

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

PROTECCIÓN DE NITRATOS Y SU EFECTO EN LA DISMINUCIÓN DE LAS
EMISIONES DE METANO ENTÉRICO

MARÍA ELIZABETH RENDÓN CORREA

Medellín-Colombia
2020

PROTECCIÓN DE NITRATOS Y SU EFECTO EN LA DISMINUCIÓN DE LAS
EMISIONES DE METANO ENTÉRICO

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agrarias de la
Universidad de Antioquía, como requisito para obtener el
grado de Doctor en Ciencias Animales
Área: Nutrición Animal

ORIENTADOR

Jaime Ricardo Rosero Noguera, Zoot., Dr.Sc.

COMITÉ ASESOR

Sandra Lucía Posada Ochoa, Zoot., Dr.Sc.

Cesar Ignacio Restrepo Meneses, Qco., Msc.

Medellín Colombia
Facultad de Ciencias Agrarias
2020

Agradecimientos

A Dios por bendecirnos la vida, por ser el apoyo y fortaleza en aquellos momentos de dificultad y de debilidad y por haberme permitido llegar a hasta este momento tan importante de mi vida profesional.

Al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (Colciencias) y su programa de créditos condonables por apoyar financieramente mis estudios de doctorado.

A los profesores Ricardo Rosero Noguera, Sandra Posada Ochoa y Cesar Restrepo por compartir sus valiosos conocimientos que hicieron que creciera cada día como profesional.

A mi familia, que a través de su amor, paciencia, buenos valores, ayudan a trazar mi camino.

A mi esposo por su apoyo y respaldo que me ayudan a alcanzar mis objetivos.

A mis compañeros Sebastián Bedoya, Carlos Santiago, Fredy Ramírez y otros por su apoyo, colaboración y paciencia durante este proceso de formación.

Al personal de la Hacienda la montaña por su colaboración.

A Samuel Mondragón y Moisés David Martínez, incondicionales con su servicio y disposición.

Mi entera gratitud a todas las personas que me apoyaron durante este camino de formación

“Aunque la magnitud del cambio climático puede hacer que las personas se sientan impotentes, la acción individual es crítica para un cambio significativo”.

Mia Armstrong

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN GENERAL.....	12
Bibliografía.....	13
RESUMEN GENERAL.....	16
Abstract.....	18
MARCO TEÓRICO	21
Metanogénesis ruminal.....	21
Uso de nitratos para la disminución de metano entérico.....	25
Adaptación de microorganismos ruminales a los nitratos	26
Inhibición de metano.....	27
Respuesta de los microorganismos ruminales al nitrato y a los productos de su reducción como el nitrito.....	28
Efectos tóxicos del nitrato en bovinos.....	32
Adaptación de los bovinos al consumo de nitratos.....	34
Nitratos protegidos.....	34
Medición de metanógenos por qPCR.....	35
Bibliografía.....	37
CAPÍTULO 1. NITRATO PROTEGIDO CON JABÓN Y SU EFECTO EN LA PRODUCCIÓN DE METANO, FERMENTACIÓN Y DEGRADABILIDAD DE LA MATERIA SECA IN VITRO.	45
Abstract.....	45
Resumen.....	46
Introducción	46
Materiales y métodos	48
Análisis estadístico	53
Resultados	54
Discusión.....	57
Bibliografía.....	60
CAPÍTULO 2. NITRATO ENCAPSULADO Y SU EFECTO EN LA PRODUCCIÓN DE METANO Y POBLACIÓN DE METANÓGENOS IN VITRO.....	65

Abstract	65
Resumen.....	66
Introducción	67
Materiales y métodos	68
Análisis estadístico	80
Resultados	80
Discusión.....	88
Bibliografía	93
<i>CAPÍTULO 3. EFECTO DEL NITRATO ENCAPSULADO SOBRE LAS EMISIONES DE METANO, UTILIZACIÓN DE LA ENERGÍA Y BALANCE DE NITRÓGENO EN NOVILLOS DE CEBA EN TRÓPICO ALTO.....</i>	98
Abstract	98
Resumen.....	99
Introducción	100
Materiales y métodos	101
Análisis estadístico	109
Resultados	109
Discusión.....	116
Bibliografía	123
<i>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES</i>	128

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO 1. NITRATO PROTEGIDO CON JABÓN Y SU EFECTO EN LA PRODUCCIÓN DE METANO, FERMENTACIÓN Y DEGRADABILIDAD DE LA MATERIA SECA IN VITRO.	45
Tabla 1. Composición nutricional (base seca) del pasto kikuyo (<i>Pennisetum Clandestinum</i> Host. Ex Chiov).....	49
Tabla 2. Concentración de nitrógeno en los aditivos evaluados	49
Tabla 3. Efecto del nitrato (NO_3^-) sin protección y protegido con jabón en la producción total de gas, producción de metano (CH_4) y materia seca degradada (MSD) en dos diferentes horarios de fermentación <i>in vitro</i>	55
Tabla 4. Efecto de la adición de nitrato (NO_3^-) protegido y sin protección sobre la producción de ácidos grasos volátiles (AGV) y nitrógeno amoniacal (N-NH_3) a las 24 horas de fermentación <i>in vitro</i>	56
CAPÍTULO 2. NITRATO ENCAPSULADO Y SU EFECTO EN LA PRODUCCIÓN DE METANO Y POBLACIÓN DE METANÓGENOS IN VITRO.	65
Tabla 1. Composición nutricional de la dieta incubada	73
Tabla 2. Porcentaje de liberación del nitrato (NO_3^-) a través del tiempo.	82
Tabla 3. Parámetros de disolución del nitrato (NO_3^-) protegido obtenidos durante 7 h de medición	82
Tabla 4. Efecto del nitrato libre (NL) y protegido (NP) sobre la producción total de gas, CH_4 y degradación de la MS en tres diferentes horarios (12, 24 y 48 h) de medición <i>in vitro</i>	84
Tabla 5. Efecto del nitrato libre y protegido sobre el perfil de fermentación en tres diferentes horarios (12, 24 y 48 h) de medición <i>in vitro</i>	85
Tabla 6. Efecto del nitrato libre y protegido sobre la producción nitrógeno nitrato, nitrito y copias del gen <i>mcrA</i> en tres diferentes horarios (12, 24 y 48 h) de medición <i>in vitro</i>	87
CAPÍTULO 3. EFECTO DEL NITRATO ENCAPSULADO SOBRE LAS EMISIONES DE METANO, UTILIZACIÓN DE LA ENERGÍA Y BALANCE DE NITRÓGENO EN NOVILLOS DE CEBA EN TRÓPICO ALTO.	98
Tabla 1. Ingredientes del alimento y composición química de las dietas	103
Tabla 2. Niveles de metahemoglobina (MetHb) en novillos alimentados con tres diferentes dosis de nitratos (1, 2 y 3 % de NO_3^- en la MS).	110

Tabla 3. Efectos del nitrato protegido (NP) y el nitrato libre (NL) sobre el consumo de nutrientes en novillos Brangus en trópico alto.....	111
Tabla 4. Efectos del nitrato protegido (NP) y el nitrato libre (NL) sobre la digestibilidad aparente de la materia seca (MS), proteína bruta (PB), materia orgánica (MO) y energía bruta (EB) en novillos Brangus en trópico alto.	112
Tabla 5. Efectos del nitrato protegido (NP) y el nitrato libre (NL) sobre la digestibilidad y utilización del nitrógeno en novillos Brangus en trópico alto.	113
Tabla 6. Consumo de energía bruta (CEB), consumo de energía digestible (CED), consumo de energía metabolizable (CEM) (Mcal/día) y eficiencia de utilización de la energía de novillos Brangus suplementados con nitratos.	114
Tabla 7. Producción de metano (CH ₄), consumos de oxígeno (O ₂) y dióxido de carbono (CO ₂) de novillos Brangus suplementados con nitratos (NO ₃ ⁻).	116

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>MARCO TEÓRICO</i>	21
Figura 1. Descomposición anaeróbica en el rumen con producción de metano.....	22
Figura 2. Metanogénesis por reducción del CO ₂ . (MF: metanofurano; MP: tetrahidrometanopterinina; CoM: coenzima M; F420 y F430; coenzimas; HS-HTP: 7-mercaptoheptanoliteronina-fosfato).	23
Figura 3. Reducción asimilatoria y desasimilatoria del nitrato	28
<i>CAPÍTULO 2. NITRATO ENCAPSULADO Y SU EFECTO EN LA PRODUCCIÓN DE METANO Y POBLACIÓN DE METANÓGENOS IN VITRO</i>	65
Figura 1. Relación lineal entre el porcentaje de liberación del NO ₃ ⁻ a través del tiempo (15, 60, 180, 300 y 420 min) de los tipos de protección P1 y P2, medido a través de una prueba de disolución in vitro de acuerdo con la especificación de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP, 2000).	81
Figura 2. Relación entre el número de copias del gen mcrA/mL líquido ruminal y la producción de CH ₄ (mL), durante los tres intervalos de medición 0-12 h, 12-24 y 24-48h in vitro.	88

LISTA DE ABREVIATURAS

AGV: Ácidos grasos volátiles
ATP: Adenosin trifosfato (Adenosine triphosphate)
bh-MB: Bosque húmedo Montano bajo
BN: Balance de nitrógeno
CEB: Consumo de energía bruta
CED: Consumo de energía digestible
CEM: Consumo de energía metabolizable
CH₄: Metano
CMC: Celulosa microcristalina
CMO: Consumo de materia orgánica
CMS: Consumo de materia seca
CO₂-eq: Equivalentes de dióxido de carbono
CO₂: Dióxido de carbono
CPB: Consumo de proteína bruta
DA: Digestibilidad aparente
ER: Energía retenida
EB: Energía bruta
Fe²⁺: Hierro ferroso
Fe³⁺: Hierro férrico
FDN: Fibra en detergente neutro
FDA: Fibra en detergente ácido
GEI: Gases de efecto invernadero
H₂: Hidrógeno
H₂O: Agua
Hb: Hemoglobina
KK: Tratamiento con pasto kikuyo
KNO₃: Nitrato de potasio

KU: Tratamiento con kikuyo y urea
mcrA: gen metil coenzima M reductasa
MO: Materia orgánica
MS: Materia seca
MSC: Materi seca consumida
MSD: Materia seca degradada
MSt: Materia seca total
MSs: Materia seca del suplemento
MSh: Materia seca del heno
MetHb: Metahemoglobina
N: Nitrógeno
NaOH: Hidróxido de sodio
NaCl: Cloruro de sodio
NE: Nitrato encapsulado
N-NH₃: Nitrógeno amoniacal
NH₄⁺: Amonio
NL: nitrato libre
NO: monóxido de nitrógeno
N₂O: Oxido nitroso
NO₂⁻: Nitrito
NO₃⁻: Nitrato
NPN: Nitrógeno no proteico
NP: Nitrato protegido
PC: Proteína cruda
Pc: Producción de calor
PCG: Potencial de calentamiento global
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase chain reaction)
PSI: Libra por pulgada cuadrada (Pound-force per square inch)
PVP: Polivinilpirrolidona

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

Y_m : Factor de partición

INTRODUCCIÓN GENERAL

El metano (CH_4) es un gas de efecto invernadero (GEI), con un potencial de calentamiento global (PCG) 23 veces mayor que el dióxido de carbono (CO_2) (IPCC, 2017). Las emisiones de CH_4 se producen principalmente como parte del proceso digestivo de los rumiantes (fermentación entérica). Se estima que las emisiones provenientes de la ganadería en el mundo son de 2.200 millones de toneladas de equivalentes de CO_2 , lo que representa aproximadamente el 80% del CH_4 producido en la agricultura y el 35% de las emisiones antropogénicas totales de CH_4 (Sejian *et al.*, 2015).

