

EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN NITROGENADA SOBRE LA FERMENTACIÓN RUMINAL *IN VITRO* DE FORRAJES DEFICIENTES EN NITRÓGENO¹

EFFECT OF NITROGEN SUPPLEMENTATION ON THE *IN VITRO* RUMEN FERMENTATION OF NITROGEN DEFICIENT FORAGES¹

Carro, M.D., S. López, C. Valdés y M.J. Ranilla

Departamento de Producción Animal I. Universidad de León. 24071 León. España.
E-mail: DP1MCT@UNILEON.ES

PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Producción de gas. Degradabilidad. Ritmo de fermentación. Caseína. Urea.

ADDITIONAL KEYWORDS

Gas production. Degradability. Fermentation rate. Casein. Urea.

RESUMEN

Se estudió el efecto de la suplementación nitrogenada y del tipo de nitrógeno (proteico vs. N no proteico (NNP)) sobre la fermentación ruminal *in vitro* de varios forrajes deficientes en N degradable en el rumen (NDR). Los forrajes (henos de trébol (HT), gramíneas (HG) y de prado permanente (HPP) y brotes de los arbustos *Erica arborea* y *Calluna vulgaris*) se incubaron *in vitro* con líquido ruminal sin tratamiento nitrogenado (control) o añadiéndoles lo necesario para proporcionar 30 g de NDR/kg de materia orgánica degradable en el rumen, en forma de urea (NNP) o de caseína (N proteico). Para cada forraje se incubaron 15 botellas (5 por tratamiento) a 39°C durante 120 horas y se determinaron el ritmo y la producción potencial de gas y de ácidos grasos volátiles (AGV), la desaparición de materia orgánica tras 120 horas de incubación (DMO_{120h}), y la

producción de metano tras 24 horas de incubación. La suplementación con N aumentó ($p < 0,05$) el ritmo de producción de gas y de AGV en todos los forrajes (salvo en HG), pero no afectó ($p > 0,05$) a la producción potencial de gas y AGV ni a la DMO_{120h}. Comparada con la urea, la incubación con caseína aumentó ($p < 0,05$) el ritmo de producción de gas para el HPP, *E. arborea* y *C. vulgaris* y la producción de metano para el HPP y *C. vulgaris*. Se sugiere que la suplementación de forrajes deficientes en NDR con N proteico podría tener un mayor efecto estimulante de la fermentación ruminal *in vitro* que la suplementación con NNP, aunque esto parece depender de las características del forraje.

SUMMARY

The effects of the N supplementation and of the N form (protein vs. non-protein N (NPN)) on the *in vitro* rumen fermentation of several forages

¹Este trabajo ha sido financiado por la C.I.C.Y.T. (Proyecto AGF94-0026) y por la Junta de Castilla y León (Proyecto LE 29/98).

deficient in their rumen degradable N (RDN) content were investigated. Samples of the forages (red clover (HT), mixed grass (HG) and permanent mountain meadow hays (HPP) and bud samples from the browse plants *Erica arborea* and *Calluna vulgaris*) were incubated *in vitro* with ruminal fluid without treatment (control) or supplemented with either casein (protein N) or urea (NPN). A total of 15 bottles were incubated for each forage (5 per treatment) at 39 °C for 120 hours. The production rate and potential production of gas and volatile fatty acids (VFA), the organic matter disappearance after 120 hours of incubation (OMD_{120h}) and the methane production after 24 hours of incubation were determined. The N supplementation increased ($p < 0.05$) the rate of gas and VFA production for all forages (with the exception of HG), but no effect ($p > 0.05$) was found either in the potential production of gas and VFA or in the OMD_{120h}. Compared with urea, the incubation with casein increased ($p < 0.05$) the rate of gas production for HPP, *E. arborea* and *C. vulgaris* and the methane production for HPP and *C. vulgaris*. The results seem to indicate that the supplementation of RDN-deficient forages with protein N may produce a greater stimulation of the *in vitro* ruminal fermentation than the supplementation with NPN, although this effect could depend on the characteristics of the forage.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se han publicado resultados contradictorios sobre la necesidad de N para el crecimiento óptimo de las bacterias ruminales. Bryant (1973) ha señalado que las bacterias que fermentan los hidratos de carbono estructurales (celulolíticas) no pueden utilizar nitrógeno (N) no amoniacal (aminoácidos, péptidos o proteínas), pero se ha observado un aumento del crecimiento de las bacte-

