

# PRODUCCIÓN DE METANO *IN VITRO* EN MEZCLA DE GRAMÍNEAS-LEGUMINOSAS DEL TRÓPICO ALTO COLOMBIANO

## *IN VITRO* METHANE PRODUCTION IN THE INCUBATION OF MIXTURES OF GRASSES AND LEGUMES FROM COLOMBIAN HIGH-ALTITUDE AREAS

Vargas, J.<sup>1</sup>; Pabón, M.<sup>1</sup> y Carulla, J.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Producción Animal. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. \*jcarullaf@unal.edu.co

### PALABRAS CLAVE ADICIONALES

Efecto invernadero. Pasturas. Sistemas pastoriles.

### ADDITIONAL KEYWORDS

Grasslands. Grazing systems. Greenhouse gases.

### RESUMEN

Se determinó la producción de metano *in vitro* para mezclas de gramíneas:leguminosas del trópico alto colombiano, utilizando la técnica de producción de gas. En dos lotes diferentes, se recogieron muestras de dos gramíneas, ryegrass (*Lolium perenne*) y kikuyo (*Pennisetum clandestinum*), y dos leguminosas, trébol blanco (*Trifolium repens*) y lotus grande (*Lotus uliginosus*). Se evaluaron cuatro mezclas de las gramíneas y las leguminosas: kikuyo y lotus, kikuyo y trébol blanco, ryegrass y lotus y ryegrass y trébol en tres proporciones diferentes de gramínea:leguminosa (90:10, 70:30 y 50:50). La concentración de metano en el gas se determinó por cromatografía de gases. Al aumentar las proporciones de leguminosas en la mezcla con el kikuyo, la producción de metano por unidad de materia seca degradada disminuyó hasta un 14 % ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, no se observaron diferencias cuando se mezclaron con el ryegrass. Para el lotus, una leguminosa tanífera, al aumentar su proporción en la mezcla se disminuyó la producción total de metano ( $p < 0,05$ ) y su proporción en el gas independientemente de la gramínea base sugiriendo un efecto del lotus sobre las poblaciones metanogénicas.

### SUMMARY

*In vitro* methane production was determined in mixtures of grasses and legumes of Colombian highlands were evaluated using the gas production technique. Samples of two grasses, ryegrass (*Lolium perenne*) and kikuyo (*Pennisetum clandestinum*), and two legumes, white clover

(*Trifolium repens*) and big trefoil (*Lotus uliginosus*), from two different paddocks were harvested. The treatments were mixtures of kikuyo and lotus, kikuyo and white clover, ryegrass and lotus and ryegrass and clover in three different grass:legumes ratio (90:10, 70:30 and 50:50). The methane concentration in the gas was determined by gas chromatography. Methane production per unit of degraded dry matter decreased 14 % ( $p < 0.05$ ) when the proportions of legume increased associated with kikuyo. However, no differences were observed when legumes were mixed with ryegrass. When proportion of lotus, a tanniferous legume, increased total methane production decreased independently of grass suggesting an effect in methanogenic population.

### INTRODUCCIÓN

La producción de metano entérico en los rumiantes representa una pérdida energética que varía entre el 5 y 7 % de la energía bruta consumida (Johnson y Johnson, 1995). Adicionalmente, el metano es uno de los gases efecto invernadero que tiene un poder de calentamiento 28 veces mayor al dióxido de carbono y una vida media en la atmósfera de 12,4 años (IPCC, 2013). Los rumiantes contribuyen de manera significativa a la producción de metano (Gerber *et al.*, 2013) por lo cual se requiere reducir las emisiones de metano para aumentar la eficiencia productiva y disminuir el impacto

Recibido: 16-8-13. Aceptado: 20-3-14.

Arch. Zootec. 63 (243): 397-407. 2014.

ambiental (Gerber *et al.*, 2013).

