



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA

CONSTITUYENTES QUÍMICOS, PRODUCCIÓN DE GAS Y
ESPUMA POR LA FERMENTACIÓN *In vitro* DE ESTRATOS DE
ALFALFA CON DISTINTA EDAD DE REBROTE

T E S I S

QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS EN
PRODUCCIÓN ANIMAL**

P R E S E N T A

LUIS ENRIQUE GONZÁLEZ GUTIÉRREZ



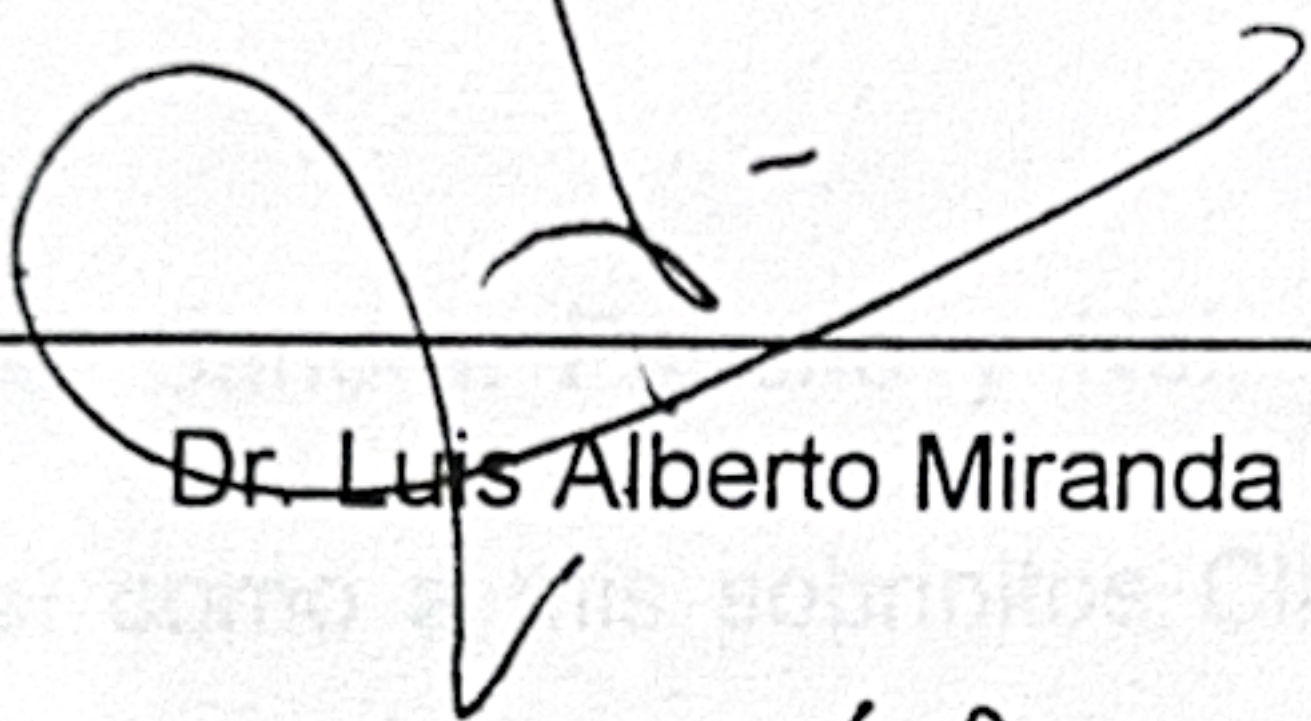
**Junio de 2003
Chapingo, Estado de México**

CONSTITUYENTES QUÍMICOS, PRODUCCIÓN DE GAS Y ESPUMA POR
LA FERMENTACIÓN *In vitro* DE ESTRATOS DE ALFALFA CON
DISTINTA EDAD DE REBROTE

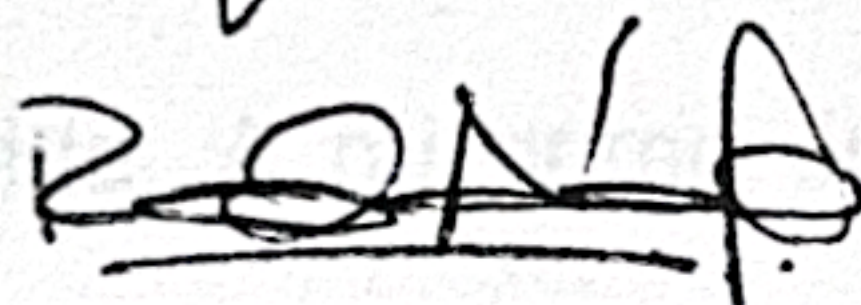
Tesis realizada por Luis Enrique González Gutiérrez bajo la dirección del
Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito
parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN ANIMAL

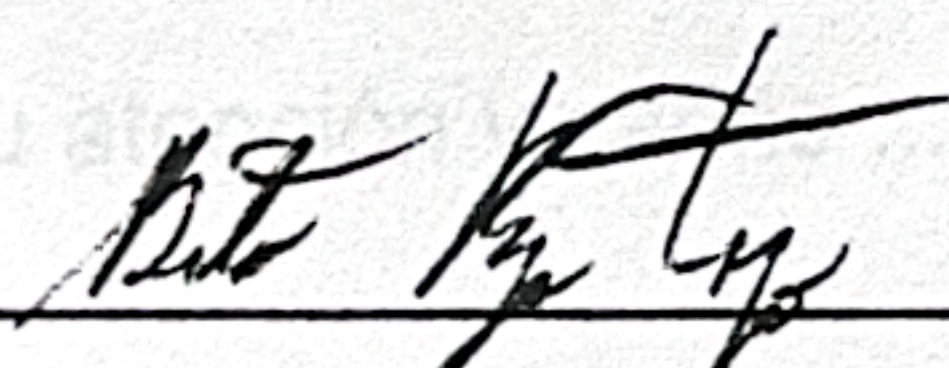
DIRECTOR:


Dr. Luis Alberto Miranda Romero

ASESOR:


Ph. D. Ricardo D. Améndola Massiotti

ASESOR:


M.C. Benito Reyes Trejo

A. 2882

A. T 2882

DEDICATORIA

A mi mamá, la persona más maravillosa del mundo, porque con su amor, paciencia y carácter ha sabido sacarnos adelante aun cuando las adversidades han sido muchas, no hay palabras para describir lo que representas para mí.

A la memoria de padre Antonio y de Claudia (q.e.p.d), porque en el poco tiempo que estuvimos juntos me enseñaste a luchar, a nunca rendirme, porque no hay imposibles.

A mis hermanos Male, Sandra, Pancho y Nel, por el apoyo mutuo en los momentos difíciles, así como a mis sobrinitos Claudia, El gordo y Gaby que han venido a alegrar mi vida.

A ti por tu atención y cariño ...

Luis Enrique

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo y el Posgrado en Producción Animal, por darme la oportunidad desarrollarme académicamente.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el financiamiento de mis estudios.

Al Comité Asesor Dr. Luis Alberto Miranda Romero, Ph.D. Ricardo D. Améndola Massiotti y Dr. Benito Reyes Trejo, por su importante contribución y atinadas observaciones para mejorar este trabajo.

A mis amigos del equipo de fútbol americano “Toros Salvajes” y del posgrado en producción animal por su amistad y momentos agradables.

DATOS BIOGRÁFICOS

1. DATOS PERSONALES

Nombre: Luis Enrique González Gutiérrez
Fecha de nacimiento: 15 de abril de 1977
Lugar de origen: Irapuato, Guanajuato
Profesión: Ingeniero Agrónomo Especialista en Zootecnia
Cédula profesional 3610684

2. FORMACIÓN ACÁDEMICA

1984-1990 Escuela Primaria Rural “Juan Escutia”, San José de la Laguna, Municipio de Irapuato, Guanajuato.⁸⁵
1990-1993 Escuela secundaria Técnica No. 13, Estación Joaquín Municipio de Abasolo, Guanajuato.
1993-1996 Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo Estado de México.
1996-2000 Licenciatura: Departamento de Zootecnia en la Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo Estado de México.
2001-2002 Maestría en Producción Animal en el Departamento de Zootecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Estado de México.

INDICE

DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
DATOS BIOGRÁFICOS	v
INDICE	vi
LISTA DE CUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
CAPITULO 3.....	ix
20	ix
CAPITULO 4.....	ix
34	ix
CAPITULO 1	1
INTRODUCCIÓN	2
CAPITULO 2	4
REVISIÓN DE LITERATURA	5
1. FACTORES DE LA PLANTA QUE INDUCEN EL TIMPANISMO	5
1.1. Proteína cruda y soluble	5
1.2. Pectinas	6
1.3. Saponinas.....	7
1.4. Lípidos	8
1.5. Clorofila	8
1.6. Otros constituyentes de la planta relacionados con timpanismo	9
2. CAMBIOS EN EL AMBIENTE RUMINAL DE ANIMALES TIMPANIZADOS	9
3. FACTORES AMBIENTALES QUE INDUCEN EL TIMPANISMO.....	11
4. FACTORES DE LOS ANIMALES QUE INDUCEN EL TIMPANISMO.....	12

LITERATURA CITADA	14
CAPITULO 3	19
CONSTITUYENTES QUÍMICOS Y CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE GAS DE FERMENTACIÓN In vitro DE ALFALFA A DISTINTA EDAD DE REBROTE	20
RESUMEN	21
ABSTRACT	22
INTRODUCCIÓN	23
MATERIALES Y MÉTODOS	24
RESULTADOS	27
DISCUSIÓN	29
CONCLUSIONES	32
LITERATURA CITADA.....	33
CAPITULO 4	39
CONSTITUYENTES QUÍMICOS Y CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE GAS Y ESPUMA DURANTE LA FERMENTACIÓN In vitro DE ESTRATOS DE ALFALFA CON DISTINTA EDAD DE REBROTE	40
RESUMEN	41
ABSTRACT	42
INTRODUCCIÓN	43
MATERIALES Y MÉTODOS	44
RESULTADOS	47
DISCUSIÓN	50
CONCLUSIONES	52
LITERATURA CITADA.....	53

LISTA DE CUADROS

CAPITULO 3	20
Cuadro 1. Parámetros de los constituyentes químicos, cinética de producción de gas, producción de gas fraccional en 3 horas y pH durante la digestión in vitro de alfalfa con distinta edad de rebrote.....	37
Cuadro 2. Correlaciones entre los componentes químicos de alfalfa, cinética de producción de gas y volumen de gas fraccional in vitro de alfalfa a distintas edad de rebrote.	38
CAPITULO 4	39
Cuadro 1. Media de cuadrados mínimos de variables de cinética de producción de gas a diferente edad de rebrote y estrato de alfalfa.....	56
Cuadro 2. Coeficientes de correlación entre componentes químicos, producción de gas y espuma in vitro de estratos de alfalfa con distinta edad de rebrote. ...	57

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO 3.....	20
Figura 1. Producción de gas acumulado durante la fermentación <i>in vitro</i> de alfalfa con distinta edad de rebrote.....	38
CAPITULO 4.....	34
Figura 1. Contenido de fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) en estratos de alfalfa con distinta edad de rebrote.....	58
Figura 2. Contenido de proteína cruda (PC) en estratos de alfalfa con distinta edad de rebrote.....	58
Figura 3. Relación hoja:tallo (RHT) en estratos de alfalfa con distinta edad de rebrote.....	59
Figura 4. Producción de gas acumulado de estratos de alfalfa con distinta edad de rebrote durante su fermentación <i>in vitro</i>	59

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN

Alfalfa (*Medicago sativa* L.) es una de las especies forrajeras más ampliamente distribuidas en el mundo, es la leguminosa forrajera con mayor superficie sembrada (Quiros y Bauchan, 1988). Sin embargo, es un forraje considerado de alto riesgo timpanizante en sistemas de pastoreo, principalmente cuando el forraje es pastoreado en estado vegetativo (Popp *et al*, 2000). El alto contenido de proteínas solubles de las hojas (Majak *et al.*, 1995), o de nitrógeno total y soluble en la planta (Hall y Majak, 1991) se han relacionado con la inducción del timpanismo.

El timpanismo es un desorden metabólico de los rumiantes que se caracteriza por acumulación de gases en el retículo-rumen, causado por la formación estable y constante de espuma en el contenido ruminal asociada con la ingestión de ciertos alimentos; leguminosas altamente productivas y pastos tiernos, principalmente. La imposibilidad de eructar los gases producidos por la fermentación del alimento provoca una sobredistensión del rumen, pudiendo causar la muerte por asfixia (Clarke y Reid, 1969; Mc Donald, 1981; Rumbaugh, 1984; Davies, 1987; Muslera y Ratera, 1991). Se han diferenciado dos tipos de timpanismo (Blood, 1988), el primario o espumoso que se presenta más comúnmente en animales en pastoreo alimentados con leguminosas o dietas altas en grano y el secundario que es propiciado por una obstrucción física para liberar los productos de la fermentación.

La incidencia de timpanismo es relativamente frecuente en nuestro país, sin embargo, no existen datos precisos de las pérdidas que ocasiona. En EE.UU.

(Howarth y Horn, 1983) reportan de 2 a 3 %, y en algunos casos hasta 20 %, de muertes atribuidas al timpanismo derivado de la alimentación por leguminosas. No obstante, el timpanismo crónico ocasiona una disminución del consumo de alimento y como consecuencia, disminución de la ganancia de peso, producción de leche y eficiencia alimenticia, lo cual se traduce en una disminución en la rentabilidad.

No se conoce con exactitud la etiología del timpanismo; pero se reconoce que es un fenómeno complejo que resulta de la interacción de numerosos factores del animal, la planta, microorganismos ruminales y de factores ambientales (Stanford *etal.*, 2001).