rias que fermentan los hidratos de carbono no estructurales (amilolíticas) al añadir péptidos al líquido ruminal (Russell and Sniffen, 1984). Basándose en estos y otros estudios, el sistema de Cornell (Cornell Net Carbohydrate and Protein System) asume que las bacterias celulolíticas utilizan como única fuente nitrogenada el N amoniacal (Russell *et al.*, 1992). De acuerdo con esta hipótesis, en algunos estudios *in vivo* (Fujimaki *et al.*, 1989) e *in vitro* (Kernick, 1991) no se han encontrado diferencias en el crecimiento microbiano ni en la digestión ruminal debidas a la fuente nitrogenada (N amoniacal vs. N no amoniacal (NNA)). Sin embargo, también se ha observado que la sustitución parcial de N amoniacal por NNA estimuló el crecimiento de las bacterias ruminales *in vivo* (Chikunya *et al.*, 1996) e *in vitro* (Cruz Soto *et al.*, 1994; Carro and Miller, 1999) y produjo un aumento de la degradación de la fibra de la ración *in vivo* (McAllan, 1991) e *in vitro* (Merry *et al.*, 1990; Carro *et al.*, 1999). La composición de las raciones empleadas podría explicar estos resultados contradictorios. Así, Cruz Soto *et al.* (1994) sugieren que la adición de NNA puede estimular el crecimiento microbiano sólo cuando exista simultáneamente una fuente de energía suficiente (hidratos de carbono rápidamente degradables) en las raciones.

Como la celulosa es el componente mayoritario de la pared celular de los forrajes, las bacterias celulolíticas juegan un gran papel en la nutrición de los rumiantes alimentados con raciones forrajeras. Por ello, el conocimiento real de las necesidades nitrogenadas de estas bacterias es básico para la

exactitud de los modelos de predicción del valor nutritivo de los alimentos y para una óptima utilización de los compuestos nitrogenados no proteicos en la alimentación práctica de los rumiantes. El objetivo de este trabajo fue comparar los efectos de una fuente de N amoniacal (urea) y otra de NNA (caseína) sobre la fermentación ruminal *in vitro* de varios forrajes deficientes en N degradable en el rumen (NDR).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se seleccionaron cinco forrajes deficientes en N degradable en el rumen (NDR): heno de gramíneas (HG; mezcla de *Lolium perenne* y *Festuca arundinacea*), heno de trébol (HT; *Trifolium pratense*), heno de prado permanente (HPP) y rebrotes de los arbustos *Calluna vulgaris* y *Erica arborea*. Las muestras de los forrajes habían sido previamente incubadas en el rumen mediante el método *in situ* para determinar su degradabilidad. Aproximadamente 5 g de materia seca (MS) de cada forraje se introdujeron en bolsas de nylon (40 µm de tamaño de poro). Las bolsas se introdujeron en el rumen de tres ovejas que recibían 1,5 kg/día de un heno de buena calidad, y se retiraron después de 3, 6, 9, 15, 24, 48, 72 y 96 horas de permanencia en el rumen. Tras su retirada, las bolsas se lavaron inmediatamente bajo un chorro de agua fría durante dos minutos y se introdujeron en una lavadora automática, en la que se sometieron a un programa de lavado en frío durante 20 minutos. Después, se secaron en una estufa de aire forzado a 60 °C durante 48 horas y se pesaron. Se analizó el

contenido de materia orgánica (MO) y N del residuo. Para la estimación de la desaparición de MO y N en el tiempo 0 se utilizaron dos bolsas de cada uno de los substratos, que se lavaron, pesaron y secaron de la forma indicada. Los datos de desaparición de MO y N se ajustaron al modelo exponencial: $y = a + b(1 - e^{-ct})$ y se calculó la degradabilidad efectiva (DE) de ambas fracciones a partir de la fórmula: $DE = a + (b \times c / c + k)$ asumiendo un valor de ritmo de paso a través del rumen (k) de 0,02 h⁻¹. Se calculó la relación g de NDR/kg de MO degradable en el rumen (g NDR/kg MODR) para cada muestra. La composición de los forrajes y su relación g NDR/kg MODR figuran en la **tabla I**.

Los forrajes se molieron utilizando una malla de 1 mm de paso y se incubaron *in vitro* siguiendo la técnica de Menke y Steingass (1988). Las muestras (200 mg de MS) se incubaron en el interior de botellas de 125 ml de volumen, a las que se añadieron 30 ml de una mezcla de líquido ruminal y del medio de cultivo (1:4; v/v) descrito por Goering y Van Soest (1970), con la excepción de que no se incluyó tripticasa. Como inóculo se utilizó líquido ruminal procedente de tres ovejas con fístula ruminal que recibían 1,5 kg/animal/día de heno de buena calidad. Para favorecer el crecimiento de las bacterias celulolíticas se añadió al inóculo una disolución de los ácidos isobutírico, isovalérico y valérico en concentraciones adecuadas (0,3, 0,9 y 0,7 mM, respectivamente) para no limitar el crecimiento microbiano (Hume, 1970). Además, al medio de incubación se le añadió S (Na₂SO₃) para lograr una relación N:S de 10:1 y prevenir así

Tabla I. Composición química y relación entre el nitrógeno y la materia orgánica degradables en el rumen (g NDR/kg MODR) de los forrajes incubados *in vitro*. (Chemical composition and relationship between the nitrogen and the organic matter degradable in the rumen (g NDR/kg MODR) of the forages incubated *in vitro*).