Gran parte de la producción animal con rumiantes se hace bajo sistemas pastoriles donde los forrajes son la principal fuente de alimento (Niggli *et al.*, 2009) por lo cual, entender cómo los factores asociados a la calidad de los forrajes influyen en la producción de metano por los rumiantes, es un aspecto crítico. La incorporación de leguminosas en una dieta basada en gramíneas ha resultado en aumentos en la productividad animal y en el mejoramiento del balance de N en sistemas pastoriles (Castro *et al.*, 2008; Tiemman *et al.*, 2008). El impacto de las leguminosas y de las diferencias entre especies forrajeras sobre la producción de metano ha sido poco estudiado (Vargas *et al.*, 2013; Hess *et al.*, 2003). Los estudios *in vitro* suministran información preliminar acerca de estos recursos y su potencial producción de metano en la fermentación entérica. Tekippe *et al.* (2013) y Hess *et al.* (2003) utilizando el sistema Rusitec y evaluando especies de trópico cálido, encontraron que las emisiones de metano aumentaron al incluir una leguminosa con bajas concentraciones de taninos condensados, pero disminuyeron cuando la leguminosa contenía una alta concentración de taninos. Según Carulla *et al.* (2005) la adición de alfalfa o trébol al ryegrass (*Lolium perenne*) aumenta *in vivo* la producción de metano por unidad de materia orgánica fermentada. Vargas *et al.* (2012) sugieren que la inclusión de leguminosas ha presentado una respuesta contradictoria entre los trabajos revisados. La hipótesis evaluada en este trabajo era que al reemplazar parcialmente una gramínea por una leguminosa con taninos (lotus) la producción de metano disminuiría mientras al adicionar una leguminosa sin taninos (trébol) se aumentarían las emisiones de metano *in vitro*.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se recogieron muestras de 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°40'89"N, 74°13'13"W; 2540 msnm) en Colombia. Cada gramínea o leguminosa se recogió en dos lugares diferentes (lotes) con el fin de garantizar una repetición para cada especie. El ryegrass fue cosechado a los 35 días y el kikuyo, el trébol y el lotus a los 45 días de rebrote. Las muestras de los forrajes fueron congeladas a -20°C, liofilizadas y molidas en un molino de cuchillas (Romer®) con criba de 1 mm. Se evaluaron cuatro mezclas de las gramíneas y las leguminosas: kikuyo y lotus, kikuyo y trébol blanco, ryegrass y lotus y ryegrass y trébol blanco en tres proporciones diferentes de gramínea:leguminosa (90:10, 70:30 y 50:50) para un total de 12 tratamientos.

Se empleó el procedimiento de incubación *in vitro* descrito por Pell y Scofield (1993) y adaptado por Parra y Ávila (2010). El fluido ruminal se obtuvo 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, y en cada botella 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>. Las mezclas de los forrajes de cada uno de los dos lotes y un blanco (sin forrajes) fueron incubadas por triplicado en una incubadora (Heidolph Titramax 1000) durante 48 h manteniendo una temperatura de 39°C y agitación suave. Finalizada la fermentación, se determinó el pH del contenido utilizando un potenciómetro (Hanna HI 98140), y se tomaron 2 mL del sobrenadante, que se acidificaron con 200 µl de ácido sulfúrico concentrado al 98 % y se congelaron a -20°C para el posterior análisis de ácidos grasos volátiles (AGVs). El contenido restante del tubo se filtró a través de bolsas de filtro F57 Ankom®.

La producción de gas se cuantificó a las 0, 2, 4, 8, 12, 18, 24 y 48 horas empleando un

## PRODUCCIÓN DE METANO *IN VITRO* EN MEZCLAS GRAMÍNEAS-LEGUMINOSAS

medidor de presión manual (Bailey & Mackey Ltda.; Theodorou *et al.*, 1994). La producción total de gas fue la suma de las producciones a las horas de muestreo. Una muestra del gas producido a cada hora de muestreo fue conservada en vacutainers al vacío para posterior determinación de la concentración de metano.

En los forrajes y en los residuos de fermentación de cada botella, se determinó la materia seca (AOAC, 2005), para calcular la digestibilidad aparente de la materia seca (DMS), según lo descrito por Blümmel y Lebzién (2001). Adicionalmente, en los forrajes se determinó el contenido de nitrógeno por el método de Dumas (AOAC, 2005), de extracto etéreo (AOAC, 2005), de fibra en detergente ácido y neutro (Van Soest *et al.*, 1991), de energía bruta por calorimetría (Parr® 6510) y el contenido de taninos condensados por el método de butanol-HCL (Terrill *et al.*, 1992). Para determinar la concentración de metano en el gas producido a cada hora de muestreo y la concentración de AGVs del contenido de las botellas, 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 Betancourt (2001), respectivamente.

Se utilizó un diseño de bloques completos (dos lotes) con arreglo factorial 2x2x3, dos gramíneas (ryegrass y kikuyo), dos leguminosas (trébol blanco y lotus) y tres proporciones (90:10, 70:30 y 50:50). Se utilizó el procedimiento ANOVA de SAS® versión 9,2 para el análisis de varianza y las medias fueron comparadas con la prueba de Tukey con una significancia 5 %.