CAPITULO 2

REVISIÓN DE LITERATURA

1. FACTORES DE LA PLANTA QUE INDUCEN EL TIMPANISMO

Las leguminosas como *Onobrychis viciifolia*, *Lotus corniculatus* y *Astragalus cicer*, son plantas con bajo riesgo de inducir timpanismo, mientras que otras como alfalfa, trébol blanco y rojo son consideradas de alto riesgo timpanizante. Esta característica se halla muy relacionada con diferencias en composición química entre las dos categorías (Rumbaugh, 1984).

La etapa de madurez de alfalfa es reconocida como uno de los factores más importantes en la severidad del timpanismo, de tal modo que la probabilidad de que induzca timpanismo disminuye cuando el cultivo de alfalfa madura, debido a que aumentan los contenidos de materia seca y fibra, además de una disminución de Proteína cruda (Thompson *et al.*, 2000). Por su parte, Howarth *et al.* (1991) indicaron que el riesgo de timpanismo se duplicó cuando la altura de alfalfa fue menor a 25 cm en comparación cuando ésta fue mayor a 50 cm.

Las concentraciones de proteínas solubles, pectinas, saponinas, clorofila, lípidos, lipoproteínas, polisacáridos y taninos, son componentes de la planta que se han relacionado con timpanismo (Majak *et al.*, 1995; Rumbaugh 1984; Mathison *et al.*, 1999; Stifel *et al.*, 1968; McMahon *et al.*, 2000).

1.1. Proteína cruda y soluble

Anteriormente, la fracción I (ribulosa, bifosfato-carboxilasa) y II de la proteína de alfalfa fue considerada como el principal agente espumante en el rumen; sin embargo, Majak *et al.* (1995) reportaron una baja correlación con la incidencia de timpanismo y en cambio encontraron que el contenido de proteína soluble es el mejor indicador del potencial timpanizante de alfalfa. De igual manera Muslera y Ratera (1991) relacionaron la presencia de timpanismo en rumiantes alimentados con alfalfa en estado tierno, con alto contenido de proteína soluble que es considerada como el principal agente espumante. Rumbaugh (1984) menciona que la concentración de proteína soluble en alfalfa en crecimiento mostró cierto riesgo de timpanismo, lo cuál se puede acentuar al incrementar la fertilización nitrogenada, así como al usar cultivos con alta fijación de nitrógeno y en crecimiento a temperaturas alrededor de 18-26 °C.

Desde 1973 Jones y Lyttleton (1973) propusieron que aun concentraciones bajas de proteína soluble son suficientes para la formación, persistencia y estabilización de la espuma ruminal. No obstante, Coulman *et al.* (2000) no encontraron una correlación entre la concentración de proteínas solubles en el rumen y la incidencia de timpanismo en bovinos alimentados con alfalfa fresca.

Los resultados acerca de la influencia de la proteína cruda y soluble son variables, sin embargo, la mayoría de los trabajos indican que son el principal factor de la alfalfa relacionado con la formación de espuma ruminal y consecuentemente con la incidencia de timpanismo.

1.2. Pectinas

Las pectinas no son el agente espumante primario, pero pueden incrementar la viscosidad del líquido ruminal y actuar como estabilizante de la espuma (Van Soest, 1983; Rumbaugh, 1984; Muslera y Ratera, 1991). En un estudio realizado en condiciones *in vitro* con alfalfa fresca, se encontró una correlación $r^2=0.86$ entre la actividad de la enzima pectina metil esterasa que es la encargada de degradar la pectina y la formación estable de espuma (Rumbaugh, 1972). Aunque anteriormente Pressey *et al.* (1963) mencionaron las pectinas son degradadas rápidamente por enzimas extracelulares y microorganismos ruminales. Por lo que su efecto en la estabilización de la espuma es dudoso.

1.3. Saponinas

Las saponinas de alfalfa tienen una función importante en la formación de la espuma ruminal y en la incidencia de timpanismo en virtud de que pueden inhibir completamente las contracciones del retículo-rumen pocas horas después de haber sido consumidas (Klita *et al.*, 1996 y Mathison *et al.*, 1999). Adicionalmente, una alta cantidad de saponinas puede causar reducciones sustanciales en el número de protozoarios, la degradación ruminal de proteína del alimento, la disminución en el flujo de proteína microbiana al intestino delgado, y la menor digestibilidad del alimento (Klita *et al.*, 1996). Sin embargo, Majak *et al.* (1980), alimentando vacas fistuladas en rumen con alfalfa alta y baja en saponinas no encontraron diferencias en la cantidad de espuma presente en el contenido ruminal, ni en la incidencia de timpanismo. Por lo cual el efecto de las saponinas

en la incidencia de timpanismo es un hecho desconocido y es necesario realizar más investigación al respecto.

1.4. Lípidos

La función de los lípidos es reducir la tensión superficial del líquido ruminal y el espesor de la espuma (Rumbaugh, 1984; Davies, 1987). Se han encontrado relaciones negativas entre las concentraciones de fosfolípidos de los cloroplastos y la severidad del timpanismo (Stifel *et al.*, 1968). Por su parte Clarke *et al.*, 1974 encontraron que los lípidos polares presentes en las hojas de alfalfa, tienen propiedades antiespumantes. Mientras que Laby (1975), observó galactolípidos y carotenoides derivados de la membrana de los cloroplastos que se manifestaron en el contenido ruminal como espuma amarilla, a los cuales les atribuyó la formación inmediata de la espuma. Rumbaugh (1984) encontró que las lipoproteínas actúan como surfactantes y son las responsables de la estabilización y formación de espuma. Por el contrario, Howarth *et al.* (1977) no encontraron una función específica de las lipoproteínas de alfalfa en el desarrollo de la espuma del contenido ruminal.

De lo anterior podemos deducir que los lípidos por sí solos no tienen un efecto directo sobre la formación o estabilización de la espuma ruminal, más bien, el efecto es propiciado por la asociación con proteína o carbohidratos.

1.5. Clorofila

La clorofila, es un pigmento que se puede utilizar como marcador para estimar las partículas de cloroplastos suspendidos en el líquido ruminal, la clorofila que se encuentra en el fluido ruminal está correlacionada ($r^2=0.54$); con la clorofila de la alfalfa consumida (Majak *et al.*, 1985). Adicionalmente, los mismos autores también encontraron que la concentración de clorofila en el saco dorsal del rumen fue más alta ($P<0.05$) en bovinos timpanizados ($285 \mu\text{g mL}^{-1}$ frente a $189 \mu\text{g mL}^{-1}$ en animales no timpanizados). Majak *et al.* (1986b) reportaron que el nivel de clorofila en el fluido ruminal colectado 1.5 a 2 h después de la alimentación fue más alto (233 mg L^{-1} ; $P<0.01$) en los días que ocurrió timpanismo a diferencia de los días en los que no ocurrió (173 mg L^{-1}). Por su parte, Majak *et al.* (1986a) indicaron que las partículas de clorofila de alfalfa no son degradadas rápidamente por los microorganismos del rumen. Es difícil determinar si la clorofila tiene efecto directo sobre la incidencia de timpanismo, debido a que no se ha demostrado que actúe sobre algún factor determinante en la incidencia del timpanismo, y su presencia puede ser solamente circunstancial.

1.6. Otros constituyentes de la planta relacionados con timpanismo

La pared celular de las leguminosas timpanizantes es más delgada que la de leguminosas no timpanizantes, por lo que las bacterias ruminales toman menos tiempo para invadir y romper las células, liberando más rápidamente el contenido celular (Howarth *et al.*, 1991; Rumbaugh, 1984). Por lo que es posible que se

produzca gas de manera inmediata, así como espuma. No obstante, es necesario indagar más al respecto.

2. CAMBIOS EN EL AMBIENTE RUMINAL DE ANIMALES TIMPANIZADOS

Las partículas del alimento son colonizadas por bacterias lo que podría proveer un inóculo activo para la rápida fermentación de la ingesta, la producción de gas resultante puede incidir sobre la formación de espuma y consecuentemente sobre la incidencia de timpanismo (Majak *et al.*, 1986a). La población de *Streptococcus bovis* incrementa en animales timpanizados alimentados con alta cantidad de grano (Bartley *et al.*, 1983). Asimismo Cheng *et al.* (1976) encontraron que el crecimiento de *Streptococcus bovis* en medios líquidos sintéticos aumentó la viscosidad del medio de 1.5 cp a 8.0 cp adicionando 3% de sacarosa y hasta 112 cp con la adición de 6% de sacarosa. Lo anterior indica que la presencia de sacarosa influye directamente en la viscosidad del líquido ruminal que es el factor que propicia la estabilidad de la espuma ruminal, no obstante, es difícil que en condiciones normales del rumen se lleguen a presentar tales concentraciones de sacarosa, posiblemente pudieran presentarse en corrales de engorda con dietas altas en grano.

Mc Donald (1981) menciona que los microorganismos ruminales juegan un papel crítico en las reacciones que conducen al timpanismo. Se ha encontrado que la presencia de protozoarios holótricos ruminales aumenta la severidad e incidencia del timpanismo cuando se tienen altas cantidades de polisacáridos de reserva (Clarke y Reid, 1969), sin que lleguen a ser los causantes directos del timpanismo

por leguminosas. Por su parte Clarke y Hungate (1970) concluyeron que la incidencia de timpanismo no está relacionada con las diferencias en el número o especies de microorganismos ruminales.

Por otro lado Garry (1990) encontró valores de pH menores a 5.5 en animales timpanizados. Del mismo modo, McArthur y Miltimora (1966) reportaron valores de pH entre 5.5 y 6.0 en vacas lecheras timpanizadas alimentadas con alfalfa en condiciones de pastoreo.

Mientras tanto, Majak y Hall (1990) encontraron cambios drásticos en los niveles de minerales en un periodo de 1.5 a 2.5 horas después de la alimentación con alfalfa, además encontraron en el forraje altas concentraciones de Na^+ y bajas de K^+ . Posteriormente, Majak *et al.* (1995) en un estudio realizado con bovinos alimentados con alfalfa fresca encontraron que el timpanismo estuvo asociado con una baja concentración de Na^+ y una alta concentración de K^+ en el contenido ruminal. Además, los niveles de cationes bivalentes Mg^{+2} y Ca^{+2} fueron substancialmente más bajos y también estuvieron asociados positivamente con timpanismo.

No se ha encontrado evidencia causal acerca de la presencia de ciertos microorganismos o la concentración de algunos minerales sobre la incidencia de timpanismo por leguminosas. Los resultados citados en los párrafos anteriores pueden deberse únicamente a coincidencias circunstanciales, como en el caso de otros factores mencionados en otros puntos de esta revisión.

3. FACTORES AMBIENTALES QUE INDUCEN EL TIMPANISMO

El medio ambiente tiene influencia sobre la composición química de las plantas y su potencial timpanizante (Carámbula, 1977; Rumbaugh, 1984). Las condiciones climáticas precisas que conducen a que una pradera sea considerada como peligrosa aún no han sido claramente definidas (Mc Donald, 1981). Sin embargo, el riesgo de timpanismo puede decrecer durante los largos periodos nublados (Carámbula, 1977; Muslera y Ratera, 1991; Guyer y Alex, 1992). Por su parte Johnes (1954) menciona que de 94 casos de timpanismo la mayor incidencia ocurrió por la mañana (60 casos) hasta las 12:00 h, 23 casos de las 12:00 a 15:30 y 11 casos al anochecer.

Hall y Majak (1991) analizaron el efecto de las condiciones diarias del ambiente y observaron que existió correlación entre la incidencia de timpanismo y la temperatura máxima, la luminosidad y la precipitación (0.42, 0.69 y -0.84; respectivamente). En relación con lo anterior MacAdam y Whitesites (1996), encontraron que a bajas temperaturas, el contenido de clorofila y proteína soluble en hojas es mayor, por lo que el riesgo de timpanismo aumenta. Mientras que Hall y Majak (1995) mencionan que la hora y el tiempo de alimentación o pastoreo también pueden ser un factor que influyan en la incidencia de timpanismo, de tal modo que encontraron una incidencia mayor cuando la disposición de la dieta o el pastoreo se realizan más temprano y cuando el tiempo de alimentación es mayor.

Es indudable que las condiciones climáticas tienen un efecto indirecto sobre la presencia del timpanismo, sin embargo, la magnitud de este efecto es

desconocida. Si bien las condiciones climáticas son difíciles de manipular, el conocimiento de los efectos climáticos puede contribuir a proponer planes de manejo en los que se extremen precauciones de prevención de timpanismo bajo algunas condiciones climáticas.

4. FACTORES DE LOS ANIMALES QUE INDUCEN EL TIMPANISMO

Tanto investigadores en timpanismo como productores, han observado gran variación en la susceptibilidad animal al timpanismo (Clarke y Reid 1974). Algunos animales raramente se timpanizan, mientras que otros son muy susceptibles, lo cuál puede ser un factor para seleccionar los animales (Cockrem y McIntosh 1976). De la misma manera (Carámbula, 1977, Mc Donald, 1981 y Rumbaugh, 1984) observaron variabilidad en la susceptibilidad de los animales, lo que hace suponer que es un carácter heredable.

Muchas variables probablemente influyen en la susceptibilidad: etapa de la lactación, edad, fecha de parto, producción de grasa, salivación, tasa de suspensión y grado de selectividad al comer (Rumbaugh, 1984). Hay evidencia de que los animales *Bos taurus* son más susceptibles al timpanismo que los *B. Indicus* (Clarke *et al*, 1974; Davies, 1987). Asimismo se ha observado menor susceptibilidad en animales que permanecen casi siempre sobre praderas aún cuando éstas sean más o menos peligrosas (Muslera y Ratera, 1991).

