fibra detergente neutro	66.01	0.511	90.43	0.016
Fibra detergente ácido	68.68	0.417	86.17	0.067
Lignina	81.51	0.068	87.84	0.042
Materia orgánica	57.50	0.772	85.99	0.070
<b>Orina</b>				
Total	73.99	0.241	93.29	0.004
<b>Fermentación ruminal</b>				
pH	77.72	0.141	91.32	0.01
Amonio	58.32	0.751	91.55	0.01
<b>Acido grasos volátiles</b>				
Total	68.27	0.432	82.14	0.16
Acetato	90.44	0.003	94.06	0.00
Propionato	68.02	0.441	80.66	0.20
Butirato	81.98	0.061	86.47	0.06
Relación acetato:propionato	78.93	0.114	85.99	0.07
<b>Digestibilidad</b>				
Materia seca	51.32	0.895	80.59	0.203
Fibra detergente neutro	64.89	0.550	81.64	0.171
Fibra detergente ácido	64.20	0.573	79.72	0.231
Lignina	73.43	0.259	76.23	0.352
Materia orgánica	48.36	0.932	78.76	0.262
<b>Producción de metano</b>				
g	59.94	0.636	95.13	0.048
g kg <sup>-1</sup> MS consumida	54.78	0.739	97.05	0.019
g kg <sup>-1</sup> FDN consumida	47.87	0.848	96.59	0.025
g kg <sup>-1</sup> MO consumida	54.33	0.747	97.02	0.020
g kg <sup>-1</sup> MS degradada	68.67	0.433	97.18	0.018
g kg <sup>-1</sup> FDN degradada	54.22	0.749	96.37	0.028
g kg <sup>-1</sup> MO degradada	65.77	0.503	97.04	0.019

**D. Anexo:** Supuestos del modelo de sobrecambio compuesto de las variables analizadas en el capítulo 4 “Efecto de la inclusión de heno de lotus grande a una dieta basal de heno de kikuyo sobre la producción de metano en ovinos”<sup>1</sup>

Variable	R <sup>2</sup>	CV	CM modelo	CM error	Homogeneidad de varianzas	Normalidad	Modelo	Tartamiento P<	E. residual
Consumo									
Materia seca	90.7	11.2	13891.1	3574.7	SC	**	**	*	*
Fibra detergente neutro	87.5	11.1	4139.0	1474.6	SC	**	**	ns	*
Fibra detergente acido	90.5	11.2	1336.0	352.6	SC	**	**	*	*
Lignina	97.9	12.5	297.2	15.7	SC	ns	*	*	*
Materia orgánica	90.4	11.2	10329.6	2730.7	SC	**	**	*	*
Heces									
Materia seca	85.6	16.6	3402.2	1425.0	SC	**	ns	**	*
Fibra detergente neutro	90.4	14.0	1432.4	379.0	SC	ns	**	**	*
Fibra detergente acido	86.2	19.1	624.6	250.7	SC	*	ns	*	*
Lignina	87.8	23.8	217.7	75.3	SC	**	**	*	**
Materia orgánica	86.0	16.9	2551.2	1039.6	SC	**	ns	*	*
Orina									
Total	93.3	21.8	255356.1	45934.1	SC	**	*	*	*
Fermentación ruminal									
pH	91.3	2.1	0.1	0.0	SC	ns	**	ns	**
Amonio	91.5	18.5	2166.4	499.9	SC	ns	*	*	*
Acido grasos volátiles									
Total	82.1	21.6	137.9	75.0	SC	ns	ns	ns	**
Acetato	94.1	1.5	9.1	1.4	SC	**	*	*	ns
Propionato	80.7	6.4	1.8	1.1	SC	ns	ns	ns	ns
Butirato	86.5	21.8	3.0	1.2	SC	**	ns	*	ns
Relación									
acetato:propionato	86.0	7.7	0.3	0.1	SC	ns	ns	**	**
Digestibilidad									
Materia seca	80.6	7.4	29.6	17.8	SC	**	ns	*	*
Fibra detergente neutro	81.6	6.7	28.6	16.1	SC	*	ns	**	*
Fibra detergente ácido	79.7	10.5	45.0	28.6	SC	ns	ns	**	**
Lignina	76.2	136.0	1376.8	1073.1	SC	*	ns	*	ns
Materia orgánica	78.8	6.9	24.9	16.8	SC	**	ns	ns	*

**Cont. D. Anexo:** Supuestos del modelo de sobrecambio compuesto de las variables analizadas en el capítulo 4 “Efecto de la inclusión de heno de lotus grande a una dieta basal de heno de kikuyo sobre la producción de metano en ovinos”<sup>1</sup>

Variable	R <sup>2</sup>	CV	CM modelo	CM error	Homogeneidad de varianzas	Normalidad	Modelo	Tartamiento P<	E. residual
Producción de metano									
G	95.1	10.6	150.6	25.1	SC	ns	**	*	*
g kg <sup>-1</sup> MS consumida	97.0	14.3	49.9	4.9	SC	**	**	*	*
g kg <sup>-1</sup> FDN consumida	96.6	13.6	88.3	10.1	SC	**	**	*	*
g kg <sup>-1</sup> MO consumida	97.0	14.3	63.9	6.4	SC	**	**	*	*
g kg <sup>-1</sup> MS degradada	97.2	13.3	135.5	12.8	SC	**	**	*	*
g kg <sup>-1</sup> FDN degradada	96.4	12.7	197.4	24.1	SC	ns	**	*	*
g kg <sup>-1</sup> MO degradada	97.0	13.2	155.2	15.4	SC	**	**	*	*

<sup>1</sup>. R<sup>2</sup>, coeficiente de determinación. CV, coeficiente de variación. CMc, cuadrado medio calculado. SC, si cumple. \* p<0,01; \*\* p<0,05; ns: no significativo