### RESULTADOS

Las leguminosas presentaron un mayor contenido de energía, proteína bruta (PB), carbohidratos no estructurales (CNE) y lignina (LIG) que las gramíneas. Las gramíneas presentaron una mayor concen-

tración de carbohidratos asociados a la pared. El lotus presentó el mayor contenido de taninos condensados (**tabla I**).

El pH del contenido de las botellas a las 48 h de incubación no presentó diferencias asociadas a la inclusión de leguminosas a las gramíneas. La producción de AGVs disminuyó ( $p < 0,05$ ) al incluir leguminosas en la mezcla y dependió de su nivel de inclusión (**tabla II**). Las proporciones molares de acetato fueron menores para el kikuyo que para el ryegrass mientras que las de propionato fueron mayores. La proporción de acetato cuando aumentó la proporción de leguminosa en la mezcla dependió de las especies mezcladas. El aumento en la proporción de lotus disminuyó la proporción de acetato ( $p < 0,05$ ) y no fue así para el trébol donde la concentración de acetato no cambió al aumentar su proporción en la mezcla.

**Tabla I.** Composición química (%MS) de las especies evaluadas. (Chemical composition (%DM) of evaluated species).

	Trébol	Lotus	Ryegrass	Kikuyo
PB	31,2	33,9	25,2	25,4
EE	5,52	2,15	4,13	5,07
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	2,48	7,29	2,80	1,97
Carbohidratos				
NE <sup>1</sup>	23,6	19,0	16,0	11,2
totales <sup>2</sup>	51,9	43,3	59,6	57,5
Cenizas	8,54	9,16	8,32	10,05
TC	0,32	4,23	0,00	0,00
MO	91,5	90,8	91,7	90,0
Energía <sup>3</sup>	4,71	4,57	4,18	4,21

PB= proteína bruta; EE= extracto etéreo; FDN= fibra detergente neutro; FDA= fibra detergente ácido; NE= no estructurales; TC= taninos condensados; MO= materia orgánica.

<sup>1</sup>100-(PB+FDN+Cenizas+EE+Taninos condensados); <sup>2</sup>FDN+CNE-Lig; <sup>3</sup>kcal g<sup>-1</sup>.

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 butirato 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 entre tratamientos ( $p < 0,05$ ) (tabla II).

La adición de leguminosas a las gramíneas sobre la DMS dependió tanto de la especie de gramínea como de la leguminosa. En el caso del kikuyo la adición de trébol aumentó la DMS de la mezcla mientras que disminuyó con la adición de lotus ( $p < 0,05$ ). Para el ryegrass, la adición de trébol blanco no afectó la DMS de la mezcla mientras que la adición de lotus la disminuyó (tabla III). La producción total de gas fue similar entre

**Tabla II.** Efecto de la proporción (P), gramínea (G): leguminosa (L) sobre la fermentación ruminal *in vitro*. (Effect of proportion (P) grass (G): legume (L) on ruminal *in vitro* fermentation).

	Kikuyo		Ryegrass		G	L	P	GxL	LxP	GxP	LxGxP
	Trébol	Lotus	Trébol	Lotus							
pH					*	**	ns	ns	+	ns	ns
90:10	6,60	6,65	6,68	6,66							
70:30	6,62	6,64	6,69	6,68							
50:50	6,63	6,64	6,68	6,68							
ÁGV (total AGV (mmol/L)					*	*	*	*	*	*	*
90:10	62,3 <sup>a</sup>	53,1 <sup>a</sup>	63,7 <sup>a</sup>	56,4							
70:30	59,2 <sup>ab</sup>	35,4 <sup>b</sup>	55,8 <sup>b</sup>	52,8							
50:50	54,7 <sup>b</sup>	30,6 <sup>b</sup>	55,1 <sup>b</sup>	54,2							
Acetato (mol %)					*	*	*	*	ns	ns	**
90:10	64,1	62,5 <sup>a</sup>	71,1	71,7 <sup>a</sup>							
70:30	64,7	59,6 <sup>b</sup>	70,8	73,6 <sup>a</sup>							
50:50	63,1	58,6 <sup>b</sup>	69,4	68,7 <sup>b</sup>							
Propionato (mol %)					*	*	*	*	ns	ns	**
90:10	27,4	32,0	22,8	22,3 <sup>ab</sup>							
70:30	26,9	34,1	23,0	20,4 <sup>b</sup>							
50:50	28,9	34,8	23,7	23,7 <sup>a</sup>							
Butirato (mol %)					*	*	**	*	ns	ns	ns
90:10	8,5	5,5	6,2	6,0 <sup>b</sup>							
70:30	8,5	6,3	6,3	6,0 <sup>b</sup>							
50:50	8	6,6	6,9	7,7 <sup>a</sup>							
Acetato:propionato					*	**	*	*	ns	ns	**
90:10	2,4	2,0	3,1	3,3 <sup>a</sup>							
70:30	2,4	1,8	3,1	3,7 <sup>a</sup>							
50:50	2,2	1,7	2,9	2,9 <sup>b</sup>							