Animales con mayor contenido ruminal (volumen) presentan mayor susceptibilidad al timpanismo, relacionado con una mayor salivación y líquido ruminal más viscoso (Cokrem *et al*, 1987). La tasa de pasaje de la fase líquida ruminal también puede

ser un factor que tiene influencia en la susceptibilidad al timpanismo y se relaciona con la salivación (Majak *et al*, 1986a). La saliva que es fuente de proteínas y los diferentes tipos de éstas en cada animal, plantean diferencias en la susceptibilidad al timpanismo (Clarke y Hungate, 1970). Las diferencias en la composición de la saliva de cada vaca en el líquido ruminal se debe a que algunas tienden a degradarse más rápido y esto puede ser correlacionado con la cantidad de proteína en la saliva. Las mucoproteínas de la saliva junto con la proteína de las hojas pueden contribuir en la formación de espuma de muy alta persistencia (Clarke y Reid, 1969; Jones y Lyttleton, 1973). Al respecto Clarke *et al*. (1974) encontraron que la mucosa salival es diferente entre animales con alta y baja susceptibilidad a timpanizarse. Además reportan que en promedio, la saliva de vacas con alta susceptibilidad tiene mayor cantidad de nitrógeno total, urea, amonio, y proteínas que vacas con menor susceptibilidad. En cuanto a la composición de la proteína de la mucosa salival, encontraron que la banda 4 es un componente salival muy frecuente en animales con alta susceptibilidad a timpanismo y ésta podría ser utilizada como marcador genético para programas de selección de ganado con baja susceptibilidad a timpanismo.

LITERATURA CITADA

- Bartley, E. E., T. G Nagaraja, E. S. Pressman, A. D. Dayton, M. P. Katz and L. R. Fina. 1983. Effects of lasalocid or monensin on legume or grain (feedlot) bloat. *J. Anim. Sci.* 56:1400-1406.
- Blood, D. C. 1988. *Medicina veterinaria*. Editorial Acribia. México, D. F. pp. 259-267.
- Carámbula, M. 1977. *Producción y manejo de pasturas sembradas*. Reimpresión. Ed. Hemisferio Sur. Montevideo, Uruguay. 464 pp.
- Cheng, K. W., R. Hironaka, G. A. Jones, T. Nicas, y J. W. Costerton. 1976. Frothy feedlot in bloat in cattle: production of extracellular polysaccharides and development of viscosity in cultures of *Streptococcus bovis*. *Can. J. Microbiol.* 22:450-459.
- Clarke, R. T. J. and C. S. W. Reid. 1969. Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant. Proceedings of the Third International Symposium. Cambridge, England. A. T. Phillipson (Ed.) Uriel Press. pp. 599-605.
- Clarke, R. T. J. and C. S. W. Reid. 1974. Foamy bloat of cattle. A review. *J. Dairy Sci.* 57:753-758.
- Clarke, R. T. J. and Hungate, R. E. 1970. Bloat in cattle. 35. Microbiological activities in the reticule-rumen of cows differently susceptible to legume bloat. *N. Z. J. Agric. Res.* 14:108-121.
- Clarke, R. T. J.; W. T. Jones and C. S. W. Reid. 1974. Bloat in Cattle. XLI. Proteins of saliva as a possible genetic markers in breeding programmes to reduce bloat susceptibility in cattle. *New Zealand J. Agric. Res.* 17: 411-415.
- Cockrem, F. R. M., J. T. McIntosh, R. D. McLaren and C. A. Morris. 1987. The relationship between volume of rumen contents and genetic susceptibility to pasture bloat in cattle. *Anim. Prod.* 45:43-47.
- Cockrem, F. R. M., y J. T. McIntosh. 1976. Genetics of susceptibility to bloat in cattle. *N. Z. J. Agric. Res.* 19: 177-183.

- Coulman B., B. Goplen, W. Majak, T. A. McAllister, K. J. Cheng, B. Berg, J. Hall, D. McCartney and S. Acharya. 2000. A review of the development of a bloat-reduced alfalfa cultivar. *Can. J. Plant. Sci.* 80:487-491.
- Davies, H. L. 1987. Limitations of Livestock Production Associated With Phytoestrogens and Bloat. *In: Temperature pastures*. Wheeler, J. L.; Pearson, C. J. and Robards G. E. Editors. Australian Wool Corporation/CSIRO. Australia. pp. 446-456.
- Garry F. Managing bloat in cattle. Symposium on bovine digestive diseases. *Vet Med* 1990:643-650.
- Guyer, P. Q. and Alex H. 1992. Bloat prevention and treatment. Cattleman's Library. New Mexico State University.
- Hall, J. W. and W. Majak. 1991. Relationship of weather and plant factors to alfalfa bloat in autumn. *Can. J. Anim. Sci.* 71: 861-866.
- Hall, J. W., W. Majak, A. L. Ryswyk, R. E. Howarth and C. M. Kalnin. 1988. The relationship of rumen cations and soluble protein with predisposition of cattle to alfalfa bloat. *Can. J. Anim. Sci.* 68: 431-437.
- Howarth, R. E., R. K. Chaplin, K. J. Cheng, B. P. Goplen, J. W. Hall, R. Hironaka, W. Majak and O. M. Radostits. 1991. Bloat in cattle. Agriculture Canada Publ. 1858/E. Ottawa, Ontario Canada.
- Howarth, R. E., W. Majak, D. E. Walden, S. A. Brandt, A. C. Fesser, B. P. Goplen and D. T. Spurr. 1977. Relationship between ruminant bloat and the chemical composition of alfalfa herbage. I. Nitrogen and Protein Fractions. *Can. J. Anim. Sci.* 57: 345-357.
- Howarth, R. E. and G. W. Horn. 1983. Wheat bloat pasture of stocker cattle: A comparison with legume pasture bloat *In: Horn, G. W. (Ed.) Proc. national wheat pasture Symp.*, pp 145-164. Oklahoma Agric. Exp. Station.
- Johnes, A. T. 1954. Bloat in cattle on red clover. *New Zealand J. Sci. Tech.* 36(4):289-320.
- Jones, W. T. and J. W. Lyttleton. 1973. Bloat in Cattle. XXXVIII The Foaming properties of rumen liquor. *New Zealand J. Agric. Res.* 16:161-168.

- Klita, P. T., G. W. Mathison, T. W. Fenton and R. T. Hardin. 1996. Effects of alfalfa root saponins on digestive function in sheep. *J. Anim. Sci.* 74: 1144-1156.
- Laby, R. H. 1975. Surface active agents in the rumen. *In: Digestion and metabolism in the ruminant.* McDonald, I. W. and A. C. I. Warner. Eds. University of New England Publishing Unit. Armidale, Australia. pp 537-550.
- MacAdam, J. W. and Whitesides R. E. 1996. Growth at low temperatures increases alfalfa leaf cell constituents related to pasture bloat. *Crop Sci.* 36:378-382.
- Majak W. and J. W. Hall. 1990. Sodium and potassium concentrations in ruminal contents after feeding bloat-inducing alfalfa to cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 70: 235-249.
- Majak W., J. W. Hall, L. M. Rode and C. M. Kalnin. 1986a. Rumen clearance rates in relation to the occurrence of alfalfa bloat in cattle. *J. Dairy Sci.* 69:1560-1567.
- Majak W., J. W. Hall, W. P. McCaughey. 1995. Pasture management strategies for reducing the risk of legume bloat in cattle. *J. Anim. Sci.* 73: 1493-1498.
- Majak, W., Hall, J. W. and Howarth, R. E. 1986b. The distribution of chlorophyll in rumen contents and the onset of bloat in cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 66:97-102.
- Majak, W., R. E. Howarth and P. Narasimhalu. 1985. Chlorophyll and protein levels in bovine fluid in relation to alfalfa pasture bloat. *Can. J. Anim. Sci.* 65: 147-156.
- Majak, W., R. E. Howarth, A. C. Fesser, B. P. Goplen and M. W. Pedersen. 1980. relationships between ruminant bloat and the composition of alfalfa herbage. II. Saponins. *Can. J. Anim. Sci.* 60: 699-708.
- Majak, W., R. E. Howarth, K. C. Cheng and J. W. Hall. 1983. Rumen conditions that predispose cattle to pasture bloat. *J. Dairy Sci.* 66:1683-1688.
- Mathison, G. W., R. Soofi-Siawash, P. T. Klita, E. K. Okine and G. Sedwick. 1999. Degradability of alfalfa saponins in the digestive tract of sheep and their rate of accumulation in rumen fluid. *Can. J. Anim. Sci.* 79: 315-319.

- Mc Donald, I. W. 1981. Detrimental substances in plants consumed by grazing ruminants. *In: Grazing animals*. Morley F. R. H. (Ed.) Amsterdam, Elsevier. pp. 354-355.
- McArthur, J. M. and J. E. Miltimore. 1966. Pasture bloat and the role of 18-S protein. *Proc. X. International Grassland Congress*, pp. 518-521.
- McMahon, L. R., T. A. McAllister, B. P. Berg, W. Majak, S. N. Acharya, J. D. Popp, B. E. Coulman, Y. Wang, K. J. Cheng. 2000. A review of the effects of forage condensed tanins on ruminal fermentation and bloat in grazing cattle. *Can. J. Plant. Sci.* 80: 469-485.
- Muslera, P. E. y X. Ratera X. 1991. Praderas y forrajes, producción y aprovechamiento. 2ª edición, Ed. Mundi Prensa. Madrid, España. 674 p.
- Popp J. D., W. P. McCaughey, R. D. H. Cohen, T. A. McAllister and W. Majak. 2000. Enhancing pasture productivity with alfalfa: A review. *Can. J. Plant. Sci.* 80: 513-519.
- Pressey, R., S. H. Synhorst, R. S. Allen, N. L. Jacobson and C. P. Wilsie. 1963. Pectic substances in forages and their relationship to bloat. *Agric. Food Chem.* 11:396.
- Quiros C. F., G. R. Baughan. 1988. The genus *Medicago* and the origin of the *Medicago sativa* complex. *In: AA Hanson, DK Barnes, and RR Hills Eds. Alfalfa and alfalfa improvement*. pp. 93-124.
- Rumbaugh, M. D. 1972. stable foam volume and pectin methyl esterase activity of forage mixtures. *Crop Sci.* 12: 47-49.
- Rumbaugh, M. D. 1984. Breeding bloat-safe cultivars of bloat-causing legumes. *In: forage legumes for energy-efficient animal production. In: Proceedings of a Trilateral Workshop Held in Palmerston North New Zealand. Barnes, R. F.; P. R. Ball, R. W. Brougham; G. C. Marten, and D. J. Minson, Editors. Palmerston North, New Zealand.* pp. 238-245.
- Stanford, K., Y. Wang, B. P. Berg, W. Majak, D. H. McCartney, S. V. Baron and T. A. McAllister. 2001. Effects of alcohol ethoxylate and pluronics detergents on the development of pasture bloat in cattle and sheep. *J. Dairy Sci.* 84:167-176.

- Stifel, F. B., R. L. Vetter and R. S. Allen.1968. Relationship between calcium and magnesium binding to fraction I chloroplast protein and bloat. J. Agric. Food Chem. 16: 500-504.
- Thompson, D. J., B. M. Brooke, G. J. Garland, J. W. Hall and W. Majak.2000. Effect of stage of growth of alfalfa on the incidence of bloat in cattle. Can. J. Anim. Sci.80: 725-727.
- Van Soest, P. 1983. Environment and forage. *In*: Nutritional ecology of the ruminant: metabolism, nutritional strategies, the cellulolytic fermentation and chemistry of forages and fibers. Cornell University. O & B Books. USA. pp. 58-75.

CAPITULO 3

CONSTITUYENTES QUÍMICOS Y CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE GAS DE FERMENTACIÓN *In vitro* DE ALFALFA A DISTINTA EDAD DE REBROTE

Luis Enrique González Gutiérrez^b, Luis Alberto Miranda Romero^b, Ricardo D.
Améndola Massiotti^b, Benito Reyes Trejo^c

^a Artículo para ser sometido a su posible publicación en la revista TÉCNICA PECUARIA

^b Posgrado en Producción Animal. Departamento de Zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco. km 38.5. Tel. 595 (9521621); lmiranda@taurus1.chapingo.mx. Correspondencia y solicitud de separatas al segundo autor.

^c Departamento de Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México- Texcoco km 38.5.

RESUMEN

CONSTITUYENTES QUÍMICOS Y CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE GAS *in vitro* DE ALFALFA CON DISTINTA EDAD DE REBROTE

González Gutiérrez Luis Enrique, Miranda Romero Luis Alberto, Améndola Massiotti Ricardo, Reyes Trejo Benito

Se determinó el efecto de la edad de rebrote (ER; 21, 28, 35 y 42 días) de alfalfa sobre el contenido de fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA), carbohidratos solubles en alcohol (CSA), proteína cruda (PC), materia seca (MS), y en la cinética de producción de gas (CPG) durante su fermentación *in vitro*. La CPG se ajustó por medio del modelo $V_t = V_{\max} / (1 + \exp^{(2-4 \cdot S \cdot (t-L))})$ para obtener los parámetros de volumen máximo de gas acumulado ($V_{\max}$; mL g⁻¹), tasa de producción de gas (S; ln mL h⁻¹) y fase de retardo (L; h). También se determinó volumen de gas fraccional y acumulado durante las primeras tres horas de fermentación. Se utilizó un diseño de bloques completos al azar con submuestreos, las medias se compararon mediante la prueba de Tukey y se correlacionaron las variables entre sí. El contenido de MS, FDN y FDA aumentó ($P < 0.01$) y el de PC y CSA disminuyó ($P < 0.01$) conforme la ER de alfalfa fue mayor. El $V_{\max}$ producido por alfalfa de 35 días de ER fue mayor ($P < 0.01$) que el producido por alfalfas de 21 y 42 días de ER, pero no difirió ($P > 0.01$) del producido por alfalfa de 28 días de ER. La S disminuyó de acuerdo a la ER, siendo mayor ($P < 0.01$) para alfalfa de 21 días que para las de 28 y 35 días, aunque fue similar ($P < 0.01$) a la de 42 días de ER. El volumen de gas acumulado (V_A) en 3 horas de fermentación fue mayor ($P < 0.01$) en alfalfa de 28 o menos días de ER que en alfalfa de 35 y 42 días de ER. El $V_{\max}$ se correlacionó ($P < 0.01$) con la proporción de FDA, FDN ($r^2 = 0.57$) y PC ($r^2 = -0.64$). El contenido de CSA se correlacionó ($P < 0.01$) con S ($r^2 = 0.54$) y V_A ($r^2 = 0.76$). El mayor $V_{\max}$ fue obtenido con alfalfa de 35 días de ER, a pesar de contener menos PC y CSA. Además debido a esto último la alfalfa de 35 días de ER presenta menos riesgo de inducir timpanismo ya que su proporción de PC así como la S son menores que alfalfa de 21 días de ER.