	HT	HG	HPP	<i>E. arborea</i>	<i>C. vulgaris</i>
Composición química*					
Materia orgánica	938	922	919	980	973
Proteína bruta	113	106	78	49	67
Fibra neutro-detergente	566	618	680	616	583
Fibra ácido-detergente	419	313	380	494	422
Celulosa	302	278	320	344	271
Lignina	117	35	60	150	151
g NDR/kg MODR	26,2	20,6	17,2	14,3	11,0

*(g/kg materia seca); HT: heno de trébol; HG: heno de gramíneas; HPP: heno de prado permanente.

una limitación de la síntesis de aminoácidos azufrados. La preparación del medio de cultivo, su mezcla con el líquido ruminal y el llenado de las botellas se realizaron en condiciones anaerobias (gaseado continuo con CO₂) y se mantuvo una temperatura constante de 39 °C. Las botellas se cerraron con tapones de goma y cápsulas de aluminio introduciéndolas en un incubador a 39 °C durante 120 horas.

Las muestras de los forrajes se incubaron sin ningún tratamiento nitrogenado (*Control*) o añadiéndoles la cantidad necesaria para proporcionar 30 g NDR/kg MODR (ARC, 1980) en forma de urea (*Urea*) o de caseína (*Caseína*). Para calcular la cantidad de N necesaria se asumió que la degradabilidad de la urea y la caseína es del 100 p.100. Para cada forraje se incubaron 15 botellas de 125 ml de volumen, 5 por cada tratamiento. En 3 de las 5 botellas se midió la producción de gas a las 3, 6, 9, 12, 24, 36, 48, 72, 96

y 120 horas utilizando la técnica PTT (Theodorou *et al.*, 1994). En las otras dos se obtuvo una muestra de 1 ml del medio de incubación inmediatamente antes del llenado de las botellas y a las 3, 6, 12, 24, 48, 72 y 120 horas de incubación. Dichas muestras se acidificaron y congelaron para analizar su concentración de ácidos grasos volátiles (AGV). En estas dos botellas se midió la producción de gas tras 24 horas de incubación y se recogió una muestra de 5 ml que se conservó en un vacutainer para analizar su concentración de metano. Los análisis de gas se llevaron a cabo en las 8 horas siguientes a la toma de muestras. El volumen de metano producido (ml) se corrigió para condiciones normales (p=1 atm; T=273°K) y se calculó la producción de metano (mmol/día) en cada botella.

Transcurridas 120 horas de incubación los botes se introdujeron en un baño de hielo para detener la fermentación, se abrieron y su contenido se

vació en crisoles provistos de una placa porosa para filtrarlo. De cada tubo se recogió una muestra (10 ml) del líquido filtrado, se acidificó con 10 ml de HCl (0,5 M) y se congeló para determinar posteriormente su contenido de amoníaco. El residuo se lavó con 50 ml de agua destilada, se secó en estufa a 60 °C durante 48 horas y se pesó para calcular la desaparición de MS. Después se determinó la cantidad de cenizas del residuo y se calculó la desaparición de MO (DMO_{120h}).

Las determinaciones de MS, cenizas y N se realizaron siguiendo las normas de la A.O.A.C. (1995). La fibra neutro-detergente (FND), ácido-detergente (FAD) y lignina de los forrajes se determinaron según Goering y Van Soest (1970). La concentración de N amoniacal se determinó por colorimetría (Wheatherburn, 1967) y las de AGV y metano mediante cromatografía de gases según la metodología descrita por Carro *et al.* (1992).

Los datos de producción de gas se ajustaron al modelo: $y = b (1 - e^{-(c(t-lag))})$ y los de producción de AGV al modelo: $y = b (1 - e^{-(c \cdot t)})$, en los que c representa el ritmo de producción de gas o AGV, b su producción potencial y lag es el tiempo necesario para que comience la producción de gas. Para el ajuste de los datos de producción de AGV, se consideró que la producción en el tiempo 0 era nula y en el resto de los tiempos, se calculó como la diferencia entre la cantidad de AGV (mmol) determinada en cada botella y la que había sido introducida con el medio de incubación. El ajuste de los datos se llevó a cabo utilizando el procedimiento NLIN del paquete estadístico SAS (SAS, 1999). La desaparición

de MO tras 24 h de incubación (DMO_{24h}) se estimó a partir de la DMO_{120h} , del ritmo de producción de gas y de un ritmo de paso (k) de 0,042 h^{-1} de acuerdo con la siguiente fórmula: $DMO_{24h} = DMO_{120h} (c / c + k) e^{(-k \cdot lag)}$.