<sup>ab</sup>Letras diferentes, diferencias significativas entre proporciones dentro de la asociación. \* $p < 0,01$ ; \*\* $p < 0,05$ ; \* $p < 0,1$ ; ns= no significativo.

PRODUCCIÓN DE METANO *IN VITRO* EN MEZCLAS GRAMÍNEAS-LEGUMINOSAS

**Tabla III.** Efecto de la proporción (P) gramínea (G): leguminosa (L) sobre digestibilidad *in vitro* de la materia seca. (Effect of proportion (P) grass (G): legume (L) on *in vitro* digestibility of dry matter).

	Kikuyo		Ryegrass		G	L	P	GxL	LxP	GxP	LxGxP
	Trébol	Lotus	Trébol	Lotus							
					*	*	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>							

<sup>ab</sup>Letras diferentes, diferencias significativas entre proporciones dentro de la asociación. \*p<0,01; ns: no significativo.

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 seca 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 seca degradada (p<0,05) 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 seca degradada como consecuencia de la adición de trébol blanco no fue diferente mientras que la adición de lotus la incrementó (tabla IV).

La producción total de metano fue diferente entre especies de gramínea y disminuyó con la adición de las leguminosas excepto cuando se asoció el trébol y el ryegrass (tabla IV). La producción de metano por unidad de materia seca degradada dependió de la especie de gramínea y de leguminosa y 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 seca degradada fue mayor cuando se adicionó trébol blanco que cuando se adicionó lotus (p<0,05). 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 IV). La relación metano:gas fue menor para el ryegrass que para el kikuyo (p<0,05). Para ambas gramíneas, el aumento en la proporción de trébol no tuvo ningún efecto mientras que la adición de lotus disminuyó esta relación (tabla IV).

#### DISCUSIÓN

La introducción de leguminosas en pasturas basadas en gramíneas ha sido promovida en muchos sistemas de producción de rumiantes debido al efecto positivo que tienen sobre el consumo de alimento y la producción animal (Castro *et al.*, 2008; Tiemman *et al.*, 2008). El impacto de estas prácticas debe considerar no solamente los aspectos productivos, sino incluir también aspectos ambientales (Beukes *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), pero las conclusiones que se pueden derivar de estos trabajos no son claras pues en algunos casos la adición de la leguminosa incrementa la producción de metano (Carulla *et al.*, 2005) mientras en otros casos la disminuye (Lee *et al.*, 2004). La diferencia en la producción de metano *in vitro* entre especies

**Tabla IV.** Efecto de la proporción (P) gramínea (G): leguminosa (L) sobre la producción de gas, de metano y la relación metano:gas *in vitro*. (Effect of proportion (P) grass (G): legume (L) on *in vitro* gas, methane and methane:gas ratio).

	Kikuyo		Ryegrass		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							
70:30	27,3 <sup>b</sup>	28,0 <sup>a</sup>	28,0	27,5							
50:50	27,3 <sup>b</sup>	26,2 <sup>b</sup>	28,6	28,1							
- mL g <sup>-1</sup> MS degradada					**	*	ns	**	*	*	ns
90:10	519,3 <sup>a</sup>	475,7	453,9	445,4 <sup>b</sup>							
70:30	463,2 <sup>b</sup>	490,4	454,0	478,5 <sup>b</sup>							
50:50	446,9 <sup>b</sup>	474,6	467,7	519,1 <sup>a</sup>							
Producción de metano											
- mL					*	*	*	*	*	*	*
90:10	3,44 <sup>a</sup>	3,14 <sup>a</sup>	2,88 <sup>b</sup>	2,75 <sup>a</sup>							
70:30	3,17 <sup>b</sup>	2,78 <sup>b</sup>	3,04 <sup>a</sup>	2,74 <sup>a</sup>							
50:50	3,19 <sup>b</sup>	2,50 <sup>c</sup>	2,98 <sup>a</sup>	2,60 <sup>b</sup>							
- mL g <sup>-1</sup> MS degradada					*	*	*	*	ns	*	*
90:10	61,0 <sup>a</sup>	53,6 <sup>a</sup>	46,8	46,8							
70:30	54,1 <sup>b</sup>	48,8 <sup>b</sup>	49,3	47,4							
50:50	52,3 <sup>b</sup>	45,5 <sup>c</sup>	48,7	48,2							
Relación metano:gas											
90:10	11,5	11,4 <sup>a</sup>	10,3	10,4 <sup>a</sup>							
70:30	11,5	10,0 <sup>b</sup>	10,8	9,9 <sup>ab</sup>							
50:50	11,7	9,5 <sup>b</sup>	10,2	9,1 <sup>b</sup>							

