SUPLEMENTACIÓN NITROGENADA DE FORRAJES DEFICIENTES EN NITRÓGENO: EFECTO SOBRE SU FERMENTACIÓN RUMINAL *IN VITRO*

M.D. Carro, S. López, C. Valdés y M.J. Ranilla
Departamento de Producción Animal I, Universidad de León, 24071 LEÓN.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años han aparecido en la bibliografía resultados contradictorios sobre las necesidades nitrogenadas de las bacterias ruminales. Así, mientras algunos estudios (Griswold et al., 1996; Carro and Miller, 1999) sugieren que las bacterias celulolíticas pueden utilizar nitrógeno (N) proteico, otros (Russell et al., 1992) sostienen que únicamente utilizan N amoniacal. La resolución de esta cuestión tendría una trascendencia importante en la suplementación nitrogenada de forrajes deficientes en N degradable en el rumen. En este trabajo se planteó el estudio del efecto de la suplementación nitrogenada y del tipo de fuente de ésta (urea *vs* caseína) sobre la fermentación ruminal *in vitro* de varios forrajes deficientes en N degradable en el rumen.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este estudio se seleccionaron cinco forrajes deficientes en N degradable: heno de trébol, heno de gramíneas (HG), heno de prado permanente (HPP) y rebrotes de *Calluna vulgaris* y de *Erica arborea*. Las muestras de los forrajes habían sido previamente incubadas en el rumen mediante el método *in situ* para determinar la degradabilidad efectiva del N y de la materia orgánica (MO). La degradabilidad efectiva se estimó para un ritmo de paso a través del rumen de 0,02 h^{-1} y se calculó la relación g de N degradable en el rumen / kg de MO degradable en el rumen (g NDR/kg MODR). La composición química de las raciones y su relación NDR/MODR figuran en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición química (g/kg materia seca) y relación entre el nitrógeno y la materia orgánica degradables en el rumen (g NDR/kg MODR) de los forrajes incubados *in vitro*

	H. trébol	HG	HPP	*E. arborea*	*C. vulgaris*
Proteína bruta	113	106	78	49	67
Fibra neutro-detergente	566	618	680	616	583
Fibra ácido-detergente	419	313	380	494	422
Lignina	117	35	60	150	151
g NDR/kg MODR	26,2	20,6	17,2	14,3	11,0

La muestras de los forrajes se molieron (1 mm) y se incubaron *in vitro* siguiendo la técnica descrita por Menke y Steingass (1988). Muestras de cada forraje (200 mg) 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 fistuladas en el rumen alimentadas con un heno de buena calidad. Las botellas se cerraron herméticamente y se introdujeron en un incubador, donde permanecieron a 39°C durante 120 horas.

Los forrajes se incubaron sin ningún tratamiento nitrogenado (control) o añadiéndoles la cantidad de N necesaria para proporcionar 30 g NDR/kg MODR (ARC,

Este 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).

1980) en forma de urea o de caseína. Para los cálculos de la cantidad de N necesaria se asumió que tanto la urea como la caseína presentan una degradabilidad del 100 %. Para cada forraje se incubaron quince botellas, cinco por cada tratamiento. En tres de las cinco botellas se midió la producción de gas a las 3, 6, 9, 12, 24, 35, 48, 72, 96 y 120 horas. Transcurridas 24 horas de incubación, en las otras dos botellas se obtuvo una muestra del medio de incubación para analizar su concentración en ácidos grasos volátiles (AGV), se midió la producción de gas y se recogió una muestra del mismo para analizar su concentración en metano. Al cabo de 120 horas de incubación los botes se introdujeron en un baño de hielo para detener la fermentación, se abrieron y su contenido se filtró utilizando crisoles provistos de una placa porosa. El residuo se lavó con 50 ml de agua destilada, se secó en estufa a 60°C durante 48 horas, se pesó y se analizó su contenido en cenizas para determinar la desaparición de MO.