El efecto del tipo de fuente nitrogenada sobre la fermentación *in vitro* de cada forraje se estudió mediante análisis de varianza (Steel and Torrie, 1981) y se realizaron los siguientes contrastes ortogonales: C1 (*Control vs. Urea y Caseína*) y C2 (*Urea vs. Caseína*). Todos los análisis estadísticos se realizaron con el procedimiento GLM del SAS (SAS, 1999).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las bacterias celulolíticas necesitan AGV de cadena corta ramificada para sintetizar determinados aminoácidos y AGV ramificados de cadena larga (Bryant, 1973), de forma que su carencia en el fluido ruminal podría limitar su crecimiento. En este experimento, se incluyó una solución de los ácidos isobutírico, isovalérico y valérico en el medio de incubación, y como resultado se observaron concentraciones de estos ácidos superiores a las adecuadas para no limitar el crecimiento microbiano (Hume, 1970), en todos los tratamientos y en todos los tiempos de muestreo. Por otra parte, el medio de Goering y Van Soest (1970) se considera adecuado para permitir el óptimo crecimiento de las bacterias ruminales. Se puede considerar que las bacterias ruminales dispusieron de condiciones adecuadas para su crecimiento y, por tanto, que las diferencias registradas únicamente pueden deber-

se al efecto de la suplementación nitrogenada y/o a la forma de ésta (urea vs. caseína).

El efecto de la suplementación nitrogenada sobre los ritmos de producción (*c*) de gas y de AGV, así como sobre su producción potencial (*b*) puede observarse en la **tabla II**. En el ajuste de los datos de producción de gas el valor del parámetro *lag* fue 0 para todos los forrajes y tratamientos, por lo cual no se ha incluido en la tabla. La suplementación nitrogenada produjo un aumento ($p < 0,05$) del ritmo de producción de gas y de AGV en todos los forrajes, excepto en el HG. La suplementación con caseína produjo un mayor ritmo de producción de gas que la suplementación con urea en el caso del HPP ($p < 0,05$) *E. arborea* ($p < 0,01$) y *C. vulgaris* ($p < 0,01$), pero no se detectaron diferencias ($p > 0,05$) en este sentido en los henos HT y HG. En las incubaciones *in vitro* con líquido ruminal, el gas producido procede directamente del metabolismo microbiano e, indirectamente, de la reacción de los productos finales de dicho metabolismo con las sales bicarbonato del medio de cultivo (Blümmel and Ørskov, 1993). La cantidad de gas producido refleja la cantidad de substrato fermentado y las rutas del metabolismo microbiano (Blümmel and Ørskov, 1993). Por ello, el aumento del ritmo de producción de gas observado cuando los forrajes se incubaron en presencia de una fuente nitrogenada podría interpretarse como una consecuencia del aumento del ritmo de degradación de los mismos.

La existencia de diferencias significativas debidas al tipo de fuente nitrogenada indicaría que la caseína

produjo una mayor estimulación de la fermentación ruminal que la incubación con urea en tres de los forrajes (HPP, *E. arborea* y *C. vulgaris*), hecho que también se refleja en la tendencia ($p < 0,10$) a un mayor ritmo de producción de AGV observada cuando las muestras de HPP y *C. vulgaris* se incubaron con caseína. De acuerdo con estos resultados, otros autores han señalado aumentos en la producción de AGV y en la digestibilidad de la FAD al reemplazar parcialmente una fuente de N amoniacal (urea) por proteína de soja (Griswold *et al.*, 1996) o harina de pescado (Merry *et al.*, 1990) en fermentadores que recibían raciones compuestas por forraje y concentrado. Carro y Miller (1999) también observaron que la producción de AGV y la digestibilidad de la FAD aumentaron 1,3 y 1,1 veces, respectivamente, al sustituir N amoniacal (NH_4Cl) por proteína de soja en un fermentador semicontinuo (Rusitec). Estos resultados podrían deberse a que la disponibilidad de N proteico provoca una estimulación del crecimiento microbiano, como se ha observado en experimentos *in vivo* (Chikunya *et al.*, 1996) e *in vitro* (Molina-Alcaide *et al.*, 1996; Carro and Miller, 1999).

Sin embargo, ni la suplementación nitrogenada ni el tipo de ésta produjeron un efecto significativo ($p > 0,05$) en la producción potencial (*b*) de gas o de AGV en ninguno de los forrajes incubados. El parámetro *b* representa la producción de gas o de AGV que se alcanzaría si las muestras se incubaran durante un tiempo infinito y por ello, no es comparable a las condiciones fermentativas *in vivo*, en las que los forrajes permanecen un tiempo limita-

FERMENTACIÓN *IN VITRO* DE FORRAJES Y SUPLEMENTACIÓN NITROGENADA

Tabla II. Parámetros cinéticos (ritmo de producción (c) y producción potencial (b)) de gas y ácidos grasos volátiles (AGV) para los forrajes incubados *in vitro* (120 horas) con líquido ruminal sin suplementar (control) o suplementados con urea o caseína. (Kinetic parameters (rate of production (c) and potential production (b)) of gas and volatile fatty acids (AGV) for the forages incubated *in vitro* (120 hours) with rumen fluid unsupplemented (control) or supplemented with urea or casein).