<sup>ab</sup>Letras diferentes, diferencias significativas entre proporciones dentro de la asociación. \*p<0,01; \*\*p<0,05; ns: no significativo.

forrajeras podría estar explicada por las diferencias en la proporción de carbohidratos digeribles en los forrajes y en la proporción de celulosa (Hess *et al.*, 2003). En el presente trabajo se observó 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.

#### ADICIÓN DE TRÉBOL A LAS GRAMÍNEAS Y PRODUCCIÓN DE METANO

Al aumentar la proporción de trébol en la mezcla con kikuyo, la producción de metano total y por unidad de materia seca degradada disminuyó, mientras que aumentó con el

ryegrass. La adición de trébol al kikuyo o al ryegrass disminuyó la concentración de carbohidratos totales (4-5 %) debido a una menor concentración de éstos en la leguminosa. Adicionalmente, se observó una disminución en la concentración de AGV con la adición del trébol y una correlación lineal positiva entre los carbohidratos fermentados y la producción de AGVs ( $r=0,74$ ;  $p<0,01$ ) sugiriendo una menor cantidad de carbohidratos fermentados a medida que se aumentó la proporción de la leguminosa en la mezcla, Vargas *et al.* (2013) encontraron que las producciones de gas y de metano *in vitro* estaban asociadas con la cantidad de carbohidratos fermentables y Van Soest

## PRODUCCIÓN DE METANO *IN VITRO* EN MEZCLAS GRAMÍNEAS-LEGUMINOSAS

(1994) sugiere que esta fermentación está estrechamente asociada a la producción de AGVs, de gas y de metano. Por lo tanto, la menor producción de metano para la mezcla con kikuyo podría explicarse por una reducción en los carbohidratos fermentables, no así para la mezcla con ryegrass que a pesar de la reducción en los carbohidratos fermentables la producción de metano aumentó debido a la adición de trébol. Hess *et al.* (2003) encontraron un aumento en la producción de metano al adicionar una leguminosa a una gramínea tropical de baja calidad, este aumento se asoció a una mayor digestibilidad de la MS que podría aumentar la disponibilidad de los precursores de metano ( $H_2$  y  $CO_2$ ). Otros autores también han asociado una mayor digestibilidad de la MS con una mayor producción de gas y de metano (Tavendale *et al.*, 2005). Sin embargo, en el presente trabajo cuando se incrementó la proporción de trébol blanco en la mezcla con kikuyo se aumentó la digestibilidad de la MS pero no así la producción de metano, gas o AGVs, mientras en la mezcla con ryegrass, la adición de trébol aumentó la producción de metano sin modificar la digestibilidad de la MS.

En la mayoría de los casos, la adición de leguminosas a gramíneas aumenta la concentración de proteína cruda y disminuye la de 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 al ryegrass o al kikuyo varió del 9 al 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 en el rumen puede resultar en la síntesis de proteína microbiana, producción de amonio y/o AGVs, gas y metano. La proporción de cada uno de estos productos depende del tipo de proteína fermentada, las condiciones de fermentación, la disponibilidad de energía y los microorganismos involucrados (Leng, 2011).

En este 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, 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, ya que al aumentar los niveles de proteína debido a la adición de trébol al ryegrass, la producción total de gas no se modificó pero aumentó la de metano.