Palabras clave: alfalfa, edad de rebrote, composición química, fermentación *in vitro*, timpanismo

ABSTRACT

CHEMICAL CONSTITUENTS AND GAS PRODUCTION KINETICS OF FERMENTATION *in vitro* OF ALFALFA WITH DIFFERENT AGE

González Gutiérrez Luis Enrique, Miranda Romero Luis Alberto, Améndola Massiotti Ricardo, Reyes Trejo Benito

This study was aimed to measure the effect of the stage of regrowth of alfalfa (SR; 21, 28, 35 y 42 days) on the contents of neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF), acid soluble carbohydrates (ASC), crude protein (CP) and dry matter (DM) and on gas production kinetics (GPK) during *in vitro* fermentation. The GPK was adjusted using the model $V_t = V_{\max} / (1 + \exp^{(2-4 \cdot S \cdot (t-L))})$ in order to estimate the maximum volume of gas accumulated ($V_{\max}$; mL g⁻¹), the rate of gas production (S ; ln mL h⁻¹), and the lag phase (L ; h). The fractional gas volume and the volume of gas accumulated during the first three hours of fermentation were also measured. A random block design with sub-sampling was used, means were compared using Tukey's test and correlations among variables were analyzed. With increasing stages of regrowth, the contents of DM, NDF and ADF increased ($P < 0.01$) and those of CP and ASC decreased ($P < 0.01$). The maximum volume of gas accumulated by alfalfa at 35 days SR was higher than those accumulated by alfalfa at 21 or 42 days SR, though it did not differ from that accumulated by alfalfa at 28 days SR. The rate of gas production decreased with increasing SR, being higher ($P < 0.01$) with alfalfa at 21 days SR than with alfalfa at 28 or 35 days SR, though it did not differ from that of alfalfa at 42 days SR. The volume of gas accumulated after 3 hours of fermentation (V_A) was higher with alfalfa at 28 or less days SR ($P < 0.01$). The maximum volume of gas accumulated correlated ($P < 0.01$) with the contents of ADF ($r = 0.57$), NDF ($r = 0.57$) and CP ($r = -0.64$). The ASC content correlated ($P < 0.01$) with S ($r = 0.54$) and V_A ($r = 0.76$). The highest value of $V_{\max}$ was achieved with alfalfa at 35 days SR, even though its ASC and CP contents were lower. Due to the lower CP content and lower S alfalfa at 35 days SR represents lower bloat risks than alfalfa at 21 days SR.

Key words: alfalfa, stage of regrowth, chemical composition, *in vitro* fermentation, bloat

INTRODUCCIÓN

La alfalfa (*Medicago sativa* L.) es un forraje de alto riesgo timpanizante en sistemas de pastoreo, cuando es pastoreada en estado vegetativo (1). En ocasiones el timpanismo también se presenta en animales estabulados (2). El timpanismo tiene una etiología multifactorial que resulta de la interacción de factores relacionados con el animal, la planta, los microorganismos ruminales y el ambiente (3).

En el caso de la alfalfa, los contenidos de proteínas solubles de las hojas (2) y, de proteína total y soluble en el total de la planta son los principales factores relacionados con la incidencia de timpanismo (4). Existen otros factores de la planta como los contenidos de saponinas (5), pectinas (6) y taninos (7) que se han vinculado con dicho padecimiento, aunque en menor grado.

La severidad del timpanismo depende de la cantidad de espuma formada y su estabilidad. La formación de espuma esta relacionada estrechamente con la producción de gas por lo que esta es una variable que debe ser considerada en estudios de esta naturaleza. Recientemente se ha usado la técnica de producción de gas para estimar la digestión de los forrajes *in vitro* (8). En algunos estudios la producción de gas se ha considerado como una variable relacionada con el timpanismo (9).

La etapa de madurez de la alfalfa es reconocida como uno de los factores más importantes en la severidad del timpanismo, ya que la probabilidad de que induzca timpanismo disminuye cuando la planta es más madura (10). Sin embargo, no se

ha precisado una edad de rebrote a la cual sea más probable dicho padecimiento, ya que los principales factores que inducen el timpanismo dependen de condiciones ambientales y del propio animal. En consecuencia, el propósito de la presente investigación fue analizar la relación entre los cambios ocurridos en la composición química de la alfalfa a medida que aumenta la edad de rebrote y la producción de gas durante su fermentación *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento llevó a cabo en el módulo de producción de leche en pastoreo y las instalaciones del laboratorio de microbiología pecuaria de la Universidad Autónoma Chapingo, a una altitud de 2,250 m. El clima es templado subhúmedo, con lluvias en verano y 645 mm de precipitación anual. La variación de la temperatura es de 12 a 18 °C (11).

Tratamientos. Los tratamientos consistieron en alfalfa variedad San Miguelito de 3 años de edad cosechada a cuatro edades de rebrote (ER; 21, 28, 35 y 42 días), en tres fechas de corte (FC; 22, 29 de abril y 6 de mayo del 2002). El material vegetal se procesó en el laboratorio para llevar a cabo el análisis químico y la prueba de producción de gas correspondiente.

Análisis químico. Las muestras de alfalfa se secaron por separado en una estufa a 55 °C hasta peso constante para determinarles el contenido de materia seca (MS). Posteriormente se molieron en un molino provisto de una criba de 1 mm de diámetro. En el laboratorio se determinó la concentración de proteína cruda (PC),

fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA) (**12**) y carbohidratos solubles en alcohol (CSA, **13**).

Cinética de Producción de gas. Se determinaron los parámetros de la cinética de producción de gas, para lo cual se usaron dos gramos de alfalfa fresca recién cosechada. Las muestras se maceraron en un mortero e inmediatamente se colocaron en frascos de vidrio color ámbar de 120 mL de capacidad. Posteriormente, se adicionaron 95 mL de inóculo ruminal estandarizado y un flujo continuo de CO₂. Inmediatamente después, el flujo de CO₂ se retiró y el frasco se cerró con un tapón de goma y una tapa de rosca horadada al centro. El excedente de gas de los frascos se extrajo para igualar la presión interior a cero e inmediatamente se colocaron en baño maría a 39 °C. La presión de gas generado por la fermentación del sustrato se midió con un manómetro (1 kg cm⁻²) a 1, 2, 4, 6, 8, 10, 14, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 66, 78, 90, 102, 114, 126 y 138 horas de incubación *in vitro*. Después de cada lectura la presión de gas se igualó nuevamente a cero. Se usaron tres blancos que contenían solamente líquido ruminal estandarizado sin sustrato, los cuales sirvieron para corregir la presión de gas debida a la fermentación de las partículas de digesta que llevaba el inóculo. Los datos de presión (kg cm⁻²) fueron transformados a volumen de gas (mL g⁻¹ MS) por medio de la ecuación de regresión $V = (P + 0.0273)/0.0186$, donde P es la presión de gas (kg cm⁻²) ejercida por volúmenes de gas conocidos (V, mL) que se inyectaron a los frascos, la ecuación se obtuvo por correlación de ambas variables. Los datos de volumen de gas acumulado en cada tiempo de medición se usaron para estimar los parámetros de la cinética de producción de gas por

medio del modelo logístico (8) $V_t = V_{\max}/(1+\exp^{(2-4*S*(t-L)})$, donde V_t es el volumen de gas estimado (mL) a determinado tiempo (h), $V_{\max}$ el volumen máximo de gas acumulado ($\text{mL g}^{-1}\text{MS}$) el cual representa la fermentación potencial del sustrato, S es la tasa de producción de gas (ln mLh^{-1}) y L es una constante equivalente a la fase de retardo, la cual representa el tiempo que tarda en iniciarse la fermentación del forraje.

Producción de gas fraccional y acumulado en 3 horas. Se determinó el volumen fraccional de gas a 1 (V_1) y dos horas después (V_3), así como el volumen de gas acumulado en 3 horas (V_A) de fermentación ruminal *in vitro* de alfalfa. Se siguió el procedimiento descrito anteriormente con ligeras diferencias, se usaron frascos de 70 mL de capacidad, a los que se les agregó un gramo de alfalfa fresca y 60 mL de líquido ruminal estandarizado. Adicionalmente, a las tres horas de incubación se determinó el pH por medio de un potenciómetro (Felisa[®], pH metro). Para transformar los datos de presión a volumen de gas en $\text{mL g}^{-1}\text{MS}$ en este tipo de frascos se usó la ecuación de regresión $V = (P-0.0197)/0.0361$, la cual se obtuvo de la manera ya descrita.

Líquido ruminal estandarizado. El inóculo se preparó mezclando la muestra del contenido ruminal de dos borregos adultos fistulados en rumen con peso vivo de 72 ± 1.2 kg, los cuales se alimentaron con heno de alfalfa *ad libitum*. El fluido ruminal se filtró por 8 capas de gasa. La muestra de fluido ruminal se diluyó en una proporción 1:2 con una solución mineral reducida (14) compuesta de Na_2CO_3 , 4.0 g; K_2HPO_4 , 0.045 g; KH_2PO_4 , 0.045 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.045 g; NaCl , 0.09 g;

MgSO₄, 0.0184 g; CaCl₂.H₂O, 0.0075 g; NaOH, 0.188 g; Na₂S, 0.047 g; Cisteína 0.047 g y una gota de resarzurina al 1%, por litro de solución.

Diseño experimental y arreglo de tratamientos. Se utilizó un diseño experimental en bloques completos al azar con tres submuestras, los bloques estuvieron representados por las fechas de muestreo. Las unidades experimentales fueron parcelas de un metro cuadrado, de las cuales se obtuvieron 3 submuestras que se manejaron como repeticiones dentro de tratamiento. La comparación de las medias se realizó por medio de la prueba de Tukey usando el paquete computacional SAS[®] (15). Las variables de composición química se correlacionaron con las de fermentación *in vitro* utilizando el procedimiento CORR de SAS[®] (15).

RESULTADOS

El análisis de varianza no mostró efecto significativo para FC, ni para la interacción FC×ER por lo cual no se presentan los resultados correspondientes a dichas fuentes de variación.

En el Cuadro 1 se presentan los resultados de la comparación de medias para los constituyentes químicos y cinética de producción de gas de alfalfa. El contenido de PC disminuyó ($P<0.01$) conforme aumentó la ER. Igualmente, el porcentaje de CSA disminuyó ($P<0.01$) con la ER aunque las diferencias entre 21 y 28 días de ER y entre 35 y 42 días de ER no fueron significativas. Por el contrario las proporciones de FDA, FDN y MS aumentaron ($P<0.01$) al avanzar la ER de alfalfa. El contenido de FDA en alfalfa de 21 días de ER fue menor ($P<0.01$) que en

alfalfa de mayor ER, mientras que la proporción de FDN y MS fueron superiores en alfalfa de 42 días de ER.

El V_{max} mostró una tendencia cuadrática, donde el mayor volumen ($P<0.01$) se produjo por la fermentación de alfalfa de 35 días de ER, mientras que en alfalfa de menor o mayor ER el V_{max} fue menor, sin diferir de la de 28 días de ER. La tasa de producción de gas (S) fue alta ($P<0.01$) para la fermentación de alfalfa con 21 días comparada con alfalfa de 28 y 35 días de ER. La variable fase de retardo (L) mostró diferencias ($P<0.01$) solamente entre alfalfa de 28 y 42 días de ER.

En la Figura 1 se muestran las curvas de producción de gas de alfalfa con distinta ER, ajustadas con el modelo logístico. La mayor producción de gas acumulado durante 138 horas de fermentación *in vitro* se obtuvo con alfalfa de 35 días, aunque la diferencia con la de 28 días de ER no fue significativa (Cuadro 1). A pesar de que en la Figura 1 no se aprecian diferencias entre los volúmenes de gas producidos por la fermentación de alfalfa con distinta ER, dado que las líneas se traslapan, los resultados del ensayo dirigido a determinar la producción de gas acumulado en las primeras tres horas de fermentación muestran que sí se presentaron diferencias en el volumen de gas producido (Cuadro 1).

En la primera hora de fermentación (V_1) se produjo más gas ($P<0.01$) por la fermentación de alfalfa de 21 y 28 días que por la fermentación de alfalfa de 35 y 42 días de ER. Sin embargo, luego de dos horas más de fermentación (volumen de gas V_3) la única diferencia consistió en que alfalfa de 42 días de ER produjo menos gas ($P<0.01$). El volumen acumulado en tres horas (V_A) fue mayor ($P<0.01$)

para alfalfa de 28 o menos días de ER que para alfalfa de 35 y 42 días de ER (Cuadro 1).

Las correlaciones entre las variables de producción de gas y los constituyentes químicos de alfalfa se muestran en el Cuadro 2. Respecto a los parámetros de la cinética de producción de gas, el V_{max} se correlacionó positivamente ($P < 0.01$) con la proporción de FDA y FDN y negativamente ($P < 0.01$) con el contenido de PC. Por otro lado S se correlacionó positivamente ($P < 0.01$) con el contenido de CSA y negativamente ($P < 0.01$) con el pH. En lo que se refiere a las variables de producción de gas durante las primeras tres horas de fermentación, tan solo los CSA tuvieron una correlación altamente positiva con V_1 y V_A .