	HT	HG	HPP	<i>E. arborea</i>	<i>C. vulgaris</i>
Parámetros de producción de gas					
<i>c</i> (p.100 h ⁻¹)					
<i>Control</i>	5,94	3,86	1,79	4,60	3,76
<i>Urea</i>	7,37	4,26	1,95	7,25	4,26
<i>Caseína</i>	7,50	3,99	2,55	11,25	5,76
e.e.d. ¹	0,153	0,183	0,170	0,732	0,402
C1 ²	***	NS	*	**	*
C2 ²	NS	NS	*	**	**
<i>b</i> (ml)					
<i>Control</i>	48,7	61,4	55,9	13,0	23,6
<i>Urea</i>	49,2	61,9	54,7	14,5	26,6
<i>Caseína</i>	49,4	62,1	51,7	13,8	25,3
e.e.d. ¹	0,87	0,96	1,83	1,17	1,26
C1 ²	NS	NS	NS	NS	NS
C2 ²	NS	NS	NS	NS	NS
Parámetros de producción de AGV					
<i>c</i> (p.100 h ⁻¹)					
<i>Control</i>	25,6	16,7	14,3	39,7	25,6
<i>Urea</i>	29,4	16,9	18,7	41,7	28,7
<i>Caseína</i>	28,8	17,1	22,4	43,4	33,6
e.e.d. ¹	0,00	0,01	0,02	0,01	0,05
C1 ²	*	NS	*	*	*
C2 ²	NS	NS	NS†	NS	NS†
<i>b</i> (mmol)					
<i>Control</i>	1,72	1,89	1,87	1,12	1,27
<i>Urea</i>	1,75	1,96	1,86	1,14	1,37
<i>Caseína</i>	1,77	1,98	1,85	1,17	1,36
e.e.d. ¹	0,019	0,062	0,076	0,014	0,032
C1 ²	NS	NS	NS	NS	*
C2 ²	NS	NS	NS	NS	NS

HT: heno de trébol; HG: heno de gramíneas; HPP: heno de prado permanente.

¹e.e.d.: error estándar de la diferencia.

²Significación estadística (p) de los contrastes C1: *Control vs Urea y Caseína*; C2: *Urea vs Caseína*; NS: p>0,05; †: p<0,10; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

do en el rumen. El estudio de los efectos de la suplementación nitrogenada en tiempos cortos de incubación (p.e. 24 horas) podría aportar información más real y más directamente extrapolable a las condiciones *in vivo*, al menos teóricamente y siempre considerando las limitaciones que presentan los sistemas *in vitro*.

En la **tabla III** figuran los valores medios de la producción de metano y de AGV, la relación acético/propiónico (Ac/Pr) y la DMO_{24h} tras 24 horas de incubación *in vitro* para cada uno de los forrajes. La suplementación nitrogenada produjo un aumento ($p < 0,05$) de la producción de metano en todos los forrajes excepto en el HT, en el que no se detectaron diferencias significativas ($p > 0,05$). Este hecho se corresponde con la mayor producción de AGV observada cuando los henos HG y HPP ($p < 0,10$) y las muestras de *E. arborea* y *C. vulgaris* ($p < 0,05$) se incubaron en presencia de una fuente de N suplementaria. Asimismo, la suplementación nitrogenada produjo un aumento de la relación Ac/Pr para el HG ($p < 0,05$), el HPP ($p < 0,10$), *E. arborea* ($p < 0,10$) y *C. vulgaris* ($p < 0,05$). Por otra parte, la DMO_{24h} (estimada a partir del ritmo de producción de gas y de la DMO_{120h}) de todos los forrajes aumentó ($p < 0,05$) cuando se incubaron en presencia de una fuente de N suplementaria. La mayor producción de AGV y el aumento de la relación Ac/Pr observados en cuatro de los forrajes incubados como consecuencia de la suplementación nitrogenada pueden considerarse un reflejo del aumento producido en la degradación de la pared celular (fibra) de los forrajes (Czerkawski, 1986), ya que el