La diferencia en la respuesta en la producción de metano debida a la adición de trébol entre el kikuyo y el ryegrass podría explicarse por una diferencia en la síntesis de proteína microbiana entre estas dos gramíneas. Blümmel *et al.* (1997) sugieren que los productos de la fermentación se distribuyen entre la producción de gas, síntesis de AGVs y de proteína microbiana. Por lo tanto, un aumento en la síntesis de proteína microbiana 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 utilizado para la síntesis de proteína microbiana. Se ha reportado en la literatura que una mayor síntesis microbiana disminuye la producción de metano ya que parte de la MS degradada queda retenida en la masa microbiana (Blümmel *et al.*, 1997). Aunque en este trabajo no se evalúa el crecimiento microbiano, se sugiere que un aumento en la fermentabilidad de la MS está asociada a una mayor síntesis de proteína microbiana (Russell *et al.*, 1992). En este estudio, la digestibilidad de la MS aumentó como consecuencia de la adición del trébol al kikuyo pero no al ryegrass, por lo cual se podría sugerir que la síntesis microbiana aumentó para las mezclas de trébol con kikuyo pero no con ryegrass. Una menor producción de metano y gas como consecuencia de una mayor degradabilidad de la MS (energía) se daría siempre y cuando exista suficiente proteína en el medio de

cultivo para el uso de esta energía adicional por los microorganismos. Se ha demostrado que existen relaciones óptimas entre energía y proteína que maximizan la síntesis microbiana (Russell *et al.*, 1992), por lo cual se podría especular que la producción de gas y de metano no solo dependerían de la fermentabilidad de los carbohidratos sino que las relaciones energía:proteína serían también determinantes en este proceso.

#### ADICIÓN DE LOTUS A LAS GRAMÍNEAS Y PRODUCCIÓN DE METANO

El aumento en la proporción de lotus disminuyó las emisiones totales de metano (mL) sin importar la gramínea a la cual estuvo asociado (**tabla IV**). El *Lotus uliginosus* es una leguminosa con moderados niveles de taninos condensados (**tabla I**). La inclusión de leguminosas taníferas se ha relacionado con una disminución en la producción de metano tanto en estudios *in vitro* (Hess *et al.*, 2008; Hess *et al.*, 2006) como *in vivo* (Woodward *et al.*, 2004; Woodward *et al.*, 2001). Se han sugerido algunos mecanismos que podrían explicar el efecto de los taninos condensados en la producción de metano como es la reducción de la degradabilidad de la MS, Waghorn (2008) sugiere que los taninos condensados forman complejos indigeribles con algunos nutrientes de la dieta que evitan que se degraden en el rumen. Los taninos del lotus han sido relacionados con una disminución de la digestibilidad de la MS y la proteína (Chipatecua *et al.*, 2007). La disminución en la digestibilidad del material fermentado ha sido atribuida además a la 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). Los taninos condensados podrían tener efectos bacteriostáticos sobre algunas poblaciones ruminales, lo que podría resultar en una menor digestibilidad del material fermentado (Tavendale *et al.*, 2005).

En síntesis, la disminución en la digestibilidad de los nutrientes en el rumen disminuye la producción de H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> precursores de la síntesis de metano. La menor digestibilidad de la MS permitiría explicar los resultados observados en este trabajo.

El aumento en la inclusión de lotus disminuyó la producción de AGV y la proporción de acetato. Algunos autores han sugerido que los patrones de fermentación podrían explicar las diferencias en la producción de metano. Moss *et al.* (2000) sugieren que la producción de metano presenta una relación directa con las concentraciones de acetato pero inversa con las de propionato. La síntesis de acetato libera H<sub>2</sub> mientras que la de propionato requiere H<sub>2</sub> para su síntesis (Russell, 1998). Sin embargo, la disminución en la producción de metano debido a la modificación en el patrón de fermentación no fue evidente en este trabajo. Por otra parte, la inclusión de leguminosas con taninos condensados ha sido relacionada con un posible efecto bacteriostático o bactericida sobre algunas poblaciones ruminales. Tavendale *et al.* (2005) sugieren que los taninos condensados del lotus podrían tener efecto bacteriostático sobre algunas poblaciones metanogénicas. La disminución en la producción de metano por unidad de gas producido sugiere que el aumento en la inclusión de lotus disminuye la síntesis de metano.