DISCUSIÓN

Los cambios en composición química de alfalfa con distinta madurez han sido reportados por varios investigadores. Al respecto, en varios estudios (**16**, **17**) se encontró una disminución del contenido de PC y un aumento en la proporción de FDA y FDN conforme la edad de alfalfa avanzó. En el presente estudio se corroboró que a medida que avanza la madurez de alfalfa hay una reducción del porcentaje de PC y un aumento de la FDA y FDN, lo cual se debe a un incremento en los componentes estructurales de la planta que son depositados principalmente en tallo (**18**) y en consecuencia una disminución de los demás componentes, incluyendo la proteína. De igual manera en otro estudio (**10**) se encontró un aumento en la proporción de MS y FDA y una disminución de PC al avanzar la madurez de alfalfa, así como una menor incidencia de timpanismo.

Uno de los factores relacionados con el timpanismo es el volumen de gas producido por la fermentación postpandrial del alimento. Se ha demostrado (9, 19) que la producción de gas generado por la fermentación de alfalfa es superior ($P < 0.05$) que el producido con *Onobrychis viciaefolia*, una leguminosa de bajo índice timpanizante, o por *Dactylis glomerata* en las primeras horas de fermentación *in vitro*. La producción de gas en las primeras horas se atribuye a la fermentación de carbohidratos solubles como azúcares, almidón y pectinas (9) lo cual puede hacer la diferencia en la fermentación de la alfalfa y los otros forrajes indicados. El V_A en las primeras 3 horas de fermentación en el presente experimento fue superior en alfalfa de 28 o menos días de ER. Estos forrajes tiernos contuvieron una proporción mayor de CSA (Cuadro 1) lo cual se correlacionó altamente con la producción de gas en las primeras tres horas de fermentación (Cuadro 2).

La concentración de proteína total y soluble en el forraje se ha asociado con la incidencia de timpanismo (4, 10), pero tal correlación no está asociada directamente a la fermentación y producción de gas, pues como se discutió anteriormente, los forrajes con mayor contenido de PC producen menos gas. Más bien, la PC es inductora de timpanismo como agente espumante (20), lo cual no fue determinado en la presente investigación. La correlación entre producción de gas en tres horas de fermentación y PC se explicó indirectamente ya que, la PC, también se correlaciona positivamente con los CSA los cuales sí tienen una asociación directa con la producción de gas en las primeras horas.

En contraste, el Vmax de gas fue mayor por la fermentación de alfalfa de mayor edad (35 días). Por lo regular, los forrajes con alto contenido de PC como alfalfa, producen menor volumen de gas acumulado durante toda la fermentación **(21)**. En la presente investigación, alfalfa de 28 o menos días de ER tuvieron una proporción mayor de PC (Cuadro 1), particularmente la de 21 días de ER, y el Vmax para este forraje fue menor y concuerda con lo hallado por otros investigadores **(21)**. Además se encontró una correlación negativa entre el Vmax y el contenido de PC (Cuadro 2), lo cual puede explicarse al saber que la proteína de la dieta se usa principalmente para la biosíntesis de proteína microbiana y solo en el caso que los microorganismos incrementen sus requerimientos inmediatos de energía y de compuestos nitrogenados, la proteína dietaria será catabolizada como fuente de energía. **(22)**.

Por otro lado, es posible que el Vmax halla sido mayormente influenciado por el contenido de carbohidratos estructurales de la FDA y FDN que pudieron ser fermentados. De hecho el Vmax se correlacionó positivamente con la FDA y FDN (Cuadro 2). En forma general y estimando el contenido de hemicelulosa por diferencia (FDN - FDA) para cada ER, la mayor producción de Vmax se obtuvo en alfalfa de más de 35 días de ER, y fue atribuida a su mayor contenido de hemicelulosa. En un estudio **(23)** se encontró una correlación alta ($r^2=0.97$) entre el contenido de fibra y la producción de gas en 12 horas de fermentación y se estimó una producción de 0.37 mL de gas por mg de fibra digerida. También se encontró que por cada unidad porcentual de proteína, la producción de gas se

reduce en 2.48 mL y 20.88 mL por cada mmol de amonio liberado en la fermentación (21).

Debido a que el timpanismo por forrajes se presenta en las primeras horas postprandial, es necesario poner especial atención en la tasa de producción de gas, como se observa en los resultados obtenidos en el presente experimento, alfalfa de menor edad de rebrote tuvo la mayor tasa de producción de gas. La fermentación de hojas de diversos forrajes resulta en una mayor tasa de producción de gas que la fermentación de tallos, lo cual está relacionado con diferencias en compuestos de digestión inicial (9). De igual forma en la presente investigación la alfalfa de menor ER, presentó una menor proporción de componentes estructurales, por lo que los microorganismos ruminales pudieron fermentar más rápidamente dicho tipo de forrajes. Las leguminosas poco timpanizantes tienen una menor tasa de digestión, debido a su baja concentración de constituyentes fácilmente degradables (24).

CONCLUSIONES

La composición química de alfalfa fue diferente en función de la edad de rebrote de la planta, los contenidos de fibra detergente ácido y fibra detergente neutro aumentaron al avanzar la edad de rebrote de alfalfa, mientras los de proteína cruda y carbohidratos solubles en alcohol disminuyeron.

Los carbohidratos solubles en alcohol tuvieron una correlación positiva con la tasa de producción de gas, volumen de gas a una hora y volumen de gas acumulado en 3 horas. El volumen de gas acumulado en 138 horas se correlacionó

positivamente con la fibra detergente ácido y fibra detergente neutro, pero negativamente con la proteína cruda.

Debido a que alfalfa de 21 día de edad de rebrote presentó mayor tasa de producción de gas, así como mayor proporción de PC, podemos asumir que fue la de mayor riesgo timpanizante.

Con base a los resultados obtenidos, se puede deducir que el volumen máximo de gas acumulado en 138 horas de fermentación *in vitro* de alfalfa con cuatro edades de rebrote estuvo determinado por la concentración de fibra detergente ácido y más específicamente por la hemicelulosa.

LITERATURA CITADA

1. Popp JD, McCaughey WP, Cohen RDH, McAllister TA and Majak W. Enhancing pasture productivity with alfalfa: A review. Can J Plant Sci 2000;(80): 513-519.
2. Majak W, Hall JW and McCaughey WP. Pasture management strategies for reducing the risk of legume bloat in cattle. J Anim Sci 1995;(73): 1493-1498.
3. Stanford K, Wang Y, Berg BP, Majak W, McCartney DH, Baron SV and McAllister TA. Effects of alcohol ethoxylate and pluronics detergents on the development of pasture bloat in cattle and sheep. J Dairy Sci 2001;(84):167-176.
4. Hall JW and Majak W. Relationship of weather and plant factors to alfalfa bloat in autumn. Can J Anim Sci 1991;(71): 861-866.
5. Mathison GW, Soofi-Siawash R, Klita PT, Okine EK and Sedwick G. Degradability of alfalfa saponins in the digestive tract of sheep and their rate of accumulation in rumen fluid. Can J Anim Sci 1999;(79): 315-319.

6. Rumbaugh MD. Breeding bloat-safe cultivars of bloat-causing legumes. *In*: Barnes RF, Ball PR, Brougham RW, Marten GC, Minson DJ editors. Forage Legumes For Energy-efficient Animal Production. Proceedings of a Trilateral Workshop Held in Palmerston North New Zealand. Palmerston North, New Zealand. pp. 1984:238-245.
7. McMahon LR, McAllister TA, Berg BP and Majak W, Acharya SN, Popp JD, Coulman BE, Wang Y, Cheng KJ. A review of the effects of forage condensed tanins on ruminal fermentation and bloat in grazing cattle. *Can J Plant Sci* 2000;(80): 469-485.
8. Schofield P. Gas production Methods. *In*: Farm Animal Metabolism and nutrition. D'Mello JPF Editor. Ed. CABI Publishing 2000;229-253.
9. Fay, J. P, Cheng KJ, Hanna MR, Howard RE and Costerton JW. *In vitro* digestion of bloat-safe and bloat-causing legumes by rumen microorganisms: gas and foam production. *J. Dairy Sci* 1980;(63):1273-1281.
10. Thompson DJ, Brooke BM, Garland GJ, Hall JW and Majak W. Effect of stage of growth of alfalfa on the incidence of bloat in cattle. *Can J Anim Sci* 2000;(80): 725-727.
11. García E. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (para adaptarla a las condiciones de la Republica Mexicana). 4ª Ed. Universidad Nacional Autónoma de México. 1988.
12. Sosa ME. Manual de procedimientos analíticos para alimentos de consumo animal. Universidad Autónoma Chapingo. México. 1979.
13. Dubois MK, Gilles A, Hamilton JK, Rebers PA and Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 1956;(28):350.
14. Menke KH and Steingass H. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Anim Res and Develop* 1988;(28):7-55.
15. SAS. SAS/STAT User's manual (Release 8.03). Cary NC, USA: SAS Inst. Inc. 2000.

16. Beauchemin KA. Effects of dietary neutral detergent fiber concentration and alfalfa hay quality in chewing, rumen function, and milk production of dairy cows. *J Dairy Sci* 1991;(74):3140-3151.
17. Popp JD, McCaughey WP, Cohen RDH. Effect of grazing system, stocking rate and season of use on diet quality and herbage availability of alfalfa-grass pasture. *Can J Anim Sci* 1997;(77):111-118.
18. Ensminger ME, Oldfield JE, Heinemann WW. Feeds and nutrition. Ed. The Ensminger Publishing Company. (1990);1234 p.
19. Pouden WD, Pratt AD, Frank NA, Conrad HR, Hahn A, Fetter A and Davis RR. Pasture bloat: stable foam and gas production capacities of pasture plants *in vitro*. *Vet Med* 1959;(54):159.
20. Schofeld P and Pell AN. Measurement and kinetic analysis of the neutral detergent-soluble carbohydrate fraction of legumes and grasses. *J Anim Sci* 1995;(73):3455-3463.
21. Cone JW and Van Gelder AH. Influence of protein fermentation on gas production profiles. *Anim Feed Sci Technol* 1999;(76):251-264.
22. Chalupa W. Degradation of amino acids by mixed rumen microbial population. *J Anim Sci* 1956;(43):828-834.
23. Coulman B, Goplen B, Majak W, McAllister T, Cheng KJ, Berg B, Hall J. McCartney D, and Acharya S. A review of the development of a bloat-reduced alfalfa cultivar. *Can J Plant Sci* 2000;(80):487-491.
24. Muslera PE y Ratera XX. Praderas y forrajes, producción y aprovechamiento. Ed. Mundi Prensa. Madrid, España. 1991; 674 p.

CUADROS

Cuadro 1. Parámetros de los constituyentes químicos, cinética de producción de gas, producción de gas fraccional en 3 horas y pH durante la digestión *in vitro* de alfalfa con distinta edad de rebrote.

Fuente de variación	Edad de rebrote			
	21 días	28 días	35 días	42 días
Constituyentes químicos ¹				
PC(%)	31.02 ^a	25.59 ^b	23.93 ^c	21.00 ^d
FDN(%)	32.07 ^c	37.51 ^b	39.48 ^b	43.40 ^a
FDA(%)	23.59 ^b	26.53 ^a	27.43 ^a	28.17 ^a
MS (%)	25.41 ^b	26.95 ^b	28.66 ^b	32.59 ^a
CSA (%)	32.90 ^a	31.25 ^a	27.69 ^b	27.59 ^b
Cinética de producción de gas ²				
Vmax (mL g ⁻¹ MS)	211.37 ^c	256.69 ^{ab}	271.10 ^a	251.32 ^b
S (ln mL h ⁻¹)	0.039 ^a	0.034 ^b	0.035 ^b	0.036 ^{ab}
L (h)	-4.07 ^{ab}	-4.79 ^b	-4.10 ^{ab}	-3.82 ^a
Producción de gas fraccional en 3 horas y pH ³				
V ₁ (mL)	28.29 ^a	28.56 ^a	23.45 ^b	23.42 ^b
V ₃ (mL)	36.27 ^{ab}	38.17 ^a	35.76 ^{ab}	31.32 ^b
V _A (mL)	64.56 ^{ab}	66.73 ^a	59.21 ^{bc}	54.75 ^c
pH	6.55 ^b	6.64 ^a	6.42 ^b	6.55 ^{ab}

Medias con distinta literal en la hilera son diferentes (P<0.01)

¹ PC: proteína cruda, FDN: fibra detergente neutro, FDA: fibra detergente ácido, MS: materia seca

² Vmax: Volumen máximo de gas acumulado, S: tasa de producción de gas; L: fase de retardo; estimados por medio del modelo $V_t = V_{max}/(1+\exp^{(2-4*S*(t-L)})$

³ V₁: volumen de gas a la primera hora; V₃ volumen de gas en tres horas; V_A: volumen de gas acumulado en tres horas

Cuadro 2. Correlaciones entre los componentes químicos de alfalfa, cinética de producción de gas y volumen de gas fraccional *in vitro* de alfalfa a distintas edad de rebrote.