contenido celular es completamente degradable (Van Soest, 1994). Por otra parte, cuando la producción de metano se expresó en relación a la producción de AGV (mmol metano/mmol AGV) se obtuvieron valores que oscilaron entre 0,23 y 0,27 para todos los forrajes, salvo *E. arborea* que presentó un valor medio de 0,18. Estos valores están dentro del rango normal señalado por Czerkawski (1986) para la fermentación de los forrajes, por lo que puede considerarse que las fermentaciones *in vitro*, de este experimento pueden considerarse condiciones *normales* de fermentación ruminal. El valor anormalmente bajo obtenido para *E. arborea* puede ser debido a la escasa calidad nutritiva de este forraje, que presentó los valores más bajos de degradabilidad, tanto de la DE de la MO determinada *in situ* como de la DMO_{120h} determinada *in vitro*. La ausencia de efecto de la suplementación nitrogenada sobre las producciones de metano y de AGV en el caso del HT podría justificarse por dos razones. Por una parte, el HT es el forraje que presentó una menor deficiencia en NDR (**tabla II**) y es posible que el N aportado con el inóculo ruminal (N amoniacal, péptidos, etc.) haya subsanado esta deficiencia. Por otra, el valor de 30 g NDR/kg MODR, señalado por el ARC (1980), es considerado por algunos autores como un valor excesivamente elevado, y es posible que valores inferiores permitan un óptimo crecimiento microbiano ruminal. No obstante, resulta paradójico que la suplementación nitrogenada provocase un aumento significativo del ritmo de producción de gas y de AGV en el HT, como se indicó anteriormente.

FERMENTACIÓN *IN VITRO* DE FORRAJES Y SUPLEMENTACIÓN NITROGENADA

En cuanto al efecto del tipo de suplementación nitrogenada, no se detectaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre la caseína y la urea en ninguno de los parámetros determinados tras 24 horas de incubación para

Tabla III. Producción de metano y de ácidos grasos volátiles (AGV), relación acético/propiónico (Ac/Pr) y desaparición de materia orgánica (DMO_{24h}) para los forrajes incubados *in vitro* (24 horas) con líquido ruminal sin suplementar (control) o suplementados con urea o caseína. (Methane and volatile fatty acids (AGV) productions, acetate/propionate (Ac/Pr) ratio and organic matter disappearance (DMO_{24h}) for the forages incubated *in vitro* (24 hours) with rumen fluid unsupplemented (control) or supplemented with urea or casein).

	HT	HG	HPP	<i>E. arborea</i>	<i>C. vulgaris</i>
Metano (mmol)					
<i>Control</i>	0,390	0,457	0,311	0,181	0,245
<i>Urea</i>	0,396	0,463	0,327	0,214	0,288
<i>Caseína</i>	0,400	0,472	0,341	0,223	0,308
e.e.d. ¹	0,0599	0,0046	0,0045	0,0073	0,0049
C1 ²	NS	*	***	***	***
C2 ²	NS	NS	*	NS	**
AGV (mmol)					
<i>Control</i>	1,64	1,69	1,29	1,09	1,22
<i>Urea</i>	1,68	1,73	1,37	1,14	1,23
<i>Caseína</i>	1,68	1,78	1,45	1,22	1,31
e.e.d. ¹	0,023	0,034	0,052	0,019	0,012
C1 ²	NS	NS†	NS†	*	*
C2 ²	NS	NS	NS	*	**
Ac/Pr (mol/mol)					
<i>Control</i>	4,22	3,75	4,27	4,86	4,83
<i>Urea</i>	4,37	3,82	4,48	5,13	4,97
<i>Caseína</i>	4,27	3,91	4,62	4,99	4,92
e.e.d. ¹	0,063	0,027	0,120	0,095	0,032
C1 ²	NS	*	NS†	NS†	*
C2 ²	NS	NS	NS	NS	NS
DMO_{24h} (p.100)					
<i>Control</i>	26,0	29,4	13,4	8,0	9,0
<i>Urea</i>	27,8	31,0	14,5	10,9	10,1
<i>Caseína</i>	28,1	31,3	17,3	12,4	11,5
e.e.d. ¹	0,74	0,63	1,17	1,49	0,57
C1 ²	*	*	*	*	*
C2 ²	NS	NS	NS†	NS	*

HT: heno de trébol; HG: heno de gramíneas; HPP: heno de prado permanente.

¹e.e.d.: error estándar de la diferencia

²Significación estadística (p) de los contrastes C1: *Control vs Urea y Caseína*; C2: *Urea vs Caseína*; NS: $p > 0,05$; †: $p < 0,10$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

los forrajes HT y HG. Comparada con la suplementación con urea, la incubación con caseína produjo un aumento de la producción de metano ($p < 0,05$) y de la DMO_{24h} ($p < 0,10$) para el HPP y *C. vulgaris*, así como un aumento de la producción de AGV ($p < 0,05$) para *E. arborea* y *C. vulgaris*. Estos resultados concuerdan con los expuestos previamente para el ritmo de producción de gas y de AGV (**tabla II**), ya que el efecto positivo de la caseína sobre estos parámetros se manifestó únicamente en los forrajes HPP, *C. vulgaris* y *E. arborea*. Estos resultados indicarían que la suplementación de algunos forrajes deficientes en NDR con una fuente de N proteico (caseína) produciría una mayor estimulación de la fermentación ruminal que la utilización de N no proteico (urea).