La actividad microbiana ruminal es esencial para el uso de carbohidratos estructurales y la síntesis de proteína microbiana de alta calidad. La fermentación anaeróbica del alimento en el rumen es el resultado de actividades físicas y microbiológicas que convierten los componentes de la dieta en productos que son útiles para el animal hospedero como ácidos grasos volátiles (AGV) y proteínas microbianas y otros que expulsa el animal como CH_4 y CO_2 . Además el CH_4 como subproducto de la fermentación representa una pérdida del 2 al 12% de la energía bruta (EB) y en consecuencia influye negativamente en el rendimiento de los rumiantes (Li *et al.*, 2014).

El nitrato (NO_3^-) se ha mostrado como un prometedor agente mitigante de metano y ha sido evaluado en diferentes estudios *in vitro* (Lin *et al.*, 2011; Patra y Yu 2013; Shi *et al.*, 2012) e *in vivo* (van Zijderveld *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2015b; Yang *et al.*, 2016; C. Lee *et al.*, 2017). El modo de acción dominante del nitrato es actuar como un sumidero de hidrógeno en el rumen y competir con la formación de CH_4 . Teóricamente una mol de NO_3^- puede disminuir la formación de CH_4 en un mol (Leng, 2008). Además la reducción del NO_3^- a NO_2^- (energía libre de Gibbs, $\Delta G_0 = -130$ kJ / mol de hidrógeno) y la posterior reducción de NO_2^- a amoníaco ($\Delta G_0 = -124$ kJ / mol de hidrógeno) produce más energía que la reducción de CO_2 a CH_4 ($\Delta G_0 = -16.9$ kJ / mol de hidrógeno) (Ungerfeld and Kohn, 2006). Estos procesos podrían ser la ruta principal de eliminación de hidrógeno si hay

suficiente nitrato disponible en un ecosistema de rumen en fermentación activa. El amoníaco generado estará disponible para el anabolismo y sería un suministro importante de nitrógeno (N) fermentable en dietas deficientes en proteína cruda donde el amoníaco bajo en el rumen puede limitar la síntesis de proteínas microbianas (Dijkstra, France y Davies, 1998).

A pesar del efecto positivo del NO_3^- , este no ha sido comercializado aún, principalmente por el potencial de toxicidad que tiene sobre el animal, ya que, la reducción incompleta del NO_3^- en el rumen puede incrementar los niveles de NO_2^- que se absorbe a través de la pared del rumen hacia la sangre, donde interactúa con la hemoglobina (Hb) en el eritrocito para formar metahemoglobina (MetHb) (Lewis, 1951), que es incapaz de transportar oxígeno.

Como una de estrategia para reducir la toxicidad potencial del NO_3^- se desarrolló un nitrato protegido (NP) con la intención de favorecer una liberación lenta de NO_3^- , para evaluar su potencial de mitigación tanto a nivel *in vitro* como *in vivo* en la dieta de novillos de carne en trópico alto.

Bibliografía

Dijkstra, J., France, J. and Davies, D. R. (1998) 'Different Mathematical Approaches to Estimating Microbial Protein Supply in Ruminants', *Journal of Dairy Science*. Elsevier, 81(12), pp. 3370–3384. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(98)75902-8.

Lee, C. *et al.* (2015b) 'Effects of encapsulated nitrate on enteric methane production and nitrogen and energy utilization in beef heifers', *Journal of Animal Science*, 93(5), pp. 2391–2404. doi: 10.2527/jas2014-8845.

Lee, C., Araujo, Rafael C., *et al.* (2017) 'In situ and in vitro evaluations of a slow release form of nitrate for ruminants: Nitrate release rate, rumen nitrate metabolism and the

production of methane, hydrogen, and nitrous oxide', *Animal Feed Science and Technology*. Elsevier, 231(July), pp. 97–106. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2017.07.005.

Leng R A 2008. The potential of feeding nitrate to reduce enteric methane production in ruminants. Report to Department of Climate Change, Commonwealth Government, Canberra. 82 pp.

Lewis, D. (1951) 'The metabolism of nitrate and nitrite in the sheep. 1. The reduction of nitrate in the rumen of the sheep', *Biochemical Journal*, 48, pp. 175–180. doi: 10.1042/bj0480175.

Li, Y. *et al.* (2016) 'The complete genome sequence of the methanogenic archaeon ISO4-H5 provides insights into the methylotrophic lifestyle of a ruminal representative of the Methanomassiliicoccales', *Standards in Genomic Sciences*. *Standards in Genomic Sciences*, 11(1), pp. 1–12. doi: 10.1186/s40793-016-0183-5.

Lin, M. *et al.* (2011) 'Comparisons of in vitro nitrate reduction, methanogenesis, and fermentation acid profile among rumen bacterial, protozoal and fungal fractions', *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 24(4), pp. 471–478. doi: 10.5713/ajas.2011.10288.

Patra, A. K. and Yu, Z. (2013) 'Effective reduction of enteric methane production by a combination of nitrate and saponin without adverse effect on feed degradability, fermentation, or bacterial and archaeal communities of the rumen', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 148, pp. 352–360. doi: 10.1016/j.biortech.2013.08.140.

Sejian, V. *et al.* (2015) *Climate change impact on livestock: Adaptation and mitigation*, *Climate Change Impact on Livestock: Adaptation and Mitigation*. doi: 10.1007/978-81-322-2265-1.

Shi, C. *et al.* (2012) 'Response of ruminal fermentation, methane production and dry matter digestibility to microbial source and nitrate addition level in an in vitro incubation with rumen microbes obtained from wethers', *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 11(18), pp. 3334–3341. doi: 10.3923/javaa.2012.3334.3341.

Ungerfeld, E. and Kohn, R. (2006) 'The Role of Thermodynamics in the Control of Ruminal Fermentation', in *Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism and Impact of Nutrition on Gene Expression, Immunology and Stress*, pp. 55–85.

Yang, C., Rooke, John A, *et al.* (2016) 'Nitrate and Inhibition of Ruminal Methanogenesis : Microbial Ecology , Obstacles , and Opportunities for Lowering Methane Emissions from Ruminant Livestock', 7(February), pp. 1–14. doi: 10.3389/fmicb.2016.00132.

van Zijderveld, S. M. *et al.* (2010) 'Nitrate and sulfate: Effective alternative hydrogen sinks for mitigation of ruminal methane production in sheep', *Journal of Dairy Science*. Elsevier, 93(12), pp. 5856–5866. doi: 10.3168/jds.2010-3281.

RESUMEN GENERAL

Los rumiantes representan hasta un tercio de la producción antropogénica de metano (CH_4) en todo el mundo. La producción entérica de CH_4 de los rumiantes contribuye al incremento de gases de efecto invernadero y también representa una pérdida de energía en la dieta. Por lo tanto, se presenta un gran interés en el desarrollo de diversas estrategias de mitigación para el CH_4 entérico. El nitrato (NO_3^-) actúa como un sumidero alternativo de hidrogeno y por lo tanto disminuye la producción de metano en rumen, sin embargo, este compuesto durante su proceso de reducción produce nitrito, tóxico para el animal, por el aumento de metahemoglobina (MetHb) en sangre.

En el presente trabajo se desarrollaron tres capítulos. En el primero, se realizó un ensayo con el objetivo de obtener un método de protección del NO_3^- y compáralo con el efecto del NO_3^- libre sobre la degradación de la materia seca y la producción de metano *in vitro*. Para tal efecto se evaluaron 4 tratamientos que consistieron en un sustrato de pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum Hochst. Ex Chiov*) (KK) como dieta base y la mezcla de este con 3 aditivos: kikuyo + nitrato de potasio libre (NL), kikuyo + nitrato de potasio protegido con jabón (NP) y kikuyo + urea (KU). Cada tratamiento con NO_3^- libre o encapsulado, presenta una inclusión de NO_3^- del 3% de la MS incubada. Los tratamientos se evaluaron como medidas repetidas en el tiempo, utilizando PROC MIXED de SAS. La inclusión de NP disminuyó la degradación de MS, la producción de gas y la producción de CH_4 ($p < 0.05$). NL disminuyó la producción de gas a las 48 h y la producción de metano a las 24 y 48 h ($p < 0.05$), sin afectar la degradación de la MS. Los resultados indican que en una dieta con kikuyo, el uso de NP en una inclusión de NO_3^- del 3% de la MS, puede llegar a reducir en un 80 y 53% la producción de CH_4 durante 24 y 48 horas *in vitro*. Sin embargo, el uso del jabón de soya como método de protección de NO_3^- debe ser considerado con mas detalle, debido a que su naturaleza lipídica podría presentar un alto potencial tóxico sobre los microorganismos ruminales y explicaría la disminución de la materia seca degradada (MSD).