	Vmax	S	L	V1	V3	VA	PH
CSA	-0.33 (0.049)	0.54 (0.007)	0.21 (0.215)	0.81 (<0.001)	0.37 (0.026)	0.76 (<0.001)	-0.07 (0.669)
FDN	0.57 (0.003)	-0.12 (0.476)	0.05 (0.767)	-0.27 (0.106)	-0.23 (0.176)	-0.30 (0.076)	0.12 (0.501)
FDA	0.58 (0.003)	0.01 (0.943)	0.18 (0.296)	-0.06 (0.720)	-0.10 (0.576)	-0.09 (0.618)	-0.15 (0.386)
PC	-0.64 (<0.001)	0.02 (0.908)	-0.12 (0.498)	0.08 (0.629)	0.24 (0.166)	0.16 (0.350)	0.02 (0.897)
RHT	-0.38 (0.022)	-0.09 (0.582)	-0.13 (0.451)	0.06 (0.705)	0.045 (0.793)	0.07 (0.696)	0.22 (0.201)
MS	0.34 (0.041)	-0.17 (0.310)	-0.03 (0.869)	-0.23 (0.176)	-0.42 (0.011)	-0.35 (0.039)	0.12 (0.473)
pH	0.07 (0.699)	-0.650 (<0.001)	-0.75 (<0.001)	-0.23 (0.180)	-0.16 (0.365)	-0.25 (0.167)	1 ()

Vmax: volumen máximo acumulado; S: tasa de producción de gas; L: fase de retardo; V₁: volumen de gas a la primera hora; V₃ volumen de gas en tres horas; V_A: volumen de gas acumulado en tres horas; PC: proteína cruda; FDN: fibra detergente neutro; FDA: fibra detergente ácido; CSA: carbohidratos solubles en alcohol

Los datos entre paréntesis indican probabilidad

FIGURA

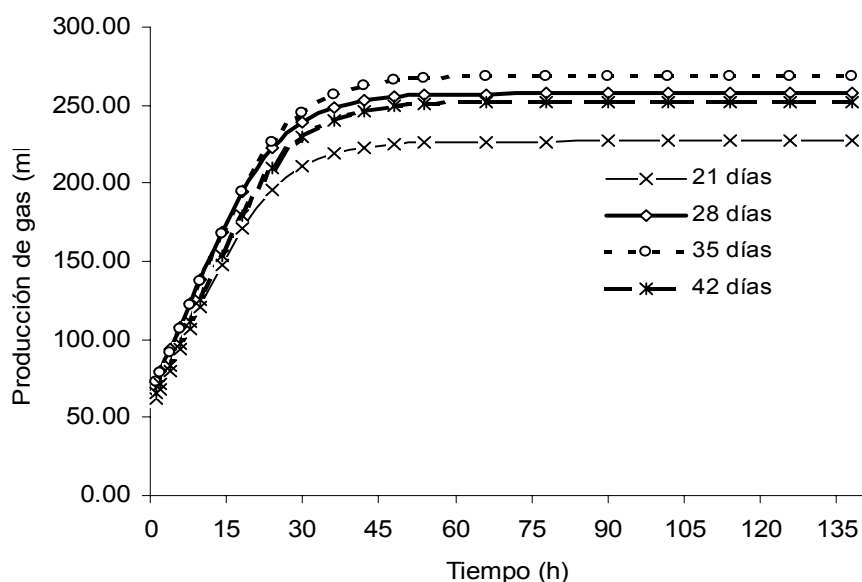


Figura 1. Producción de gas acumulado durante la fermentación *in vitro* de alfalfa con distinta edad de rebrote

CAPITULO 4

**CONSTITUYENTES QUÍMICOS Y CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE GAS Y
ESPUMA DURANTE LA FERMENTACIÓN *In vitro* DE ESTRATOS DE
ALFALFA CON DISTINTA EDAD DE REBROTE**

Luis Enrique González Gutiérrez^b, Luis Alberto Miranda Romero^b, Ricardo D.

Améndola Massiotti^b, Benito Reyes Trejo^c

^a Artículo para ser sometido a su posible publicación en la revista TÉCNICA PECUARIA

^b Posgrado en Producción Animal. Departamento de Zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco km 38.5. Tel. 595 (9521621); lmiranda@taurus1.chapingo.mx. Correspondencia y solicitud de separatas al segundo autor.

^c Departamento de Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México- Texcoco km 38.5.

RESUMEN

CONSTITUYENTES QUÍMICOS Y CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE GAS Y ESPUMA DURANTE LA FERMENTACIÓN *In vitro* DE ESTRATOS DE ALFALFA CON DISTINTA EDAD DE REBROTE

Se determinó el efecto del estrato (ES; 0-10, 10-20, 20-30, 30-40 y 40-50 cm) y su interacción con la edad de rebrote (ER; 28, 35 y 42 d) de alfalfa en el contenido de fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA), carbohidratos solubles en alcohol (CSA), clorofila (CL) Proteína cruda (PC), materia seca (MS), relación hoja:tallo (RHT) y la cinética de producción de gas (CPG) durante su fermentación *in vitro*. La CPG se ajustó por medio del modelo $V_t = V_{\max} / (1 + \exp^{(2-4 \cdot S \cdot (t-L))})$ para obtener los parámetros de volumen máximo de gas acumulado ($V_{\max}$; mL g⁻¹), tasa de producción de gas (S; ln mL h⁻¹), fase de retardo (L; h). También se determinó volumen de gas fraccional y acumulado, y espuma durante las primeras tres horas de fermentación. Se usó un diseño completamente al azar con arreglo factorial, las variables se compararon por medio de la prueba de Tukey y se correlacionaron entre sí. Se encontró interacción ($P < 0.05$) para ER×ES en FDN, FDA, PC y RHT. La PC y RHT incrementó, mientras que la FDN y FDA disminuyeron conforme el ES fue mayor, siendo diferente ($P < 0.05$) a partir del ES mayor a 30 cm de altura y entre alfalfa de 28 días y las de mayor ER. El $V_{\max}$, la formación de espuma y el volumen acumulado en tres h (V_A) de fermentación disminuyeron conforme el ES fue menor, la diferencia ($P < 0.05$) fue más evidente entre el ES mayor y los inferiores. La formación de espuma se correlacionó ($P < 0.01$) con PC ($r^2 = 0.82$), RHT ($r^2 = 0.88$), FDA y FDN ($r^2 = -0.83$). El V_A se correlacionó ($P < 0.01$) con PC ($r^2 = 0.54$), RHT ($r^2 = 0.72$), FDN y FDA ($r^2 = -0.53$). La S se correlacionó ($P < 0.01$) con PC ($r^2 = 0.6$), FDA y FDN ($r^2 = 0.53$). El $V_{\max}$ se correlacionó ($P < 0.01$) con CL ($r^2 = 0.62$) y FDA ($r^2 = -0.58$). El forraje de alfalfa con 28 días de ER y estratos superiores a 30 cm de altura mostró mayor proporción de PC así como mayor producción de gas y espuma en las primeras tres horas de fermentación, por lo cual podemos suponer que son más propensos a inducir timpanismo.

Palabras clave: timpanismo, formación de espuma, *Medicago sativa*

ABSTRACT

CHEMICAL CONSTITUENTS AND GAS PRODUCTION KINETICS OF THE FERMENTATION *In vitro* OF STRATUM OF ALFALFA WITH DIFFERENT AGE

The effect of alfalfa stratum (ST; 0-10, 10-20, 20-30, 30-40 and 40-50 cm) and its interaction with the age (28, 35 and 42 d) in the content of neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF), soluble carbohydrates in alcohol (SCA), chlorophyll (CL), crude Protein (CP), dry matter (DM), relationship leave:steam (RLS) and the gas production kinetics (GPK) during their fermentation *in vitro* were determined. The GPK was adjusted by model $V_t = V_{\max} / (1 + \exp^{(2.4 \cdot S \cdot (t-L))})$ accumulated maximum volume ($V_{\max}$; mL g⁻¹), gas production rate (S ; ln mL h⁻¹) and retard phase (L ; h). Fractional gas volume and its accumulation and foam during the first three hours of fermentation were analyzed. The experiment was carried out under a completely randomized block with factorial arrangement. Tukey test was used for comparison of means and they were correlated. The interaction ST×age were different ($P < 0.05$) for ADF, NDF, CP and RLS. The CP and RLS increased, while the NDF and ADF diminished according to alfalfa ST, being different ($P < 0.05$) since 30 cm high, between alfalfa of 28 days and those of higher age. The $V_{\max}$, formation of foam and the volume accumulated in three hours (V_A) diminished in toward ST lower, the difference ($P < 0.05$) it was more evident between higher and lower ST. The formation of foam was correlated ($P < 0.01$) with CP ($r^2 = 0.82$), RLS ($r^2 = 0.88$), ADF and NDF ($r^2 = -0.83$). The V_A was correlated ($P < 0.01$) with CP ($r^2 = 0.54$), RLS ($r^2 = 0.72$), NDF and ADF ($r^2 = -0.53$). The S was correlated ($P < 0.01$) with CP ($r^2 = 0.6$), ADF and NDF ($r^2 = 0.53$). The $V_{\max}$ was correlated ($P < 0.01$) with CL ($r^2 = 0.62$) and ADF ($r^2 = -0.58$). Alfalfa with 28 days of ER and superior strata to 30 cm of height showed higher proportion of CP as well as higher gas production and foam in the first three hours of fermentation, reason why we can suppose that they are prone to induce bloat.

Key words: bloat, formation of foam, *Medicago sativa*

INTRODUCCIÓN

Alfalfa (*Medicago sativa* L.) provee un valor nutricional aceptable, sin embargo, es considerada como de alto riesgo timpanizante. El timpanismo es provocado por la acumulación de gases en el retículo-rumen los cuales son atrapados por espuma estable impidiendo el eructo normal del animal (1).

La excesiva producción de espuma obstaculiza el cardias, debido a lo cual se inhibe la eructación normal del animal lo que provoca la acumulación excesiva de gases. Las condiciones que favorecen la formación de espuma incluyen un balance de agentes surfactantes, producción de gas adecuada, pH ruminal ≤ 5.5 y presencia de albumina salival para aumentar la estabilidad de la espuma (2). Además, el volumen de gas producido por la fermentación (3), la composición de los gases (4) y la tasa de producción de gas (3, 5), se han relacionado con la presencia de timpanismo.

Alfalfa en estado inmaduro con alta digestibilidad (6), así como una concentración mayor de proteína cruda (7) puede ser más propensa a incrementar el riesgo de timpanismo. Ya que el contenido de proteína de alfalfa contribuye a la formación de espuma ruminal (8) y el gas producido por la fermentación normal del alimento puede ser atrapado por la espuma e inhibir la eructación del animal (1). En lo que respecta a la altura media del dosel de alfalfa no se han reportados trabajos que indiquen el efecto de los constituyentes químicos en la cinética de producción de gas y espuma.

Por lo que la presente investigación tuvo el propósito de analizar la relación entre la composición química de alfalfa en función de la altura media del estrato y la

interacción edad de rebrote×estrato, así como la cinética de producción de gas, espuma y pH durante su fermentación *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se llevó a cabo en el módulo de producción de leche en pastoreo y las instalaciones del laboratorio de microbiología pecuaria de la Universidad Autónoma Chapingo, a una altura de 2,250 m, con clima templado subhúmedo, lluvias en verano y 645 mm de precipitación anual. La variación de la temperatura es de 12 a 18 °C (9). El período experimental fue del 13 de mayo al 23 de junio de 2002.

Tratamientos. Los tratamientos consistieron en muestras de alfalfa var. San Miguelito de 3 años de edad cosechada a tres edades de rebrote (ER; 28, 35 y 42 días) y cinco estratos de la planta (ES; 0-10, 10-20, 20-30, 30-40 y 40-50 cm) cuya combinación resultó en 15 tratamientos. Se usaron 12 parcelas de un m² que representaron la unidad experimental. Dentro de cada unidad experimental se tomaron cuatro muestras que se manejaron como repeticiones dentro de tratamiento. Las muestras se procesaron en el laboratorio para llevar a cabo el análisis químico y la prueba de cinética de producción de gas, espuma y pH.

Análisis químico. Las muestras de alfalfa obtenidas se separaron en hoja y tallo, se secaron por separado en una estufa a 55 °C hasta peso constante para determinarles la relación hoja:tallo (RHT). Las muestras secas se molieron en un molino provisto de una criba de un mm de diámetro, se determinó la proporción de

proteína cruda (PC), fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA) (10), carbohidratos solubles en alcohol (CSA, 11) y clorofila (CL, 12).

Cinética de producción de gas. Se determinaron los parámetros de la cinética de producción de gas *in vitro*, para lo cual se usaron dos gramos de alfalfa fresca, se maceraron en un mortero y se colocaron en frascos de vidrio color ámbar de 120 mL de capacidad. Posteriormente, se adicionaron 95 mL de inóculo ruminal estandarizado y un flujo continuo de CO₂. Inmediatamente después se retiró el flujo de CO₂ y se cerró con un tapón de goma y una tapa de rosca horadada al centro. El excedente de gas se extrajo para igualar la presión interior a cero e inmediatamente se colocaron en baño maría a 39 °C. La presión de gas generado por la fermentación del sustrato se midió con un manómetro (1 kg cm⁻²) a 1, 2, 4, 6, 8, 10, 14, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54, 66, 78, 90, 102 y 114 horas de incubación *in vitro*. Después de cada lectura la presión de gas se igualó nuevamente a cero. Se usaron blancos que contenían líquido ruminal estandarizado sin sustrato, los cuales sirvieron para corregir la presión de gas debida a la fermentación de las partículas de la digesta que llevaba el inóculo. Los datos de presión (kg cm⁻² g⁻¹ MS) se transformaron a volumen de gas (mL g⁻¹ MS) por medio de la ecuación de regresión $V = (P + 0.0273) / 0.0186$, donde P es la presión de gas (kg cm⁻²) ejercida por volúmenes de gas conocidos (V) inyectado a frascos mantenidos en las mismas condiciones de los tratamientos. Los datos de volumen de gas acumulado para cada tiempo de medición se usaron para estimar los parámetros de la cinética de producción de gas por medio del modelo logístico (13) $V_t = V_{max} / (1 + \exp^{(2.4 * S * (t - L))})$, donde V_t es el volumen de gas estimado (mL g⁻¹ MS) a

determinado tiempo (h), $V_{\max}$ es el volumen máximo de gas ($\text{mL g}^{-1}\text{MS}$) que representa la fermentación potencial del sustrato, S es la tasa de producción de gas ($\ln \text{mL h}^{-1}$) y L es una constante equivalente a la fase de retardo, la cual representa el tiempo que tarda en iniciarse la fermentación del forraje.