La DMO_{120h} no se vio afectada ($p > 0,05$) ni por la suplementación nitrogenada ni por el tipo de ésta en ninguno de los forrajes incubados (**tabla IV**). Estos resultados contrastan con los obtenidos para tiempos de incubación más cortos (24 horas), pero para su correcta interpretación hay que tener en cuenta que la DMO_{120h} determinada en este experimento es una desaparición aparente, es decir, que el residuo de la incubación está formado por el residuo de forraje no degradado y por la masa microbiana asociada al mismo. Si alguno de los tratamientos provocó mayor crecimiento microbiano y por ello mayor degradación del forraje, es posible que los efectos se hayan compensado y no se observaron diferencias significativas en la DMO_{120h} .

Como era de esperar, la suplementación nitrogenada aumentó ($p < 0,05$)

la concentración de amoníaco en el medio de incubación en todos los forrajes (**tabla IV**) aunque en ninguno existieron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre la caseína y la urea. Ello

Tabla IV. Desaparición de materia orgánica (DMO_{120h}) y concentración de N amoniacal ($N-NH_3$) en el medio de incubación para los forrajes incubados in vitro (120 horas) con líquido ruminal sin suplementar (control) o suplementados con urea o caseína. (Organic matter disappearance (DMO_{120h}) and ammonia nitrogen ($N-NH_3$) concentration in the incubation medium for the forages incubated in vitro (120 hours) with rumen fluid unsupplemented (control) or supplemented with urea or casein).

	HT	HG	HPP	E.	C.
	<i>arboreavulgaris</i>				
DMO_{120h} (p.100)					
Control	44,2	61,8	44,7	15,9	19,0
Urea	43,5	61,9	45,5	17,1	20,2
Caseína	43,8	61,6	45,8	16,5	19,8
e.e.d. ¹	1,20	1,90	2,70	3,25	1,29
C1 ²	NS	NS	NS	NS	NS
C2 ²	NS	NS	NS	NS	NS
N-NH ₃ (mg/100 ml)					
Control	56,6	53,9	50,1	39,0	46,3
Urea	60,3	56,2	54,2	50,1	53,3
Caseína	57,8	57,0	53,2	47,9	49,2
e.e.d. ¹	1,29	1,32	0,92	2,52	2,33
C1 ²	*	*	**	**	*
C2 ²	NS	NS	NS	NS	NS

HT: heno de trébol; HG: heno de gramíneas; HPP: heno de prado permanente.

¹e.e.d.: error estándar de la diferencia

²Significación estadística (P) de los contrastes C1: Control vs Urea y Caseína; C2: Urea vs Caseína; NS: $p > 0,05$; †: $p < 0,10$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

podría indicar una degradación de la caseína, pero también hay que considerar que el amoníaco producido tras 120 horas de incubación proviene en gran parte de la degradación de las estructuras nitrogenadas microbianas. En cualquier caso, las concentraciones de amoníaco fueron siempre superiores a los 20 mg/100 ml señalados por Mehrez *et al.* (1977) como valor óptimo para permitir el máximo ritmo de degradación de la MO. Por otra parte, Russell *et al.* (1983) llevaron a cabo incubaciones con líquido ruminal a dos concentraciones de amoníaco, 18,3 y 68,6 mg/100 ml, para estudiar si concentraciones altas de amoníaco podían ser tóxicas para las bacterias ruminales, y no encontraron diferencias debidas a la concentración de amoníaco en la síntesis de proteína microbiana ni en la

utilización de la caseína por las bacterias ruminales, por lo que puede asumirse que los altos valores de concentración de amoníaco observados en nuestro experimento no resultaron tóxicos para las bacterias ruminales.

Los resultados de este trabajo indican que la suplementación nitrogenada de forrajes deficientes en NDR, produjo un efecto estimulante de su fermentación *in vitro*. Este efecto fue superior cuando los microorganismos ruminales dispusieron de una fuente de N proteico (caseína) que cuando los forrajes se suplementaron con N no proteico (urea). Sin embargo, esta diferencia sólo se apreció en algunos de los forrajes incubados *in vitro*, lo que sugiere que el efecto de la fuente nitrogenada podría depender del tipo de substrato incubado.