En el segundo capítulo se evaluó la protección de NO_3^- y su efecto en la disminución de CH_4 , MSD, perfil de fermentación, concentración de NO_3^- , nitritos (NO_2^-) y poblaciones de metanógenos a nivel *in vitro*. Se fabricaron pellets de celulosa microcristalina (CMC) para la protección del nitrato y se evaluaron a nivel *in vitro* 4 tratamientos: control, UR, NL y NP, durante 12, 24 y 48h. En las primeras 12 horas de incubación, tanto el NL como el NP redujeron el porcentaje de producción de CH_4 en un 44% y 26% ($P < 0.0001$), con respecto al control; mientras que a las 24 y 48 h solo el NL redujo este porcentaje en un 43% y 38% ($P < 0.0001$), en comparación con los tratamientos control, NP y UR que presentaron valores similares entre si. La cantidad de metanógenos no fue afectada. Los resultados indican que el NP muestra un potencial de mitigación de CH_4 solo durante las primeras 12 h de incubación, sin afectar la MSD. El NL redujo efectivamente la producción de CH_4 entérico, pero afectó transitoriamente la MSD. No se encontró una relación entre la reducción en la producción de CH_4 originada por el NL y el número de copias del gen *mcrA*, lo que implica que la inhibición del CH_4 no se vió afectada por los cambios en la población total de metanógenos.

Finalmente, en el capítulo 3, se elaboró un NO_3^- protegido con el objetivo de evaluar su efecto en las emisiones de CH_4 entérico, consumo de materia seca (CMS), balance energético, utilización del nitrógeno y formación de metahemoglobina (MetHb) en sangre de novillos Brangus confinados en trópico alto. Nueve novillos machos (341.1 ± 23.02 Kg) fueron asignados a corrales individuales en un diseño de cuadrado latino triplicado con 3 bloques y 3 tratamientos como: Control (urea), NL = 3% de NO_3^- en base seca y NP= 3% de NO_3^- protegido en base seca. Las dietas fueron isonitrogenadas con una proporción de heno de pangola: concentrado 65:35. El experimento tuvo una duración de 123 días mas una adaptación inicial de 30 días (estabulación y cámaras) y 3 periodos de medición cada uno de 31 días (15 días de adaptación al NO_3^- y 16 de mediciones). No se presentaron niveles tóxicos de MetHb sanguínea con ningún tratamiento. La producción de CH_4 fue menor para los tratamientos con NL y NP con respecto al control (16.91 y 17.95 Vs. 23.24 L/Kg de CMS; $P < 0.05$). Se observó un menor factor de partición

(*Y_m*) con NL y NP con respecto al control (4.10 y 4.37 Vs 5.43 %; $p < 0.05$). El NP llevó a la disminución en el porcentaje del consumo de energía metabolizable (CEM) y energía retenida (ER) (15.35 y 5.67%), con respecto al control (20.40 y 8.36 %; $P < 0.05$), respectivamente. El nitrógeno retenido (g/d) se observó en menor cantidad en la dieta con NP (60.82) al ser comparado con el control (92.51) y el NL (107.29), $P < 0.05$. En conclusión, la suplementación con un 3% de NP en la dieta de novillos Brangus, redujo la producción de CH₄ entérico en un 23% en comparación con la dieta control, sin presentar niveles tóxicos de MetHb en sangre. Sin embargo, el NP afectó negativamente el consumo de MS, retención de nitrógeno, digestibilidad y metabolicidad de la dieta.

Abstract

Ruminants account for up to one third of anthropogenic methane (CH₄) production worldwide. The enteric production of CH₄ by ruminants contributes to the increase of greenhouse gases and also represents a loss of energy in the diet. Therefore, there is great interest in the development of various mitigation strategies for enteric CH₄. Nitrate (NO₃⁻) acts as an alternative hydrogen sink and therefore reduces the production of methane in the rumen, however, this compound during its reduction process produces nitrite, toxic to the animal, due to the increase in methemoglobin (MetHb) in blood.

In the present work three chapters were developed. The first had the objective of developing a NO₃⁻ protection method and testing it with an unprotected source to evaluate its effect on dry matter degradation and in vitro methane production. For this purpose, 4 treatments were evaluated that consisted of a substrate of kikuyo grass (*Pennisetum clandestinum*) (KK) as base diet and the mixture of this with 3 additives: kikuyo + free potassium nitrate (NL), kikuyo + encapsulated potassium nitrate with soap (NE) and kikuyo + urea (KU). Each treatment with free or encapsulated NO₃⁻ presents an inclusion of NO₃⁻ of 3% of the incubated DM. The treatments were evaluated as repeated measures in time, using PROC MIXED from SAS. The inclusion of NP decreased the degradation of DM, the gas production and the CH₄ production ($p < 0.05$). NL decreased gas

production at 48 h and methane production at 24 and 48 h ($p < 0.05$), without affecting DM degradation. The results indicate that in a diet with kikuyo, the use of NP in an inclusion of NO_3^- of 3% of the DM, can reduce the production of CH_4 by 80 and 53% during 24 and 48 hours in vitro. However, the use of soy soap as a method of protecting NO_3^- must be considered in more detail, since its lipid nature can present a high toxic potential on ruminal microorganisms, decreasing the MSD. In the second chapter, the protection of NO_3^- and its effect on the reduction of CH_4 , degraded dry matter (MSD), fermentation profile, concentration of NO_3^- , nitrites (NO_2^-) and populations of methanogens at the in vitro level were evaluated. Crystalline microcellulose (CMC) pellets were manufactured for nitrate protection and 4 treatments were evaluated at the in vitro level: control, UR, NL and NP, for 12, 24 and 48h. In the first 12 hours of incubation, both NL and NP reduced the percentage of CH_4 production by 44% and 26% ($p < 0.0001$), with respect to the control; while at 24 and 48 h, only the LN reduced this percentage by 43% and 38% ($p < 0.0001$), in comparison with the control, NP and UR treatments that presented similar values to each other. The amount of methanogens was not affected by the inclusion of nitrates in the substrate. In conclusion, the results indicate that NP, evaluated in the present study, shows a CH_4 mitigation potential only during the first 12 h of incubation, without affecting the MSD. NL did reduce enteric CH_4 production, but transiently affected MSD. No relationship was found between the reduction in CH_4 production caused by NL and the copy number of the *mcrA* gene, implying that CH_4 inhibition was not affected by changes in the total methanogen population.

Finally, in Chapter 3, a protected NO_3^- was elaborated with the objective of evaluating its effect on enteric CH_4 emissions, dry matter consumption (CMS), energy balance, nitrogen utilization and formation of methemoglobin (MetHb) in blood, of Brangus steers confined to the high tropics. Nine male steers (341.1 ± 23.02 Kg) were assigned to individual pens in a triplicate Latin square design with 3 blocks and 3 treatments such as: Control (urea), NL = 3% NO_3^- on dry basis and NP = 3% of NO_3^- protected on a dry basis. The diets were isonitrogenated with a 65:35 pangola hay: concentrate ratio. The experiment lasted 123 days and consisted of an initial adaptation of 30 days (housing and chambers) and 3

measurement periods each of 31 days (15 days of adaptation to NO_3^- and 16 of measurements). There were no toxic levels of blood MetHb with any treatment. The production of CH_4 was lower for the treatments with NL and NP with respect to the control in (16.91 and 17.95 Vs. 23.24 L / Kg of CMS; $p < 0.05$). A lower partition factor (Y_m) was observed with NL and NP with respect to the control (4.10 and 4.37 Vs 5.43 Y_m ; $p < 0.05$). NP led to a decrease in the percentage of metabolizable energy consumption (CEM) and retained energy (ER) (15.35 and 5.67%), with respect to the control (20.40 and 8.36%), respectively. Retained nitrogen (g / d) was observed in less quantity in the diet with NP (60.82) when compared with the control (92.51) and the NL (107.29). In conclusion, supplementation with 3% NP in the diet of Brangus steers, reduced the production of enteric CH_4 by 23% compared to the control diet, without presenting toxic levels of MetHb in the blood. However, NP negatively affected DM intake, nitrogen retention, digestibility, and diet metabolicity.

MARCO TEÓRICO

Metanogénesis ruminal

El metano CH₄ producido por rumiantes es una fuente significativa y potencialmente mitigable de este gas de efecto invernadero (Hristov *et al.*, 2013).

En condiciones normales de alimentación, la producción de CH₄ es una consecuencia ineludible de la fermentación de la materia orgánica (MO) en el tracto digestivo de los rumiantes. Una dieta con compuestos que promueven específicamente el crecimiento de bacterias que utilizan compuestos tales como nitratos y sulfatos y tienen una mayor afinidad por H₂ que los metanógenos. McAllister and Cheng (1996) propusieron que la metanogénesis no puede eliminarse sin efectos adversos sobre la producción de rumiantes y hay una visión general de que la disminución del H₂ disuelto en el rumen por los metanógenos es crítico para el mantenimiento de una baja presión parcial de H₂ en los sitios de fermentación; Esta condición, a su vez, es un requisito previo para la regeneración de cofactores tales como NADH, NADPH y ferridoxinas reducidas que son necesarias para la actividad glicolítica continua por los consorcios microbianos de rumen. En el rumen se encuentran diferentes tipos de bacterias que utilizan la celulosa, hemicelulosa, almidones y azúcares para obtener energía y favorecer su crecimiento. Del metabolismo de carbohidratos las bacterias producen ácido grasos volátiles (AGV), como fuente de energía para el hospedero (Hungate, 1966; Czerkawski, 1986; Moss, Jouany and Newbold, 2000)

Glucosa → 2 piruvato + 4H (metabolismo de carbohidratos);

Piruvato + H₂O → acetato + CO₂ + 2H

Piruvato + 4H → propionato + H₂O

2 acetato + 4H → butirato + 2 H₂O

En el rumen los carbohidratos y proteínas son degradados a AGV, NH₄, CO₂ e H₂. La eliminación del H₂ a través de la reducción de CO₂ a CH₄ es esencial para prevenir la

acumulación de equivalentes reductores y en general el impedimento de la fermentación ruminal (Kong *et al.*, 2013), además de permitir que el crecimiento microbiano pueda continuar de manera eficiente (Immig *et al.*, 1996).

La metanogénesis es la principal ruta de las arqueas metanogénicas para obtener energía, además los metanógenos son los únicos organismos conocidos para producir metano como producto final catabólico (Thauer, 1998). El H₂ producido en el rumen durante los procesos fermentativos nunca se acumula, ya que es utilizado rápidamente por los metanógenos para reducir CO₂ a CH₄ como se observa en la fig. 1. Otra fuente de H₂ y CO₂ para los metanógenos es el formiato. El acetato generalmente no llega a convertirse en CH₄ dentro del rumen debido a que el tiempo de retención es demasiado corto para que puedan desarrollarse los metanógenos acetotróficos. Además, las bacterias sintróficas degradadoras de ácidos grasos no abundan en el rumen dado que el tiempo de retención es corto y estos ácidos atraviesan la pared hacia la sangre del rumiante.