Producción de gas fraccional a 3 h, espuma y pH. Se determinó el volumen fraccional a una (V_1) y dos horas después (V_3), así como el volumen de gas acumulado en 3 horas (V_A) de fermentación ruminal *in vitro* de la alfalfa. Se siguió el procedimiento descrito anteriormente, solamente que se usaron frascos con 70 mL de capacidad, a los que se les agregó un gramo de alfalfa fresca y 60 mL de líquido ruminal estandarizado. Además a las tres horas de medición se determinó el pH del líquido ruminal con un potenciómetro (Felisa[®], pH metro) y la formación de espuma (cm). Esta última se determinó midiendo la altura de la espuma en tres puntos del frasco equidistantes entre sí para obtener una altura promedio, con la cual se calculó el volumen de espuma multiplicando por el área de la base. Para este tipo de frascos se usó la ecuación de regresión $V = (P - 0.0197)/0.0361$ con la finalidad de transformar los datos de presión a volumen de gas producido en $\text{mL g}^{-1}\text{MS}$ de alfalfa.

Líquido ruminal estandarizado. El inóculo se preparó mezclando la muestra del contenido ruminal de dos borregos adultos fistulados en rumen con peso vivo 72 ± 1.2 kg, los cuales se alimentaron con heno de alfalfa *ad libitum*. El fluido ruminal se filtró por 8 capas de gasa. La muestra de fluido ruminal se diluyó en una proporción 1:2 con una solución mineral reducida (**14**), compuesta de Na_2CO_3 , 4.0 g; K_2HPO_4 , 0.045 g; KH_2PO_4 , 0.045 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.045 g; NaCl , 0.09 g;

MgSO₄, 0.0184 g; CaCl₂.H₂O, 0.0075 g; NaOH, 0.188 g; Na₂S, 0.047 g; Cisteína, 0.047 g y una gota de resazurina (1%) por litro de solución.

Diseño experimental y arreglo de tratamientos. El diseño experimental que se utilizó fue un completamente al azar con arreglo factorial. Los tratamientos correspondieron a la conjugación de cinco ES y tres ER, usando tres repeticiones en el tiempo. Las variables evaluadas se sometieron a un análisis de varianza, utilizando el procedimiento GLM de SAS[®] (15). La comparación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey. Las variables de composición química se correlacionaron con las de producción de gas por medio del procedimiento CORR de SAS[®] (15).

RESULTADOS

La interacción ER×ES no afectó el contenido de CSA y CL. Los efectos principales de ER y ES en estas variables se muestran en el Cuadro 1. La alfalfa de 35 días de ER tuvo una proporción mayor ($P<0.05$) de CSA que la de 28 y 42 días de ER. Sin embargo, el ES no afectó ($P>0.05$) el contenido de estos componentes. La concentración de CL en alfalfa con 28 días de ER fue mayor ($P<0.05$) que en alfalfa de 35 o más días de ER. Igualmente, los ES más jóvenes, superiores a 30 cm de altura, tuvieron una proporción mayor ($P<0.01$) de CL (Cuadro 1).

Por otro lado, las variables FDN, FDA, PC y RHT fueron afectadas ($P<0.05$) por la interacción ER×ES. La concentración de FDN y FDA aumentó conforme avanzó la ER y disminuyó hacia los ES superiores de la planta (Figura 1). La proporción de FDN fue menor ($P<0.05$) en alfalfa de 28 días de ER que en alfalfa de 35 y 42 días

de ER, esta diferencia fue mayor conforme el ES fue más alto (Figura 1). Si bien la concentración de FDA mostró la misma tendencia que la de FDN, en este caso las diferencias entre todas las ER fueron significativas ($P < 0.05$). La proporción de PC (Figura 2) disminuyó al avanzar la ER y aumentó a mayor altura del ES. Las diferencias en el contenido de PC entre ES fueron significativas ($P < 0.05$) solamente para alturas mayores a 30 cm entre alfalfa de 28 días de ER y las de mayor edad. Por su parte la RHT (Figura 3) fue mayor para alfalfa de 28 días de ER que las de mayor edad y aumentó hacia los ES superiores de la planta. No obstante, las diferencias fueron significativas ($P < 0.05$) únicamente en los estratos superiores a 30 cm de altura.

La comparación de medias para los parámetros de la cinética de producción de gas, pH y espuma en las primeras tres horas de fermentación se presentan en el Cuadro 1. El V_{max} de gas acumulado fue igual ($P > 0.05$) para las distintas ER, pero aumentó ($P < 0.05$) hacia los estratos superiores, siendo diferente ($P < 0.05$) entre el primero y último estrato. La variable S disminuyó ($P < 0.05$) conforme incrementó la ER, alcanzando a ser diferente entre 28 y 42 días de ER, sin mostrar diferencias ($P > 0.05$) entre ES. Por su parte L manifestó diferencias ($P < 0.05$) solo entre alfalfa de 35 y 42 días de ER, pero no fue afectada por ES.

En la Figura 4 se muestran las curvas de producción de gas de distintos ES de alfalfa ajustadas con el modelo logístico. La mayor producción de gas durante la fermentación *in vitro* se obtuvo con el estrato superior (40-50 cm, Cuadro 1). Las diferencias en las primeras horas no son evidentes dado que las líneas se

traslapan, sin embargo, en el Cuadro 1 las diferencias ($P < 0.01$) son evidentes a partir del estrato superior a 30 cm de altura.

Si bien ninguno de los factores evaluados (ER y ES) afectó ($P > 0.05$) la producción de gas a la primera hora de fermentación (V_1) ni el pH, sí tuvieron efecto sobre el V_A . Alfalfa con 42 días de ER produjo menor V_A ($P < 0.01$) que la de 35 y 28 días de ER. Con relación a los ES, el V_A fue mayor ($P < 0.01$) a partir de los 30 cm de altura media del dosel. La formación de espuma fue mayor ($P < 0.01$) con alfalfa de 28 días de ER que con alfalfa de mayor ER, y la cantidad de espuma aumentó hacia los estratos superiores (Cuadro 1).

Los coeficientes de correlación entre las variables evaluadas y sus respectivas probabilidades se presentan en el cuadro 2. Únicamente se discutirán los coeficientes de correlación mayores a 0.5 cuya probabilidad sea menor a 0.01.

En los que se refiere a las variables de la cinética de producción de gas, el V_{max} mostró correlación negativa con los contenidos de FDA y FDN y, positiva con los contenidos de CL y PC, la formación de espuma y RHT, aunque en estos dos últimos casos la correlación fue baja. La variable S se correlacionó positivamente con las variables L, CL, PC, pH y en menor medida con espuma, pero en forma negativa con los contenidos de FDA y FDN. Por su parte, la variable L se correlacionó positivamente con el pH y de manera negativa con V_1 y V_A .

En relación con las variables de producción de gas fraccional, el V_1 mostró una correlación positiva con V_A y RHT; V_A y la formación de espuma se

correlacionaron positivamente con la CL, PC y RHT, pero de manera negativa con FDA y FDN.

De los constituyentes químicos, la proporción de CL y PC se correlacionaron positivamente entre sí, a su vez ambas se correlacionan negativamente con FDA y FDN, pero positivamente con RHT. Por otra parte, RHT se correlacionó negativamente con FDN y FDA.

DISCUSIÓN

Puesto que no se determinó la masa de forraje por ES, las medias de ER son medias a través de ES, no ponderadas por la masa de forraje. Tomando en cuenta que la densidad aparente de forraje es mucho mayor en los ES inferiores, las medias no ponderadas no son adecuadas para discutir el efecto de ER, por lo que solo se discutirán los efectos de ES y la interacción ER×ES.

En virtud de que la capacidad fotosintética de las plantas se relaciona con la cantidad de hoja fotosintéticamente activa y consecuentemente con el contenido de clorofila (**16**); la proporción de CL en ES superiores a 30 cm es mayor ($P<0.05$), donde la RHT también fue mayor. Esto explica la correlación positiva que se encontró entre la concentración de CL y RHT (Cuadro 2).

El contenido celular está constituido, entre otros, por PC y CL, el cual se encuentra en mayor proporción en las hojas jóvenes (**16**), esto fue confirmado en la presente investigación donde la proporción de PC aumentó en los estratos superiores y se correlacionó positivamente con la CL (Cuadros 1 y 2). De manera similar a lo que

se ha hallado en otras investigaciones la cantidad de FDA (17) y FDN (18) en alfalfa disminuye hacia los estratos superiores, debido a que presentan menor RHT. En el tallo se localiza el 75 % de los carbohidratos estructurales de la alfalfa (19), lo cual se confirmó por la correlación negativa entre la FDA, FDN y la RHT.

La mayor producción de gas acumulado en 3 horas que se produjo por la fermentación de ES superiores a 30 cm de altura, este resultado posiblemente se deba a que en la digestión de los carbohidratos de fácil fermentación como azúcares, almidón y pectinas, los cuales se encuentran en mayor concentración en hojas jóvenes (5). Es un hecho confirmado que los carbohidratos solubles son más rápidamente digeridos por los microorganismos ruminales que los carbohidratos estructurales (20), sin embargo, en el presente estudio no se encontraron diferencias significativas para CSA entre los distintos estratos, por lo cual no se puede establecer una conclusión al respecto.

El estrato superior de la alfalfa fue el que presentó mayor formación de espuma, lo que se atribuyó a que en los estratos superiores la concentración de PC es mayor ($P < 0.05$), es el principal factor relacionado con la formación y estabilidad de la espuma ruminal (20). La correlación positiva entre el contenido PC y formación de espuma, que se halló en la presente investigación apoya este hecho. Mientras tanto, se ha reportado (21) una correlación positiva ($r^2 = 0.56$) entre la formación de espuma *in vitro* y la incidencia de timpanismo de vacas pastoreando alfalfa.

La correlación entre V_1 y RHT se explica por el patrón de fermentación natural de los microorganismos, los cuales inician la fermentación con compuestos de fácil degradación (5), cuya mayor concentración se encuentra en las hojas.

CONCLUSIONES

La composición química de la alfalfa fue diferente entre estratos, los contenidos de fibra detergente neutro y fibra detergente ácido disminuyeron a partir del estrato superior a 30 cm de altura, mientras que los de proteína cruda y clorofila aumentaron. Los contenidos de clorofila y proteína cruda y la relación hoja:tallo se correlacionaron negativamente con los contenidos de fibra detergente ácido y fibra detergente neutro.

El volumen máximo acumulado y la producción de espuma fueron mayores a partir del estrato de 40 cm, mientras que el volumen acumulado en tres horas fue mayor a partir de 30 cm de altura.

El volumen acumulado en tres horas y la producción de espuma tuvieron una correlación positiva con los contenidos de clorofila, proteína cruda y la relación hoja:tallo, y se correlacionaron negativamente con los contenidos de fibra detergente ácido y fibra detergente neutro.

El contenido de FDN de alfalfa de 35 y 42 días de ER no fue diferente, pero el volumen máximo acumulado fue mayor en la alfalfa de 35 días de edad de rebrote, lo cual puede estar ligado a la concentración de uno de los componentes de FDN, específicamente hemicelulosa.

El forraje de alfalfa con 28 días de ER y estratos superiores a 30 cm de altura mostró mayor proporción de PC así como mayor producción de gas y espuma en las primeras tres horas de fermentación, por lo cual podemos suponer que son más propensos a inducir timpanismo.

LITERATURA CITADA

1. Clarke RTJ, Jones WT and Reid CSW. Bloat in Cattle. XLI. Proteins of saliva as a possible genetic markers in breeding programmes to reduce bloat susceptibility in cattle. New Zealand J Agric Res 1974.; 17:411-415.
2. Garry F. Managing bloat in cattle. Symposium on bovine digestive diseases. Vet Med 1990;643-650.
3. Waghorn GC. Bloat in cattle. 47. Relations between intra-ruminal pressure, distention, and volume of gas used to simulate bloat in cows. New Zealand J Agric Res 1991;34:213-220.
4. Moate PJ, Clarke T, Davis LH and Laby RH. Rumen gases and bloat in grazing dairy cows. J Agric Sci 1997;129:459-469.
5. Fay JP, Cheng KJ, Hanna MR, Howard RE and Costerton JW. *In vitro* digestion of bloat-safe and bloat-causing legumes by rumen microorganisms: gas and foam production. J Dairy Sci 1980;63:1273-1281.
6. Dougherty CT, Bradley NW, Cornelius PL and Lauriault LM. Herbage intake rates of beef cattle grazing alfalfa. Agron J 1987;79:1003-1008.
7. Thompson DJ, Brooke BM, Garland GJ, Hall JW, Majak W. Effect of stage of growth of alfalfa on the incidence of bloat in cattle. Can J Anim Sci 2000;(80): 725-727.
8. Majak W, Hall JW, Rode LM. and Kalnin CM. Rumen clearance rates in relation to the occurrence of alfalfa bloat in cattle. J Dairy Sci 1986;69:1560-1567

9. García E. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (para adaptarla a las condiciones de la Republica Mexicana). 4ª ed. Universidad Nacional Autónoma de México. 1988.
10. Sosa E. Manual de procedimientos analíticos para alimentos de consumo animal. Departamento de Zootecnia. Universidad Autónoma Chapingo, México. 1979; 115 p.
11. Dubois MK, Gilles A, Hamilton JK, Rebers PA and Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem 1956;28:350.
12. Sevilla PE, Martínez RS y Esparza TF. Manual de procedimientos del laboratorio de biología vegetal. Departamento de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo, México. 1999.
13. Schofield P. Gas production methods. *In*: Farm animal metabolism and nutrition. D'Mello JPF Editor. Ed. CABI Publishing (2000);229-253.
14. Menke KH and Steingass H. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. Anim Res and Develop 1988;28:7-55.
15. SAS. SAS/STAT User's manual (Release 8.03). Cary NC, USA: SAS Inst. Inc. 2000.
16. Danks SM, Evans EH and Whittaker PA. Photosynthetyc systems: structure, function and assembly. Ed. John Wiley and Sons, New York 1983.
17. Nordkvist E and Aman P. Changes during growth in anatomical and chemical composition and *in vitro* degradability in lucerne. J Sci Food Agric 1986;37:1
18. Robinson PH. Neutral detergent fiber (NDF) and its role in alfalfa analysis. *In*: Proceedings, 29th California Alfalfa Symposium. Fresno, CA. 1999.
19. Barnes RF and Gordon CH. Valor alimenticio y distribución en la granja. *In*: Ciencia y tecnología de la alfalfa. Hanson CH Editor. Ed. Hemisferio sur (1980);727-760.