BIBLIOGRAFÍA

- AOAC. 1995. *Official methods for analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, 16th ed., Cap. 4, pp. 1-45. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC.
- ARC. 1980. *The Nutrient Requirements of Ruminant Livestock*. Technical Review by an Agricultural Research Council Working Party. CAB, Farnham Royal, England.
- Blümmel, M. and E.R. Ørskov. 1993. Comparison of *in vitro* gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 40: 109-119.
- Bryant, M.P. 1973. Nutritional requirements of the predominant rumen cellulolytic bacteria. *Fed. Proc.*, 32: 1809-1813.
- Carro, M.D. and E.L. Miller. 1999. Effect of supplementing a fibre basal diet with different nitrogen forms on ruminal fermentation and microbial growth in an *in vitro* semi-continuous culture system (RUSITEC). *Br. J. Nutr.*, 82: 149-157.
- Carro, M.D., P. Lebzién and K. Rohr. 1992. Influence of yeast culture on the *in vitro* fermentation (Rusitec) of diets containing variable portions of concentrates. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 37: 209-220.
- Carro, M.D., S. López, C. Valdés and J.S. González. 1999. Effect of nitrogen form (casein and urea) on the *in vitro* degradation of cell walls from six forages. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 81: 212-222.
- Chikunya, S., C.J. Newbold, L. Rode, X.B. Chen, and J. Wallace. 1996. Influence of dietary rumen-degradable protein on bacterial growth in the rumen of sheep receiving different energy sources. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 63: 333-340.

- Cruz Soto, R., A. Muhammed Samirah, C.J. Newbold, C.S. Stewart and J. Wallace. 1994. Influence of peptides, amino acids and urea on microbial activity in the rumen of sheep receiving grass hay and on the growth of rumen bacteria *in vitro*. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 49: 151-161.
- Czerkawski, J.W. 1986. *An Introduction to Rumen Studies*. Pergamon Press, Oxford.
- Fujimaki, T., M. Kobayashi, M. Wakita and S. Hoshino. 1989. Influence of amino acid supplement on cellulolysis and microbial yield in sheep rumen. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 62: 119-124.
- Goering, M.K. and P.J. Van Soest. 1970. *Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications)*. *Agricultural Handbook, n° 379*. Agricultural Research Services, USDA. Washington D.C. USA.
- Griswold, K.E., W.H. Hoover, T.K. Miller and W.V. Thayne. 1996. Effect of form of nitrogen on growth of ruminal microbes in continuous culture. *J. Anim. Sci.*, 74: 483-491.
- Hume, I.D. 1970. Synthesis of microbial protein in the rumen. II. A response to higher volatile fatty acids. *Austr. J. Agric. Res.*, 21: 297-304.
- Kernick, B.L. 1991. The effect of form of nitrogen on the efficiency of protein synthesis by rumen bacteria in continuous culture. Ph.D. Dissertation. University of Natal, Pietermaritzburg, South Africa.
- McAllan, A.B. 1991. Carbohydrate and nitrogen metabolism in the forestomachs of steers given untreated or ammonia treated barley straw diets supplemented with urea or urea plus fishmeal. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 33: 195-208.
- Mehrez, A.L., E.R. Ørskov and I. McDonald. 1977. Rates of rumen fermentation in relation to rumen ammonia concentration. *Br. J. Nutr.*, 38: 437-443.
- Menke, K.H. and H. Steingass. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Develop.*, 28: 7-55
- Merry, R.J., A.B. McAllan and R.H. Smith. 1990. *In vitro* continuous culture studies on the effect of nitrogen source on rumen microbial growth and fibre digestion. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 31: 55-64.
- Molina-Alcaide, E., M.R. Weisbjerg, and T. Hvelplund. 1996. Degradation characteristics of shrubs and the effect of supplementation with urea or protein on microbial production using a continuous-culture system. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 75: 121-132.
- Russell, J.B. and C.J. Sniffen. 1984. Effect of carbon-4 and carbon-5 volatile fatty acids on growth of mixed rumen bacteria *in vitro*. *J. Dairy Sci.*, 67: 987-996.
- Russell, J.B., J.D. O'Connor, D.G. Fox, P.J. Van Soest and C.J. Sniffen. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. *J. Anim. Sci.*, 70: 3551-3561.
- Russell, J.B., C.J. Sniffen and P.J. Van Soest. 1983. Effect of carbohydrate limitation on degradation and utilization of casein by mixed rumen bacteria. *J. Dairy Sci.*, 66: 763-775.
- SAS Institute Inc. 1999. SAS Companion for the Microsoft Windows Environment, SAS Institute Inc. Cary, NC. USA.
- Steel, R.G.D. and J.H. Torrie. 1981. *Principles and Procedures of Statistics*. 2nd ed. McGraw-Hill Book Company, New York.
- Theodorou, M.K., B.A. Williams, M.S. Dhanoa, A.B. McAllan and J. Fance. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 48: 185-197.
- Van Soest, P.J. 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminants*. 2nd ed. Cornell University Press. New York.
- Weatherburn, M.W. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal. Chem.*, 39: 971-974.

Recibido: 6-4-99. Aceptado: 4-11-99.