#### CONCLUSIONES

Se encontró que el efecto de añadir una leguminosa (trébol o lotus) a una gramínea (kikuyo o ryegrass) sobre la producción de metano *in vitro* dependió de las especies mezcladas. Al adicionar trébol al kikuyo, la producción de metano disminuyó, pero no se observó este efecto con el ryegrass. Al aumentar la proporción de lotus en las mezclas disminuyó la producción total de metano independientemente de la gramínea con la que se mezcló. La presencia de una leguminosa tanífera disminuyó la concen-



## PRODUCCIÓN DE METANO *IN VITRO* EN MEZCLAS GRAMÍNEAS-LEGUMINOSAS

tración de metano en el gas producido, sugiriendo un posible efecto sobre las poblaciones metanogénicas. El incremento en la proporción de leguminosas en la mezcla se relacionó con el aumento en la concentración de proteína presentándose una relación inversa con la producción de AGVs.

### BIBLIOGRAFÍA

- AOAC. 2005. Association of Official Agricultural Chemists. Official methods of analysis. Washington, D.C. USA.
- Bentacourt, M. 2001. Efecto de la melaza, ácido fórmico y tiempo de fermentación sobre la ensilabilidad de la *Leucaena leucocephala*. Trabajo de Grado. Facultad de Agronomía. Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.
- Beukes, P.C.; Gregorini, P.; Romera, A.J.; Levy, G. and Waghorn, G.C. 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. and Lebzien, P. 2001. Predicting ruminal microbial efficiencies of dairy ration by *in vitro* techniques. *Livest Prod Sci*, 68: 107-117.
- Blümmel, M.; Makkar, H.P.S. and Becker, K. 1997. *In vitro* gas production: a technique revisited. *J Anim Physiol An N*, 77: 24-34.
- Carulla, J.E.; Kreuzer, M.; Machmüller, A. and Hess, H.D. 2005. Supplementation of *Acacia mearnsii* tannin decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. *Aust J Agr Res*, 56: 961-970.
- Castro, E.; Mojica, J.E.; León, J.M.; Pabón, M.L.; Carulla, J.E. y Cárdenas, E.A. 2008. Productividad de pasturas y producción de leche bovina bajo pastoreo de gramínea y gramínea + *Lotus uliginosus* en Mosquera, Colombia. *Rev Med Vet Zoot*, 55: 9-21.
- Chipatecua, M.R.; Pabón, M.L.; Cárdenas, E.A. y Carulla, J.E. 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. *Rev Colomb Cienc Pecu*, 20: 40-48.
- Gerber, P.J.; Steinfeld, H.; Henderson, B.; Mottet, A.; Opio, C.; Dijkman, J.; Falcucci, A. and Tempio, G. 2013. Tackling climate change through livestock - A global assessment of emissions and mitigation opportunities. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Rome, Italy.
- Goering, H.K. and Van Soest, P.J. 1970. Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications). Agricultural Handbook, n° 379. ARS-USDE. Washington, DC.
- Hess, H.D.; Tiemann, T.; Noto, F.; Carulla, J. and Kreuzer, M. 2006. Strategic use of tannins as means to limit methane emission from ruminant livestock. *Int Congr Series*, 1293: 164-167.
- Hess, H.D.; Mera, M.L.; Tiemann, T.T.; Lascano, C.E. and 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. *Anim Feed Sci Tech*, 147: 105-115.
- Hess, H.D.; Monsalve, L.M.; Lascano, C.E.; Carulla, J.E.; Díaz, T.E. 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 Agr Res*, 54: 703-713.
- IPCC. 2013. Summary for Policymakers. In: Stocker, T.F., Qin, D., Plattner, G.K., Tignor, M., Allen, S.K., Boschung, J., Nauels, A., Xia, Y., Bex, V. and Midgley, P.M. (Eds). Climate Change 2013: The physical science basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel of Climate Change. Cambridge University Press. Cambridge. United Kingdom and New York, USA.
- Johnson, K.A. and Johnson, D.E. 1995. Methane emissions from cattle. *J Anim Sci*, 73: 2483-2492.
- Lee, J.M.; Woodward, S.L.; Waghorn, G.C. and

### AGRADECIMIENTOS

A Diana Parra por su colaboración en el desarrollo de los procedimientos de laboratorio de este experimento y al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural por la financiación de este proyecto.