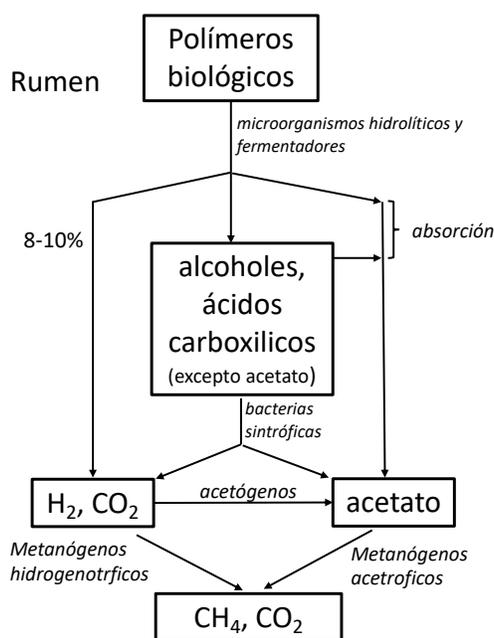


Figura 1. Descomposición anaeróbica en el rumen con producción de metano Modificada de (Lee, 2008)

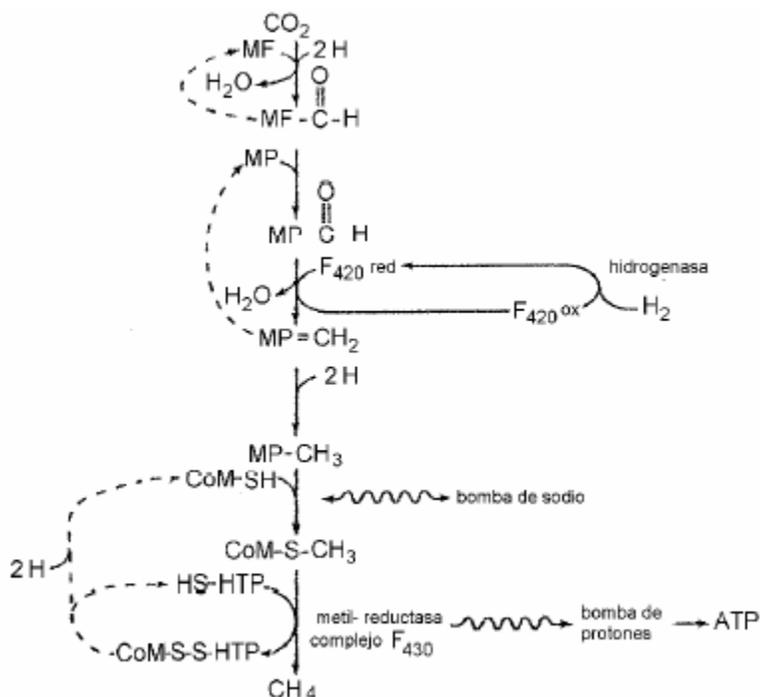


Figura 2. Metanogénesis por reducción del CO_2 . (MF: metanofurano; MP: tetrahidrometanopterina; CoM: coenzima M; F420 y F430; coenzimas; HS-HTP: 7-mercaptoheptanoliteronina-fosfato). Modificada de (Lee, 2008).

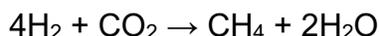
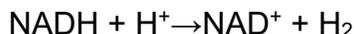
La reducción del CO_2 por lo general depende del H_2 , pero el formiato, el CO_2 e incluso el Fe^0 sirven como donantes de electrones. En el último caso, el Fe^0 es oxidado a Fe^{+2} y los electrones liberados se combinan con protones para formar H_2 , que es el donador inmediato en la metanogénesis. También en unos pocos metanógenos los alcoholes pueden aportar electrones, por ejemplo, cuando propanol se oxida a acetona en algunas especies.

En condiciones normales la variación de energía libre durante la reducción de CO_2 a metano con H_2 es -131 kJ/mol , pero debido a la influencia de la concentración de los reactantes en los ambientes naturales baja a cerca de -30 kJ/mol . La concentración de H_2 en las zonas metanogénicas no es mayor a 10 M (Madigan et al. 2003). La conservación de la energía se observa en la etapa terminal de la metanogénesis. La reducción del complejo CoM-S-S-HTP es exergónica y está asociada con la extrusión de

protones a través de la membrana, creando una fuerza propulsora de protón (Fig. 2). La disipación del gradiente de protones por una ATPasa integrada al transporte de protones en la membrana, impulsa la síntesis de ATP durante la metanogénesis (Madigan et al. 2003).

Los metanógenos autotróficos convierten el CO₂ en material celular a través de las reacciones de la vía del acetyl-CoA utilizada también por las bacterias homoacetogénicas y las reductoras de sulfato. Pero a diferencia de estas últimas los metanógenos integran las vías biosintética y bioenergética porque comparten los intermediarios comunes.

Sin las émetanogénicas no se puede formar metano. Estas bacterias son muy sensibles a cambios en el medio ruminal, especialmente a cambios en el pH. Su rango óptimo es de 6.5 a 7.0 aproximadamente y es similar al de las bacterias celulolíticas. Estos dos tipos de bacterias están íntimamente relacionadas y están asociados a la producción de acetato. En la formación de acetato se libera CO₂ necesario para la formación de metano, por lo que existe una relación directa entre la formación de acetato y metano.



Las *archeas* constituyen alrededor del 3-4% de microorganismos totales en el rumen cuya mayoría está compuesta por metanógenos (Lin *et al.*, 1997; Sharp *et al.*, 1998; Ziemer *et al.*, 2000; Yanagita *et al.*, 2002).

En 1933, (Stickland, 1933) publicó que habían aislado a partir de lodo del río, por la técnica de una sola célula, un organismo metanogénico capaz de crecer en un medio inorgánico con formiato como única fuente de carbono.

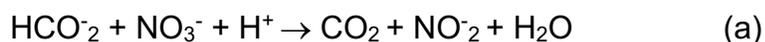
Además de CO₂ las suspensiones de células de las metanógenas aisladas por (Stickland, 1933) que catalizan la reducción de monóxido de carbono, formaldehído (añadido como hexametilentetramina) y metanol en metano con H₂, aunque a tasas mucho más bajas que la reducción de CO₂.

Uso de nitratos para la disminución de metano entérico

El NO_3^- propiamente dicho no es inherentemente tóxico. La reducción de NO_2^- en amoníaco es aparentemente más lenta que la reducción de NO_3^- a NO_2^- ; Por lo tanto, se puede construir una concentración peligrosa de NO_2^- (Dawson y Allison, 1988). Los altos niveles de NO_2^- pueden causar una intoxicación aguda a los animales hospederos y también inhibir el crecimiento de muchos tipos de microbios ruminales, especialmente las bacterias celulolíticas, las arqueas metanogénicas y los protozoos (Iwamoto, Asanuma and Hino, 2002). El NO_2^- en el rumen es absorbido en la sangre donde oxida la hemoglobina a methemoglobina, que es incapaz de transportar oxígeno (Božic et al.2009).

Como ya se ha mencionado, en los rumiantes, las arqueas metanogénicas producen metano reduciendo principalmente dióxido de carbono con hidrógeno ($\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$). Tanto el dióxido de carbono como el hidrógeno son productos finales de la degradación del material vegetal (principalmente hidratos de carbono) en AGV. El nitrato actúa como un sumidero de hidrógeno alternativo y por lo tanto disminuye la producción entérica de metano (Allison y Reddy, 1984). En el rumen, el nitrato se reduce primero en nitrito ($\text{NO}_3^- + \text{H}_2 \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$) y luego se reduce a amonio ($\text{NO}_2^- + 3\text{H}_2 + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{NH}_4^+ + 2\text{H}_2\text{O}$). Basado en el cambio en la energía libre de Gibbs (ΔG), la reducción del nitrato al nitrito ($\Delta G = -130 \text{ kJ}$) seguida por la reducción del nitrito al amonio ($\Delta G = -371 \text{ kJ}$) produce más energía comparada con la metanogénesis ($\Delta G = -67 \text{ kJ}$; (Sejrsen, Hvelplund y Nielsen, 2006). Por lo tanto, la reducción de NO_3^- es altamente competitiva en comparación con la metanogénesis con respecto al hidrógeno disponible y por lo tanto disminuye la producción de CH_4 (Olijhoek *et al.*, 2016).

Bokranz *et al.* (1983) En un trabajo realizado para observar el metabolismo energético y biosíntesis de *V. Succinogenes* con NO_3^- encontraron que la concentración de NO_2^- aumentó 3 veces más rápido que la de NH_4^+ , mientras el NO_3^- estuviera presente en el medio.



Además, reportaron que la cantidad de NO_3^- consumido es igual a la suma de las cantidades de NO_2^- y de NH_4^+ libre y celular producido. Se demuestra por primera vez en este trabajo que el transporte de electrones al NO_2^- es un proceso dependiente de quinona. La cadena de transporte de electrones en *Vibrio succinogenes* o *Fibrobacter succinogenes*, como se conoce en la actualidad, se compone probablemente del complejo de formiato deshidrogenasa o del complejo de hidrogenasa y un complejo de nitrito reductasa que están conectados por MK (menaquinona). La síntesis celular a partir de succinato procede a través de fumarato con NO_3^- o NO_2^- como aceptor. Las principales vías biosintéticas del fumarato con NO_3^- o NO_2^- parecen ser idénticas a las utilizadas durante el crecimiento con fumarato como aceptor terminal de electrones. La oxidación de succinato por NO_3^- no está aparentemente acoplada a la fosforilación. Esto se deduce del hecho de que esta bacteria no puede crecer en succinato y NO_3^- en contraste con otros. El requisito de ATP para la síntesis de células a partir de succinato y fumarato es de 55 mmol de ATP / g de células secas. El requisito de ATP no se altera significativamente por la presencia de glutamato y cisteína como sustratos biosintéticos adicionales.

Adaptación de microorganismos ruminales a los nitratos

Como la adaptación a la producción de la enzima nitrato reductasa ha sido demostrada en varias especies ruminales aisladas, es de esperarse que esto suceda también en rumen. Durante su experimento (Lin *et al.*, 2013) encontraron un aumento en la reducción de NO_3^- debido a la adaptación del animal donante, disminuyendo además la proporción de CH_4 y la concentración de H_2 . Se observó un aumento en la producción de CO_2 cuando no se utilizó para la formación de CH_4 . Debido a que el H_2 gaseoso es la fuente de electrones más eficiente para la reducción de NO_3^- (Lewis, 1951), a partir de este ensayo, ellos concluyen que el NO_3^- podría utilizarse como aceptor de electrones en lugar de CO_2 . Sin embargo, (Zhou, Yu y Meng, 2012a) demostraron que el nitrato de sodio también disminuyó significativamente la población de metanógenos medidos a través de qPCR.