20. Coulman B, Goplen B, Majak W, McAllister T, Cheng KJ, Berg B, Hall J, McCartney D and Acharya S. A review of the development of a bloat-reduced alfalfa cultivar. *Can J Plant Sci* 2000;80:487-491.
21. Pressey R, Synhorst SH, Bertram J, Allen RS and Jacobson NL. Foaming properties of alfalfa and their relationship to bloat. *J Anim Sci* 1963;22:970-978.

CUADROS

Cuadro 1. Media de cuadrados mínimos de variables de cinética de producción de gas a diferente edad de rebrote y estrato de alfalfa.

Fuente de variación	Constituyentes químicos ¹		Cinética de producción de gas ²			Producción de gas fraccional, espuma y pH ³			
	CSA (%)	CL (µg g ⁻¹)	Vmax (mL)	S (mL) h ⁻¹	L (h)	V ₁ (mL)	V _A (mL)	Espuma (cm ³)	pH
Edad de rebrote (días)									
28	9.4 ^b	6.4 ^b	209.0 ^a	0.046 ^b	-1.5 ^{ab}	10.7 ^a	43.1 ^y	3.1 ^y	6.5 ^a
35	10.3 ^c	3.7 ^a	179.8 ^a	0.041 ^{ab}	-1.1 ^b	11.5 ^a	40.4 ^y	2.6 ^{xy}	6.8 ^a
42	6.1 ^a	4.0 ^a	178.9 ^a	0.038 ^a	-2.5 ^a	9.9 ^a	30.8 ^x	2.1 ^x	6.8 ^a
Estratos (cm)									
40-50	8.5 ^a	7.8 ^y	211.9 ^b	0.0467 ^a	-1.5 ^a	14.8 ^a	53.6 ^z	4.9 ^c	6.7 ^a
30-40	8.6 ^a	6.7 ^y	201.1 ^{ab}	0.043 ^a	-1.7 ^a	11.7 ^a	41.8 ^y	3.3 ^b	6.6 ^a
20-30	9.1 ^a	4.3 ^x	189.1 ^{ab}	0.042 ^a	-1.5 ^a	10.4 ^a	34.9 ^x	2.2 ^{bc}	6.7 ^a
10-20	8.8 ^a	2.9 ^x	180.9 ^{ab}	0.039 ^a	-1.8 ^a	8.6 ^a	31.4 ^x	1.5 ^a	6.8 ^a
0-10	7.9 ^a	1.8 ^x	159.9 ^a	0.037 ^a	-1.9 ^a	8.1 ^a	28.6 ^x	0.9 ^a	6.6 ^a

Columnas con distinta literal en edad de rebrote o estrato son estadísticamente diferentes ^{a,b,c} P<0.05; ^{x, y, z} P<0.01

¹CSA: carbohidratos solubles en alcohol; CL: clorofila

²Vmax: volumen máximo de gas en 114 h de fermentación; S: tasa de producción de gas; L: fase de retardo obtenidos por medio del modelo $V_t = V_{max} / (1 + \exp^{(2.4 * S * (t - L))})$

³ V₁: volumen de gas a la primera hora; V_A: volumen de gas acumulado en 3 hora

Cuadro 2. Coeficientes de correlación entre componentes químicos, producción de gas y espuma *in vitro* de estratos de alfalfa con distinta edad de rebrote.

	Vmax	S	L	V1	VA	Esp.	CSA	CL	PC	FDN	FDA	RHT	pH
Vmax	1	0.28	0.32	-0.14	0.07	0.40	0.16	0.62	0.48	-0.49	-0.58	0.41	-0.03
		(0.060)	(0.033)	(0.361)	(0.661)	(0.007)	(0.283)	(<.001)	(0.009)	(0.006)	(<.001)	(0.009)	(0.836)
S		1	0.60	-0.13	0.15	0.40	0.22	0.52	0.60	-0.55	-0.52	0.45	0.60
			(<.001)	(0.410)	(0.320)	(0.006)	(0.153)	(0.003)	(<.001)	(<.001)	(0.002)	(0.004)	(<.001)
L			1	-0.74	-0.57	0.06	0.44	0.11	0.15	-0.13	-0.18	-0.05	0.54
				(<.001)	(<.001)	(0.712)	(0.028)	(0.467)	(0.325)	(0.409)	(0.226)	(0.750)	(0.001)
V1				1	0.90	0.13	-0.41	0.23	0.22	-0.28	-0.21	0.54	-0.12
					(<.001)	(0.401)	(0.005)	(0.131)	(0.155)	(0.066)	(0.168)	(0.003)	(0.418)
VA					1	0.43	-0.21	0.52	0.54	-0.56	-0.50	0.72	-0.09
						(0.003)	(0.175)	(0.003)	(0.001)	(<.001)	(0.004)	(<.001)	(0.554)
Espuma						1	0.10	0.79	0.82	-0.84	-0.82	0.88	-0.14
							(0.505)	(<.001)	(<.001)	(<.001)	(<.001)	(<.001)	(0.349)
CSA							1	0.10	0.16	-0.14	-0.29	-0.08	0.13
								(0.517)	(0.291)	(0.371)	(0.057)	(0.628)	(0.376)
CL								1	0.86	-0.91	-0.90	0.77	-0.08
									(<.001)	(<.001)	(<.001)	(<.001)	(0.590)
PC									1	-0.92	-0.90	0.89	0.10
										(<.001)	(<.001)	(<.001)	(0.499)
FDN										1	0.97	-0.83	-0.06
											(<.001)	(<.001)	(0.698)
FDA											1	-0.79	-0.06
												(<.001)	(0.710)
RHT												1	-0.06
													(0.69)
PH													1

Los valores entre paréntesis indican la probabilidad.

FIGURAS

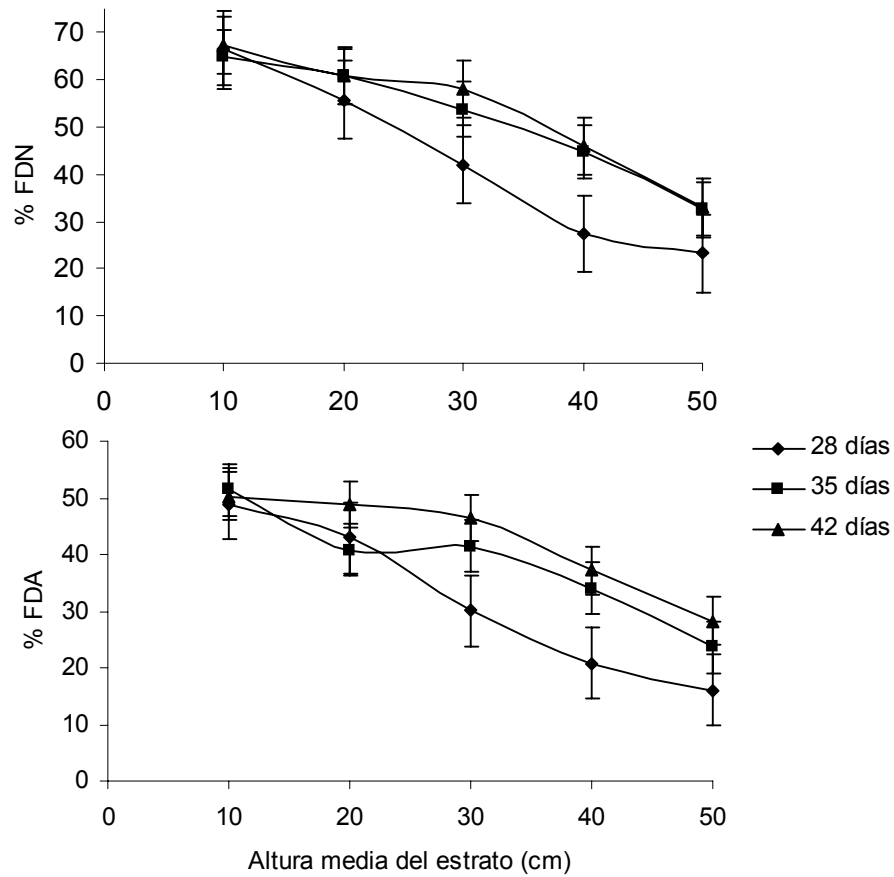


Figura 1. Contenido de fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) en estratos de alfalfa con distinta edad de rebrote

Las barras verticales indican error estándar de la media

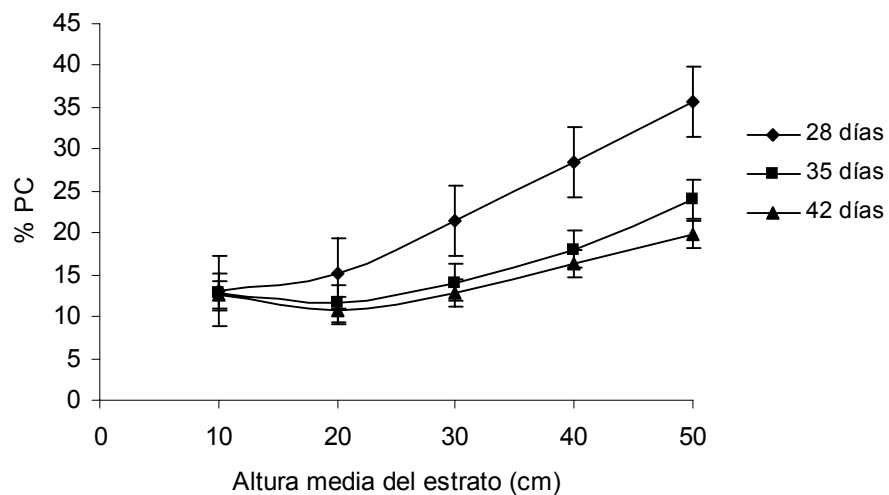


Figura 2. Contenido de proteína cruda (PC) en estratos de alfalfa con distinta edad de rebrote

Las barras verticales indican error estándar de la media

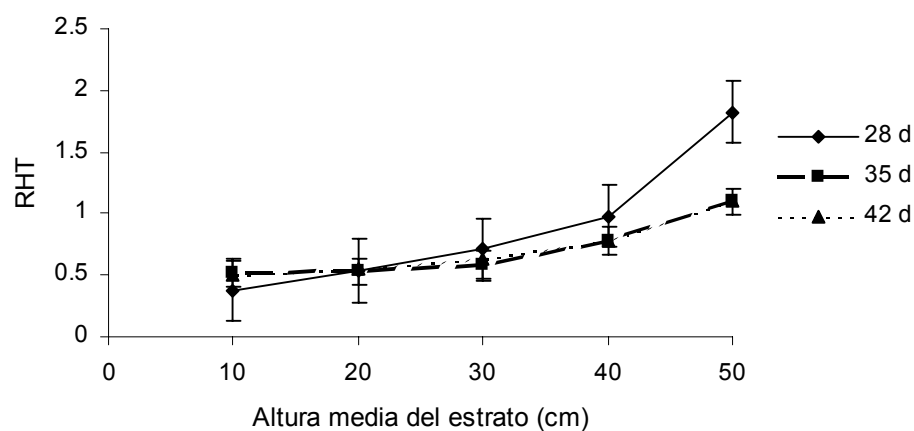


Figura 3. Relación hoja:tallo (RHT) en estratos de alfalfa con distinta edad de rebrote

Las barras verticales indican error estándar de la media

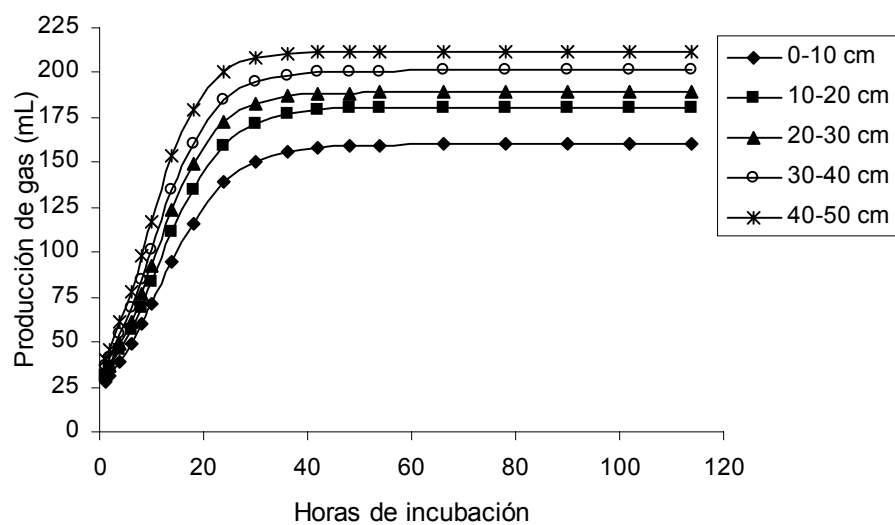


Figura 4. Producción de gas acumulado de estratos de alfalfa con distinta edad de rebrote durante su fermentación *in vitro*