Los datos de producción de gas se ajustaron al modelo: $y = b\ (1 - e^{(-c(t-lag))})$, en el que *c* representa el ritmo de producción de gas. El efecto de la suplementación nitrogenada sobre la fermentación *in vitro* de cada forraje se estudió mediante análisis de varianza y se realizaron los siguientes contrastes ortogonales: C1 (control *vs* urea y caseína) y C2 (urea *vs* caseína).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tal como figura en la Tabla 2 existieron diferencias entre forrajes en la respuesta obtenida a la suplementación nitrogenada. La suplementación con N produjo un aumento ($P<0,05$) del ritmo de producción de gas (*c*) en todos los forrajes, excepto en el HG. La suplementación con caseína produjo mayores valores de *c* para el HPP ($P<0,05$), *E. arborea* ($P<0,01$) y *C. vulgaris* ($P<0,01$) que la suplementación con urea. Estos resultados podrían indicar que el ritmo de fermentación *in vitro* de estas muestras fue superior cuando los microorganismos ruminales dispusieron de una fuente de N proteico (caseína) que cuando dispusieron de N no proteico (NNP; urea). Estos resultados concuerdan con la mayor producción de metano (24 horas de incubación) observada cuando las muestras se incubaron con caseína, aunque en el caso de *E. arborea* la diferencia no llegó a alcanzar el nivel de significación estadística ($P>0,05$). Por otra parte, la producción de AGV tras 24 horas de incubación fue superior cuando *E. arborea* y *C. vulgaris* se incubaron con caseína que cuando lo hicieron con urea. Sin embargo, en el caso del heno de trébol y el HG la suplementación nitrogenada no afectó ($P>0,05$) a la producción de metano y de AGV tras 24 horas de incubación, ni tampoco existieron diferencias ($P>0,05$) entre la caseína y la urea. Estos dos forrajes son los que presentaron una menor deficiencia en N degradable (ver Tabla 1) y es posible que el N (amoniacal y proteico) aportado con el inóculo ruminal haya podido subsanar esta deficiencia, impidiendo así que se manifestase el efecto de la suplementación nitrogenada.

El hecho de que la suplementación con caseína favoreciese la fermentación *in vitro* en mayor medida que la suplementación con urea en aquellos forrajes más deficientes en N degradable concuerda con los resultados obtenidos por otros autores. Así, Griswold et al. (1996) y Carro y Miller (1999), en experimentos realizados *in vitro* (fermentadores), han señalado aumentos en la producción de metano y de AGV cuando el NNP (amoníaco) se sustituyó por N proteico (proteína de soja). Estos autores también observaron un aumento de la degradabilidad de la fibra cuando los microorganismos ruminales dispusieron de N proteico. En nuestro experimento no se determinó la degradabilidad de la fracción fibrosa de los forrajes, pero no existieron

diferencias (P>0,05) entre tratamientos en la DMO tras 120 horas de incubación en ninguno de los forrajes (Tabla 2). Sin embargo, hay que considerar que la DMO determinada en nuestro experimento es una desaparición "aparente", ya que el residuo de la incubación está formado por el residuo del forraje no degradado y por la masa microbiana asociada al mismo.

Los resultados obtenidos sugieren que la suplementación de forrajes deficientes en N degradable con N proteico (caseína) podría tener un mayor efecto estimulante de la fermentación ruminal *in vitro* que la suplementación con NNP (urea).

Tabla 2. Ritmo de producción de gas (*c*), producción de metano (mmol) y de ácidos grasos volátiles (AGV; mmol) tras 24 h de incubación *in vitro* y desaparición de materia orgánica (DMO) tras 120 h de incubación *in vitro*

	H. trébol	HG	HPP	*E. arborea*	*C. vulgaris*
c (%/h)					
Control	5,94	3,86	1,79	4,60	3,76
Urea	7,37	4,26	1,95	7,25	4,26
Caseína	7,50	3,99	2,55	11,25	5,77
e.e.d.[1]	0,153	0,183	0,170	0,732	0,402
C1[2]	***	NS	*	**	*
C2[2]	NS	NS	*	**	**
Metano					
Control	0,390	0,461	0,311	0,181	0,245
Urea	0,396	0,463	0,327	0,214	0,288
Caseína	0,400	0,468	0,341	0,223	0,308
e.e.d.[1]	0,0599	0,0046	0,0045	0,0073	0,0049
C1[2]	NS	NS	***	***	***
C2[2]	NS	NS	*	NS	**
AGV					
Control	1,64	1,69	1,29	1,09	1,22
Urea	1,68	1,73	1,37	1,14	1,23
Caseína	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	*	**
DMO (%)					
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

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

[2] Significación estadística de los contrastes; NS: P>0,05; †: P<0,10; *: P<0,05; **: P<0,01 y ***: P<0,001; C1: *control vs urea* y *caseína*; C2: *urea vs caseína*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARC, 1980. *The Nutrient Requirements ot Ruminant Livestock.* Technical Review by an Agricultural Research Council Working Party. C.A.B. Farnham Royal, England.

Carro, M.D. and Miller, E.L. 1999. *Br. J. Nutr.* (En prensa).

Goering, M.K. and Van Soest, P.J. 1970. *Forage fiber analysis (apparatus, reagents, procedures and some applications).* Agricultural Handbook, nº 379. Agricultural Research Services, USDA. Washington DC, USA.

Griswold, K.E., Hoover, W.H., Miller, T.K. and Thayne, W.V. 1996. *J. Animal Sci.*, 74: 483-491.

Menke, K.H. and Steingass, H. 1988. *Anim. Res. Dev.*, 28: 7-55.

Russell, J.B., O'Connor, J.D., Fox, D.G., Van Soest, P.J. and Sniffen, C.J. 1992. *J. Animal Science,* 70:3551-3561.