VARGAS, PABÓN Y CARULLA

- Clark, D.A. 2004. Methane emissions by dairy cows fed increasing proportions of white clover (*Trifolium repens*) in pasture. *Proc NZ Grassland Assoc*, 66: 151-155.
- Leng, R.A. 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. *Livest Res Rural Dev*, 23: Article #258. (12/03/2014).
- López, S. 2005. *In vitro* and *in situ* techniques for estimating digestibility. In: Dijkstra, J.; Forbes, J.M. and France, J. (Eds.). Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism. CABI Publishing. 2<sup>nd</sup> ed. Wallingford, UK.
- Moss, A.; Jouany, J.P. and Newbold, J. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Ann Zootech*, 29: 231-253.
- Niggli, U.; Fliebbach, A.; Hepperly, P. and Scialabba, N. 2009. Low greenhouse gas agriculture: Mitigation and adaptation potential of sustainable farming systems. *FAO. Rev* 2-2009.
- Parra, D.M. y Avila, M.J. 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, Colombia.
- Patra, A.K. 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.
- Pell, A.N. and Scofield, P. 1993. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. *J Dairy Sci*, 76: 1063-1073.
- Russell, J.B. 1998. The importance of pH in the regulation of ruminal acetate propionate ratio and methane production *in vitro*. *J Dairy Sci*, 81: 3222-3230.
- Russell, J.B.; O'Connor, J.D.; Fox, D.G.; Van Soest, P.J. and Sniffen, C.J. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. *J Anim Sci*, 70: 3551-3561.
- Stürm, C.D.; Tiemann, T.T.; Lascano, C.E.; Kreuzer, M. and Hess, H.D. 2007. Nutrient composition and *in vitro* ruminal fermentation of tropical legume mixtures with contrasting tannin contents. *Anim Feed Sci Tech*, 138: 29-46.
- Tavendale, M.H.; Meagher, L.; Pacheco, D.; Walker, N.; Attwood, G.T. and Sivakumaran, S. 2005. Methane production from *in vitro* rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of dextratable condensed tannin fractions on methanogenesis. *Anim Feed Sci Tech*, 123-124: 403-419.
- Tekippe, J.A.; Tacoma, R.; Hristov, A.N.; Lee, C.; Oh, J.; Heyler, K.S.; Cassidy, T.W.; Varga, G.A. and Bravo, D. 2013. Effect of essential oils on ruminal fermentation and lactation performance of dairy cows. *J Dairy Sci*, 96: 7892-7903.
- Terrill, T.H.; Rowan, A.M.; Douglas, G.B. and Barry, T.N. 1992. Determination of extractable and bound condensed tannin concentration in forage plants, protein concentrated meals and cereal grains. *J Sci Food Agri*, 58: 321-329.
- Theodorou, M.K.; Williams, B.A.; Dhanoa, M.S.; McAllan, A.B. and France, J. 1994. A simple gas method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of the ruminant feeds. *Anim Feed Sci Tech*, 48: 185-197.
- Tiemann, T.T.; Lascano, C.E.; Wettstein, H.R.; Mayer, A.C.; Kreuzer, M. and Hess, H.D. 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. *Animal*, 2: 790-799.
- Van Soest, P. 1994. Nutritional ecology of the ruminant. 2<sup>nd</sup> ed. Cornell University Press. USA. 271 pp.
- Van Soest, P., Robertson, J. and Lewis, B. 1991. Methods for dietary fiber, neutral fiber and no starch polysaccharides in relation to nutrition. *J Dairy Sci*, 74: 3583-3597.
- Vargas, J.; Cárdenas, E.; Pabón, M. y Carulla, J. 2012. Emisión de metano entérico en rumiantes en pastoreo. *Arch Zootec*, 61: 51-66.
- Vargas, J.J.; Cárdenas, E.A.; Mayorga, O.L.; Pabón, M.L. and Carulla, J.E. 2013. Changes in methane emission due to species, maturity and legume proportion in grass:legume mixtures incubated *in vitro* of Colombian highland forages. Proceedings of the 5<sup>th</sup> International Conference on Greenhouse Gases and Animal Agriculture. Ed.: R. Dewhurst. Dublin, Ireland. June 23-26.
- Waghorn, G. 2008. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for

## PRODUCCIÓN DE METANO *IN VITRO* EN MEZCLAS GRAMÍNEAS-LEGUMINOSAS

- sustainable sheep and goat production-Progress and challenges. *Anim Feed Sci Tech*, 147: 116-139.
- Woodward, S.L.; Waghorn, G.C.; Ulyatt, M.J. and Lassey, K.R. 2001. Early indications that feeding *Lotus* will reduce methane emissions from ruminants. *Proc New Zeal Soc An*, 61: 23-26.
- Woodward, S.L.; Waghorn, G.C. and Laboyrie, P.G. 2004. Condensed tannins in birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) reduce methane emissions from dairy cows. *Proc New Zeal Soc An*, 64: 160-164.