Las raciones altas en fibra también pueden favorecer a las bacterias reductoras de NO_2^- manteniendo un pH más alto en el rumen, además una fuente de carbohidratos fácilmente disponibles en la ración podría reducir la toxicidad del NO_3^- ya que el NO_2^- no se acumularía en rumen.

Inhibición de metano

Los metanógenos se clasifican en el filo de los *Euryarchaeota* del dominio *Archea* (Garrity et al., 2007). Son catalogados dentro de 33 géneros, de las clases *Methanomicrobia*, *Methanococci* y *Methanopyri*. Los *Methanomicrobia* se clasifican en tres órdenes (*Methanosarcinales*, *Methanomicrobiales* and *Methanocellales*). Dentro del orden de los *Methanosarcinales* se encuentran algunos géneros como los *Methanosarcina* y *Metanosaeta* que desempeñan un papel clave en la conversión de acetato en metano en varios ambientes anaeróbicos; el resto, tiene la capacidad de metabolizar sustratos, como hidrógeno, metanol y metilaminas (Garrity et al., 2001). Los miembros conocidos del orden *Methanomicrobiales* son todos hidrogenótrofos, y algunos de ellos a menudo se observan en ambientes anaeróbicos como importantes captadores de hidrógeno (Liu & Whitman, 2008). Los miembros de la clase *Methanobacteria*, son reconocidos como importantes hidrogenótrofos que también se han encontrado ampliamente en ecosistemas anaeróbicos (Garrity et al., 2001), los cuales, derivan su energía mediante metanogénesis hidrogenotrófica, es decir, a través de la siguiente reacción: $4\text{H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$. Debido a que en el rumen el CH_4 es producido principalmente por la ruta hidrogenotrófica, el H_2 y el CO_2 son los principales sustratos (Hungate, 1966), por lo tanto, con el uso del NO_3^- como un sumidero alternativo de H_2 se podría favorecer la disminución en la producción de CH_4 entérico. Debido a la ausencia de oxígeno a nivel ruminal, la reducción del NO_3^- se puede presentar en dos vías, asimilatoria y desasimilatoria (fig. 3). La reducción asimilatoria o desasimilatoria del NO_3^- depende del tipo de bacterias, las necesidades energéticas y el exceso de factores reductores presentes en el rumen. Durante los procesos asimilatorios se obtienen compuestos orgánicos a partir de elementos inorgánicos a través de la incorporación de factores

reductores presentes en el ambiente, lo que requiere un gasto energético en la reacción; mientras que en los procesos desasimilatorios se transforman elementos inorgánicos a partir de compuestos orgánicos para liberar energía.

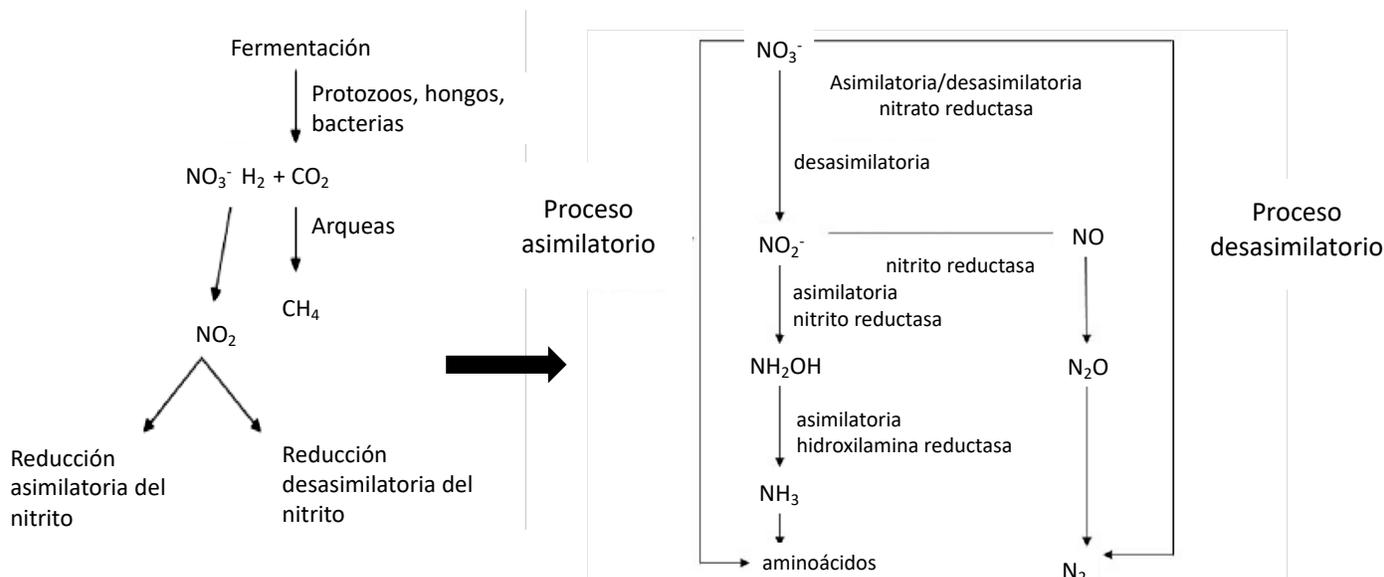


Figura 3. Reducción asimilatoria y desasimilatoria del nitrato
 Modificada de (Li *et al.*, 2016; Yang y Rooke, 2016)

Respuesta de los microorganismos ruminales al nitrato y a los productos de su reducción como el nitrito

El NO_3^- se comporta como un sumidero alternativo de electrones que compite con la metanogénesis (Morgavi *et al.*, 2012). Sin embargo, el uso del NO_3^- puede producir un efecto tóxico tanto en los microorganismos ruminales como en el hospedero. Desde el descubrimiento de la toxicidad por NO_3^- , se han realizado numerosas investigaciones del metabolismo del NO_3^- , ya que, la toxicidad de este se encuentra relacionada con factores como la dosis, el tipo de animal y el período de adaptación (O'Hara and Fraser, 1975). Los animales que consumen una dieta con alto contenido de NO_3^- pueden adaptarse

reduciendo los NO_3^- y los NO_2^- más rápidamente, debido al aumento de los microorganismos que metabolizan los NO_3^- en el rumen (Allison and Reddy, 1984). En los animales adaptados, el NO_2^- no se acumula en el plasma, disminuyendo el riesgo de toxicidad en el hospedero (Cockrum et al., 2010). Sinclair and Jones, (1964) demostraron un aumento en la tasa de reducción del NO_3^- cuando los microorganismos se adaptaron a la alimentación con alto contenido de este en la dieta. Se ha reportado que la coexistencia con bacterias celulolíticas facilita el crecimiento de *Selenomonas ruminantium*, una especie bacteriana reductora de NO_3^- que consecuentemente aumenta la reducción del NO_2^- , mientras que, la coexistencia con bacterias amilolíticas resulta en una mayor acumulación de NO_2^- en rumen. (Yoshii, Asanuma and Hino, 2003). Por lo anterior, se sugiere que podría ser importante mejorar la digestión de las fibras para suprimir la acumulación de NO_2^- en el rumen.

Sin embargo, puede haber otros componentes involucrados. Los intermedios de N-óxido, tales como el NO_2^- y el óxido nitroso (N_2O), pueden suprimir la metanogénesis directamente (Ungerfeld et al., 2005). (Klüber y Conrad, 1998) proporcionaron evidencia de este mecanismo, utilizando lodos anóxicos de suelo de arroz italiano, en los que especialmente después de la adición de NO_2^- y monóxido de nitrógeno (NO), los efectos tóxicos pudieron haber sido más importantes que la competencia. Se especula que los efectos tóxicos alteraron el equilibrio redox en las células microbianas, pero no se descartó la inhibición directa, dado que, los metanógenos no contienen menaquinona o cantidades apreciables de citocromos b- o c- y obtienen energía exclusivamente por la fosforilación ligada al transporte de electrones (Thauer, Jungermann y Decker, 1977), se sugiere la inhibición de los metanógenos por NO_2^- en el sistema portador de electrones. (Li et al., 2016; Yang y Rooke, 2016).

Wang et al. (2016) encontraron, a través de un estudio *in vitro*, que la suplementación con el NO_3^- inhibió la producción de equivalentes reductores. El uso de altas dosis NO_3^- (4 mmol/L) disminuyó la recuperación de H_2 y se utilizó una mayor proporción de equivalentes reductores para la producción de AGV, en comparación con el grupo de control. Basándose en el supuesto de que la reducción de un mol de NO_3^- necesita cuatro

moles de H_2 (Ungerfeld y Kohn 2006), los autores de este estudio calculan que la cantidad de H_2 utilizada para la reducción del NO_3^- podría ser mayor que la producida como resultado de la fermentación, por lo tanto, asumen que debe haber algún NO_3^- o NO_2^- residual en el líquido ruminal tamponado que conduzca a la toxicidad de los metanógenos, de modo que, el efecto del NO_3^- sobre la inhibición de CH_4 podría ser causado por su doble función como sumidero de H_2 y como agente tóxico para los metanógenos.

Según lo reportado por (Klüber and Conrad, 1998) la adición de NO_3^- a suspensiones anóxicas de suelo llevó a una inhibición inmediata y completa de la metanogénesis y dio como resultado la reducción de NO_3^- con NO_2^- , NO y N_2O acumulándose transitoriamente. Suponen que el NO_3^- fue principalmente desnitrificado con N_2 como producto final, pero no se puede excluir que parte del NO_3^- también se redujo a amonio. Las concentraciones de H_2 disminuyeron inmediatamente a valores que ya no permitían la metanogénesis, pero el acetato no disminuyó, ni siquiera aumentó. Además, concluyen de su trabajo en suelos de cultivos de arroz, que el efecto inhibitorio del NO_3^- no se debió principalmente a un aumento del potencial redox, sino a los efectos tóxicos del nitrato y/o sus productos de desnitrificación sobre las arqueas metanogénicas y tal vez otros microorganismos de la comunidad.

Los efectos tóxicos del NO_3^- se demostraron en experimentos de cultivos puros con *Methanosarcina barkeri*, una arquea metanogénica común en los suelos de arroz y *Methanobacterium bryantii*, un aislado del suelo del arroz, que ambos fueron inhibidos por el NO_2^- , el NO y el N_2O .

(Olijhoek *et al.*, 2016) reportaron que, la producción de metano (L / kg de CMS) se redujo en un 10,9% por la inclusión de NO_3^- al 1% en la dieta y está de acuerdo con estudios anteriores realizados en ganado lechero. Además, encontraron que alrededor de 5 horas después de la alimentación con NO_3^- , este ha sido metabolizado, absorbido o abandonado el rumen. En este estudio nuevamente se refleja el mismo comportamiento tóxico reportado por los autores anteriormente mencionados, ya que el aumento de los niveles de hidrógeno emitidos cuando las vacas fueron alimentadas con una ración con

NO_3^- adicional refleja una acumulación de H_2 en el rumen debido a que el hidrógeno no se convierte en CH_4 ni se utiliza en la reducción de NO_3^- . La pregunta sigue siendo: ¿por qué se redujo la producción de CH_4 en presencia de niveles acumulados de H_2 disponibles para la metanogénesis? La competencia directa de la reducción de NO_3^- con la metanogénesis para el H_2 disponible no funciona eficientemente con una mayor emisión de H_2 . Esto sugiere que la metanogénesis podría ser inhibida de otra manera, lo que también es sugerido por la literatura (Lund *et al.*, 2014; Guyader *et al.*, 2015; Latham *et al.*, 2016). El NO_2^- , que es un intermedio en la reducción de NO_3^- , puede acumularse en el líquido ruminal porque la reducción inicial de NO_3^- a NO_2^- ocurre a una velocidad mayor que la subsiguiente reducción de NO_2^- a amoníaco.

De igual manera se observó que el NO_2^- fue tóxico para metanógenos (*Methanosarcina barkeri* y *Methanobacterium bryantii*) en suelos de arroz (Klüber and Conrad, 1998) y estudios *in vitro* sugieren que el NO_2^- es tóxico para los metanógenos del rumen y por lo tanto puede contribuir a la menor producción de metano (Iwamoto, Asanuma y Hino, 2002; Sar *et al.*, 2005; Božic *et al.*, 2009; Zhou, Meng y Yu, 2011).

En rumiantes, el H_2 acumulado debe dirigirse a sumideros alternativos, especialmente los de importancia nutricional para el animal, tales como la acetogénesis reductora o la propiogénesis (Ungerfeld, 2013) encontró que ambos sumideros eran incapaces de incorporar todo el hidrógeno liberado de la metanogénesis inhibida, tal vez porque los valores ΔG de acetogénesis reductiva y propiogénesis bajo altas presiones de hidrógeno son similares a ΔG para la generación de ATP, haciendo ambas reacciones energéticamente desfavorables. Por lo tanto, otros sumideros de hidrógeno, tales como formiato y proteína microbiana o síntesis de ácidos grasos, se vuelven más importantes con el aumento de la inhibición de la metanogénesis (Ungerfeld, 2015). El formiato puede ser utilizado por los metanógenos para la metanogénesis (Hungate *et al.*, 1970). También puede funcionar como un donante de electrones para la reducción de NO_3^- a amonio (Leng, 2008). La adición de NO_3^- se acompañó de un aumento lineal en las proporciones molares de formiato ruminal en el estudio realizado por (Olijhoek *et al.*, 2016), lo que indica un aumento de la producción de formiato o disminución de la utilización de

formiato. El formiato se puede sintetizar a partir de hidrógeno (Wu *et al.*, 1993) o puede formarse como producto final de la fermentación (Ellis *et al.*, 2008). Las concentraciones de hidrógeno se incrementaron y se formaron acumulados *in vitro* cuando la metanogénesis fue inhibida por diferentes inhibidores de CH₄ (Wu *et al.*, 1993; Asanuma, Iwamoto y Hino, 1998, 1999). El formiato producido puede ser un mecanismo para disminuir localmente la presión de H₂ y a medida que se difunde en el líquido ruminal, se convierte en H₂ y CO₂.

El NO₂⁻ inhibe la fermentación y el crecimiento de los microbios ruminales por encima de 3mM. En experimentos *in vitro* con microorganismos ruminales mixtos, la adición de NO₃⁻ disminuyó la metanogénesis, en parte por el consumo de electrones, pero en mayor medida por la supresión de la fermentación debido al NO₂⁻ acumulado. Sin embargo, el efecto adverso del NO₂⁻ en la fermentación se alivió mediante la adición simultánea de fumarato (Iwamoto, Asanuma y Hino, 2001)

Efectos tóxicos del nitrato en bovinos

El nivel donde se muestran los signos clínicos de metahemoglobinemia es de 30 a 40% de MetHb, (Bruning-Fann y Kaneene, 1993a). El aumento de MetHb es causado por la absorción de nitrito (NO₂⁻) del rumen a sangre debido a la reducción incompleta de NO₃⁻ a amoníaco (Bruning-Fann and Kaneene, 1993a). La reacción del NO₂⁻ y la Hb en los eritrocitos induce la conversión del hierro ferroso (Fe₂⁺) en hierro férrico (Fe₃⁺), formando así MetHb (Takahashi y Young, 1991) y disminuye la capacidad de transporte de oxígeno de los eritrocitos. (Olijhoek *et al.*, 2016) encontraron que Los niveles de metahemoglobina en la sangre aumentaron con el aumento de la ingesta de NO₃⁻ en la dieta y variaron a lo largo del día con los valores más altos observados 1,5 h después de la alimentación matutina. El tiempo suficiente para la adaptación de los animales al NO₃⁻ permite a los microorganismos del rumen aumentar la velocidad de reducción de NO₃⁻ y NO₂⁻ junto con un aumento cuantitativo y una selección hacia las bacterias reductoras de NO₃⁻, que se ha demostrado *in vitro* (Allison and Reddy, 1984). En el trabajo realizado por Olijhoek *et al.* (2016) al aumentar la concentración de NO₃⁻ durante 6 días consecutivos en la dieta

no se produjo un aumento significativo en los niveles de MetHb, mostrando una respuesta positiva de los animales a la adaptación del NO_3^- en la dieta.

Los signos clínicos de intoxicación por MetHb pueden no ser evidentes cuando la MetHb es $<60\%$, mientras que las concentraciones $> 75\%$ se consideran letales. Bajo un buen manejo, los animales pueden usar NO_3^- sin aumentar la MetHb (Farra y Satter, 1971; Alaboudi and Jones, 1985; van Zijderveld *et al.*, 2010; Nolan y Hoptman, 2011).

Varios factores importantes influyen en la toxicidad del NO_2^- derivado del NO_3^- (Leng, 2008; Lin *et al.*, 2013): (a) altas concentraciones de NO_3^- en la dieta, (b) bajo consumo de energía, (c) tasas bajas de reducción de NO_2^- a amoníaco en el rumen, y (d) paso lento del rumen, dando como resultado alta concentración de NO_3^- , o retención de NO_2^- en el rumen. Los estudios *in vivo* han tenido cuidado de aumentar gradualmente el contenido de NO_3^- en la dieta durante un período de varias semanas para permitir que la microbiota ruminal se adapte y para que el metabolismo del NO_2^- aumente (Alaboudi and Jones, 1985; van Zijderveld *et al.*, 2010). Estas tasas de reducción de NO_2^- mejoradas son de primordial importancia para aumentar la seguridad con dietas con alto contenido de NO_3^- (Lin *et al.*, 2013).

La sintomatología por intoxicación con NO_2^- aparece luego de 1 a 6 horas después de ingestión de los NO_3^- , que reducidos a NO_2^- en el rumen son absorbidos causando la metahemoglobinemia. Se observa un síndrome de alteración respiratoria, generalmente aguda caracterizado por: disnea (cuello estirado, narinas dilatadas, contracción abdominal), taquicardia, micciones frecuentes, pulso acelerado, tambaleos, decúbito, coma y muerte. También se puede observar exoftalmia (ojos protruídos), congestión de la conjuntiva ocular, sialorrea, meteorismo, diarrea y vómitos. La sangre se observa rojo oscuro o amarronada, las mucosas y piel pueden verse cianóticas (azuladas). Las vacas preñadas que sobreviven suelen abortar. En el animal muerto, puede observarse la sangre de color chocolate que coagula con dificultad, además de hemorragias en el tracto digestivo, tráquea y corazón. La muerte sucede entre las 12-48 horas, aunque pueden

morir en minutos sin presentar signos clínicos. La rápida respuesta al tratamiento con azul de metileno, puede considerarse un diagnóstico terapéutico.

Adaptación de los bovinos al consumo de nitratos

Típicamente, el NO_3^- dietético se incrementa paso a paso con el tiempo. Sin embargo, el tiempo total de adaptación de los animales al NO_3^- varía ampliamente, al igual que el tiempo en cada etapa: 7-21 días de tiempo de adaptación total y 2-7 días en cada paso (Li *et al.*, 2011; van Zijderveld *et al.*, 2011; El-Zaiat *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015a). La estrategia óptima basada en la comparación de respuestas no parece haber sido investigada. Es necesario establecer las condiciones mínimas para una adaptación satisfactoria a las dietas que contienen nitratos. Durante la adaptación, las tasas de reducción de NO_3^- y NO_2^- (Alaboudi and Jones, 1985; Lin *et al.*, 2013), la actividad de nitrato reductasa (Asanuma, Yokoyama y Hino, 2015) y el número de bacterias reductoras de nitratos aumentan (Lin *et al.*, 2013). Sin embargo, como ya se ha mencionado, la tasa de reducción de NO_2^- es menor que la de la reducción de NO_3^- , lo que sigue favoreciendo la acumulación de NO_2^- . La razón para una adaptación exitosa puede ser que las mayores tasas de reducción de NO_3^- y NO_2^- aumentan la conversión neta de NO_3^- a compuestos menos tóxicos como el amoníaco (Yang y Rooke, *et al.*, 2016). Cuando se incluyen los donadores de electrones, como el formiato y el lactato, junto con el NO_3^- *in vitro*, aumentan la reducción de NO_2^- y reducen la producción de CH_4 en mayor medida que con el NO_3^- solo (Iwamoto, Asanuma y Hino, 2001).

Nitratos protegidos

Según (Anal y Singh, 2007; Nazzaro *et al.*, 2012), la protección del NO_3^- debe hacerse para estabilizar el material del núcleo; para el enmascaramiento de sabores, colores y olores desagradables; para el control de reacciones oxidativas y la protección de los componentes de la dieta. Además de la liberación controlada en el rumen. Las microesferas se pueden hacer para liberar su contenido por diversos medios. Estos incluyen la fractura por el calor, la solvatación, la difusión o la presión (Brannon-Peppas, 1997).

Según Mamvura *et al.* (2014). En tratamientos con NO_3^- encapsulados en gomas produjo más amoníaco, lo que sugiere una liberación lenta de nitrato, una propiedad que puede ser aprovechada para la protección de los animales contra la toxicidad del NO_2^- de tiempo que se consigue una reducción rápida y completa de NO_3^- a amonio. El resultado de este estudio sugiere que el potencial para la encapsulación de NO_3^- no sólo para la mitigación de CH_4 , sino también en la reducción del riesgo de intoxicación por NO_3^- , la protección de la salud y el bienestar de los animales. (Mamvura *et al.*, 2014).

Medición de metanógenos por qPCR

Los rumiantes poseen microbiota ruminal compleja para convertir el material vegetal ingerido en productos que producen energía. Esta simbiosis entre el hospedero y la microbiota ruminal ha evolucionado para hacer uso de pasturas con un alto contenido de carbohidratos estructurales y bajo valor nutricional. Las bacterias celulolíticas, los hongos anaeróbicos y algunos protozoos ciliados son los colonizadores y descomponedores iniciales de dicha alimentación fibrosa (Bauchop y Clarke, 1976; Akin y Benner, 1988). Los productos finales de fermentación, tales como ácidos grasos de cadena corta, son absorbidos por el hospedero a través de la pared del rumen. Las arqueas metanogénicas son beneficiarias del H_2 generado durante la fermentación de los piensos. Su metabolismo les permite ganar energía mediante la reducción del CO_2 con electrones de la oxidación H_2 , produciendo CH_4 . El CH_4 no puede ser utilizado por los rumiantes y se elimina del rumen por eructación.

Hasta la fecha, se han realizado profundos estudios de secuenciación de genes utilizando marcadores filogenéticos que se han concentrado en la investigación de la composición de la comunidad ruminal. Aunque el interés científico en la estructura y la función de los microorganismos eucariotas está aumentando, los estudios del rumen se centran en gran medida en los miembros bacterianos y arcaicos. Protozoos y hongos, aunque mucho menos abundante que las bacterias y las arqueas en términos de número de células, pueden representar aproximadamente la mitad de la biomasa microbiana ruminal total (Kittelmann *et al.*, 2013). Estos estudios se hacen por medio de técnicas

moleculares como la PCR cuantitativa en tiempo real, la cual permite la cuantificación sensible, específica y reproducible de los ácidos nucleicos. Desde su introducción, la PCR en tiempo real cuantitativa ha revolucionado el campo de los diagnósticos moleculares y la técnica se está utilizando en un número rápidamente creciente de aplicaciones. Esta tecnología ha permitido el cambio de diagnóstico molecular hacia una tecnología automatizada de alto rendimiento con tiempos de respuesta más bajos (Raeymaekers, 2000).

En un trabajo realizado por (Kittelmann *et al.*, 2013), con el objetivo de desarrollar un método por PCR en tiempo real, para la medición de la variedad de microorganismos ruminales encontraron que en todas las muestras, se presentó una correlación negativa general entre los metanógenos del clado *Methanobrevibacter ruminantium* y los del clado *Methanobrevibacter gottschalkii* ($R = -0.51$ [coeficiente de correlación de Spearman], $P = 0.023$ [valor p de Spearman]) Es decir, un aumento relativo en un grupo dio como resultado la disminución del otro grupo. Ambos grupos son metanógenos que utilizan H_2 , y presumiblemente compiten dentro del rumen. Curiosamente, hubo una correlación positiva ($R = 0.72$, $P = 6.26 \cdot 10^{-5}$) entre la ocurrencia de metanógenos en el clado de *Methanobrevibacter ruminantium* y bacterias en la familia *Fibrobacteraceae*. Por el contrario, la presencia de metanógenos en el clado *Methanobrevibacter gottschalkii* se correlacionó positivamente ($R = 0.90$, $P = 4.96 \cdot 10^{-14}$) con bacterias en la familia *Ruminococcaceae*. *Ruminococcus spp.* y *Fibrobacter spp.*, que son los dos principales degradadores de la celulosa en el rumen. *Ruminococcus spp.* producen grandes cantidades de H_2 , mientras que *Fibrobacter spp.* producen formiato. Tanto el H_2 como el formiato son sustratos para los metanógenos ruminales. La co-variación de los dos grupos de metanógenos con diferentes bacterias sugiere que los metanógenos pueden adaptarse a diferentes regímenes de H_2 ruminal o responder a diferencias en los precursores de CH_4 disponibles. *Methanobrevibacter ruminantium* M1, por ejemplo, parece ser especializado a concentraciones bajas de H_2 basadas en la presencia de sólo metil coenzima M reductasa I (McrI) y la ausencia de metil coenzima M reductasa II (McrII) isoenzima. McrI y McrII se expresan en niveles bajos y altos de H_2 ,

respectivamente, y los miembros del género *Methanobrevibacter* por lo general contienen ambas isoenzimas. Se están secuenciando genomas de representantes más ruminales de estos metanógenos, incluyendo miembros del clado *Methanobrevibacter gottschalkii*; De acuerdo a estos resultados se hace interesante el estudio genómico de arqueas y celulolíticas, ya que los datos resultantes pueden proporcionar una mayor comprensión de estos patrones de ocurrencia. La covariación también podría ser el resultado de interacciones altamente específicas entre ciertos metanógenos y bacterias.

Bibliografía

- Akin, D. E., & Benner, R. (1988). Degradation of polysaccharides and lignin by ruminal bacteria and fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(5), 1117–1125. <https://doi.org/10.1172/JCI108959>
- Alaboudi, A. R., & Jones, G. A. (1985). Effect of Acclimation To High Nitrate Intakes on Some Rumen Fermentation Parameters in Sheep. *Canadian Journal of Animal Science*, 65(4), 841–849. <https://doi.org/10.4141/cjas85-099>
- Allison, M. J., & Reddy, C. A. (1984). *Adaptations of gastrointestinal bacteria in response to changes in dietary oxalate and nitrate*. American Society for Microbiology.
- Anal, A. K., & Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*, 18(5), 240–251. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.01.004>
- Asanuma, N., Iwamoto, M., & Hino, T. (1998). Formate metabolism by ruminal microorganisms in relation to methanogenesis. *Animal Science and Technology*, 69(6), 576–584.
- Barnett, A. J. G., & Bowman, I. B. R. (1957). In vitro studies on the reduction of nitrate by rumen liquor. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 8(4), 243–248. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740080410>
- Bauchop, T., & Clarke, R. T. J. (1976). Attachment of the ciliate *Epidinium crawleyi* to plant fragments in the sheep rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, 32(3), 417–422.

- Bokranz, M., Katz, J., Schrder, I., Robertson, A. M., & Krger, A. (1983). *Nitrobiology*. 36–41.
- Božic, A. K., Anderson, R. C., Carstens, G. E., Ricke, S. C., Callaway, T. R., Yokoyama, M. T., Wang, J. K., & Nisbet, D. J. (2009). Effects of the methane-inhibitors nitrate, nitroethane, lauric acid, Lauricidin® and the Hawaiian marine algae *Chaetoceros* on ruminal fermentation in vitro☆. *Bioresource Technology*, *100*(17), 4017–4025. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.12.061>
- Bruning-Fann, C. S., & Kaneene, J. B. (1993). The effects of nitrate, nitrite, and N-nitroso compounds on animal health. *Veterinary and Human Toxicology*, *35*(3), 237–253.
- Cabello, P., Roldán, M. D., & Moreno-Vivián, C. (2004). Nitrate reduction and the nitrogen cycle in archaea. *Microbiology*, *150*(11), 3527–3546. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27303-0>
- Cockrum, R. R., Austin, K. J., Ludden, P. a, & Cammack, K. M. (2010). Effect of subacute dietary nitrate on production traits and plasma analytes in Suffolk ewes. *Animal: An International Journal of Animal Bioscience*, *4*(5), 702–708. <https://doi.org/10.1017/S1751731109991534>
- Dawson KA, A. M. (1988). Digestive disorders and nutritional toxicity. In Hobson PN (Ed.), *The Rumen Microbial Eco-system* (pp. 445–459).
- Ellis, J. L., Dijkstra, J., Kebreab, E., Bannink, A., Odongo, N. E., McBride, B. W., & France, J. (2008). Aspects of rumen microbiology central to mechanistic modelling of methane production in cattle. *Journal of Agricultural Science*, *146*(March 2016), 213–233. <https://doi.org/10.1017/s0021859608007752>
- El-Zaiat, H. M., Araujo, R. C., Soltan, Y. A., Morsy, A. S., Louvandini, H., Pires, A. V., Patino, H. O., Correa, P. S., & Abdalla, A. L. (2014). Encapsulated nitrate and cashew nut shell liquid on blood and rumen constituents, methane emission, and growth performance of lambs. *Journal of Animal Science*, *92*(5), 2214–2224. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-7084>
- Garrity, G. M., Holt, J. G., Whitman, W. B., Keswani, J., Boone, D. R., Koga, Y., Miller, T. L., Stetter, K. O., Zellner, G., Chong, S. C., Huber, H., Huber, G., Ferry, J. G., Ollivier, B., Mah, R. A., Sowers, K. R., Zhilina, T. N., Baker, C. C., Romesser, J. A., ... Hafenbradl,

- D. (2001). Phylum All. Euryarchaeota phy. nov. In *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology* (pp. 211–355). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-21609-6_17
- Garrity, G. M., Lilburn, T. G., Cole, J. R., Harrison, S. H., Euzéby, J., & Tindall, B. J. (2007). Phylum “Crenarchaeota” Garrity and Holt. 4. <https://doi.org/10.1601/nm.1>
- Guyader, J., Eugène, M., Meunier, B., Doreau, M., & Morgavi, D. P. (2015). Linseed (clinical trial) jas-93-7-3564. *J Anim Sci*, 3, 3564–3577. <https://doi.org/10.2527/jas2014-8196>
- Hristov, A. N., Firkins, J. L., Dijkstra, J., Kebreab, E., Waghorn, G., Makkar, H. P. S., Adesogan, A. T., Yang, W., Lee, C., Gerber, P. J., Henderson, B., & Tricarico, J. M. (2013). Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. *Journal of Animal Science*, 19, 5045–5069. <https://doi.org/10.2527/jas2013-6583>
- Hungate, R E, Smith, W., Bauchop, T., Yu, I., & Rabinowitz, J. C. (1970). Formate as an intermediate in the bovine rumen fermentation. *Journal of Bacteriology*, 102(2), 389–397.
- Hungate, Robert E., & Hungate, R. E. (1966). CHAPTER III – The Rumen Protozoa. In *The Rumen and its Microbes* (pp. 91–147). <https://doi.org/10.1016/B978-1-4832-3308-6.50006-1>
- Immig, I., Demeyer, D., Fiedler, D., Van Nevel, C., & Mbanzamihigo, L. (1996). Attempts to induce reductive acetogenesis into a sheep rumen. *Archiv Fur Tierernahrung*, 49(4), 363–370.
- Iwamoto, M., Asanuma, N., & Hino, T. (2002). Ability of *Selenomonas ruminantium*, *Veillonella parvula*, and *Wolinella succinogenes* to Reduce Nitrate and Nitrite with Special Reference to the Suppression of Ruminal Methanogenesis. *Anaerobe*, 8(2002), 209–215. <https://doi.org/10.1006/anae.2002.0428>
- Latham, E. A., Anderson, R. C., Pinchak, W. E., & Nisbet, D. J. (2016). Insights on alterations to the rumen ecosystem by nitrate and nitrocompounds. *Frontiers in Microbiology*, 7(MAR), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00228>
- Leahy, S. C., Kelly, W. J., Altermann, E., Ronimus, R. S., Yeoman, C. J., Pacheco, D. M., Li, D., Kong, Z., McTavish, S., Sang, C., Lambie, S. C., Janssen, P. H., Dey, D., & Attwood,

- G. T. (2010). The Genome Sequence of the Rumen Methanogen *Methanobrevibacter ruminantium* Reveals New Possibilities for Controlling Ruminant Methane Emissions. *PLoS ONE*, 5(1), e8926. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008926>
- Lee, C., Araujo, R. C., Koenig, K. M., & Beauchemin, K. A. (2015). Effects of encapsulated nitrate on enteric methane production and nitrogen and energy utilization in beef heifers. *Journal of Animal Science*, 93(5), 2391–2404. <https://doi.org/10.2527/jas.2014-8845>
- Lee, R. E. (2008). Basic characteristics of the algae. In *Phycology*. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511812897.002>
- Lewis, D. (1951). The metabolism of nitrate and nitrite in the sheep. 1. The reduction of nitrate in the rumen of the sheep. *Biochemical Journal*, 48, 175–180. <https://doi.org/10.1042/bj0480175>
- LEWIS, D. (1951). The metabolism of nitrate and nitrite in the sheep; the reduction of nitrate in the rumen of the sheep. *The Biochemical Journal*, 48(2), 175–180. <https://doi.org/10.1042/bj0480175>
- Li, Y., Leahy, S. C., Jeyanathan, J., Henderson, G., Cox, F., Altermann, E., Kelly, W. J., Lambie, S. C., Janssen, P. H., Rakonjac, J., & Attwood, G. T. (2016). The complete genome sequence of the methanogenic archaeon ISO4-H5 provides insights into the methylotrophic lifestyle of a ruminal representative of the Methanomassiliicoccales. *Standards in Genomic Sciences*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s40793-016-0183-5>
- Lin, L., Jin, L., Kimura, A., Carrington, M., & Mignot, E. (1997). DQ microsatellite association studies in three ethnic groups. *Tissue Antigens*, 50(5), 507–520. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.1997.tb02907.x>
- Lin, M., Schaefer, D. M., Zhao, G. Q., & Meng, Q. X. (2013). Effects of nitrate adaptation by rumen inocula donors and substrate fiber proportion on in vitro nitrate disappearance, methanogenesis, and rumen fermentation acid. *Animal*, 7, 1099–1105. <https://doi.org/10.1017/S1751731113000116>

- Liu, Y., & Whitman, W. B. (2008). Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1125, 171–189. <https://doi.org/10.1196/annals.1419.019>
- Lund, P., Dahl, R., Yang, H. J., Hellwing, A. L. F., Cao, B. B., & Weisbjerg, M. R. (2014). The acute effect of addition of nitrate on in vitro and in vivo methane emission in dairy cows. *Animal Production Science*, 54(9), 1432–1435. <https://doi.org/10.1071/AN14339>
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Parker, J. (2003). *Brock biology of microorganisms*. Prentice Hall/Pearson Education.
- Mamvura, C. I., Cho, S., Mbiriri, D. T., Lee, H. G., & Choi, N. J. (2014). Effect of encapsulating nitrate in sesame gum on in vitro rumen fermentation parameters. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 27(11), 1577–1583. <https://doi.org/10.5713/ajas.2014.14280>
- McAllister, T. A., & Cheng, K. J. (1996). Microbial strategies in the ruminal digestion of cereal grains. *Animal Feed Science and Technology*, 62(1 SPEC. ISS.), 29–36. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(96\)01003-6](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(96)01003-6)
- Morgavi, D. P., Forano, E., Martin, C., & Newbold, C. J. (2012). Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants – CORRIGENDUM. *Animal*, 6(05), 871. <https://doi.org/10.1017/S1751731112000407>
- Nazzaro, F., Orlando, P., Fratianni, F., & Coppola, R. (2012). Microencapsulation in food science and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 182–186. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.10.001>
- Nolan, K. A., D'angelo, D., & Hoptman, M. J. (2011). *Self-report and laboratory measures of impulsivity in patients with schizophrenia or schizoaffective disorder and healthy controls*. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2010.10.032>
- O'Hara, P. J., & Fraser, A. J. (1975). Nitrate poisoning in cattle grazing crops. *New Zealand Veterinary Journal*, 23(4), 45–53. <https://doi.org/10.1080/00480169.1975.34192>.
- Raeymaekers, L. (2000). Basic principles of quantitative PCR. *Mol Biotechnol*, 15(2), 115–122. <https://doi.org/10.1385/mb:15:2:115>
- Sar, C., Mwenya, B., Santoso, B., Takaura, K., Morikawa, R., Isogai, N., Asakura, Y., Toride, Y., & Takahashi, J. (2005). Effect of *Escherichia coli* wild type or its derivative with high

- nitrite reductase activity on in vitro ruminal methanogenesis and nitrate/nitrite reduction. *Journal of Animal Science*, 83(3), 644–652.
- Sejrsen, K., Hvelplund, T. (Torben), & Nielsen, M. O. (Mette O. (2006). *Ruminant physiology : digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress*. Wageningen Academic Publishers.
- Sinclair, K. B., & Jones, D. I. H. (1964). Nitrate toxicity in sheep. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 15(10), 717–721. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740151010>
- Stephenson, M. (1998). *SPECIAL Biochemistry of methanogenesis : a tribute to*. 2377–2406.
- Stickland, A. H. (1933). *the Reduction of One-Carbon Compounds Co2*.
- Thauer, R. (1998). Biochemistry of methanogenesis : a tribute to. *Microbiology*, 144(1998), 2377–2406. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-9-2377>
- Thauer, R. K., Jungermann, K., & Decker, K. (1977). Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological Reviews*, 41(1), 100–180.
- Tymensen, L. D., & McAllister, T. A. (2012). Community structure analysis of methanogens associated with rumen protozoa reveals bias in universal archaeal primers. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(11), 4051–4056. <https://doi.org/10.1128/AEM.07994-11>
- Ungerfeld, E., & Kohn, R. (2006). The Role of Thermodynamics in the Control of Ruminal Fermentation. In *Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism and Impact of Nutrition on Gene Expression, Immunology and Stress* (pp. 55–85).
- Ungerfeld, E. M., Rust, S. R., Burnett, R. J., Yokoyama, M. T., & Wang, J. K. (2005). Effects of two lipids on in vitro ruminal methane production. *Animal Feed Science and Technology*, 119(1–2), 179–185. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2004.12.007>
- Ungerfeld, Emilio M. (2013). A theoretical comparison between two ruminal electron sinks. *Frontiers in Microbiology*, 4, 319. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00319>
- Ungerfeld, Emilio M. (2015). Shifts in metabolic hydrogen sinks in the methanogenesis-inhibited ruminal fermentation: a meta-analysis. *Frontiers in Microbiology*, 6, 37. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00037>
- van Zijderveld, S. M., Gerrits, W. J. J., Apajalahti, J. A., Newbold, J. R., Dijkstra, J., Leng, R. A., & Perdok, H. B. (2010). Nitrate and sulfate: Effective alternative hydrogen sinks for

- mitigation of ruminal methane production in sheep. *Journal of Dairy Science*, 93(12), 5856–5866. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3281>
- van Zijderveld, S. M., Gerrits, W. J. J., Dijkstra, J., Newbold, J. R., Hulshof, R. B. a, & Perdok, H. B. (2011). Persistency of methane mitigation by dietary nitrate supplementation in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 94(8), 4028–4038. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4236>
- Wang, M., Wang, R., Yang, S., Deng, J. P., Tang, S. X., & Tan, Z. L. (2016). Effects of three methane mitigation agents on parameters of kinetics of total and hydrogen gas production, ruminal fermentation and hydrogen balance using in vitro technique. *Animal Science Journal*, 87(2), 224–232. <https://doi.org/10.1111/asj.12423>
- Wu, Z., Huber, J. T., Sleiman, F. T., Simas, J. M., Chen, K. H., Chan, S. C., & Fontes, C. (1993). Effect of Three Supplemental Fat Sources on Lactation and Digestion in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 76(11), 3562–3570. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77695-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77695-X)
- Yanagita, T., Kobayashi, H., Yamamoto, R., Kataoka, H., Yokoo, H., Shiraishi, S., Minami, S., Koono, M., & Wada, A. (2002). Protein Kinase C- α and - ϵ Down-Regulate Cell Surface Sodium Channels via Differential Mechanisms in Adrenal Chromaffin Cells. *Journal of Neurochemistry*, 74(4), 1674–1684. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0741674.x>
- Yang, C., Rooke, J. A., Cabeza, I., & Wallace, R. J. (2016). Nitrate and inhibition of ruminal methanogenesis: Microbial ecology, obstacles, and opportunities for lowering methane emissions from ruminant livestock. In *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00132>
- Yoshii, T., Asanuma, N., & Hino, T. (2003). Number of nitrate- and nitrite-reducing *Selenomonas ruminantium* in the rumen, and possible factors affecting its growth. *Animal Science Journal*, 74(6), 483–491. <https://doi.org/10.1046/j.1344-3941.2003.00142.x>
- Zhou, Z., Meng, Q., & Yu, Z. (2011). Effects of Methanogenic Inhibitors on Methane Production and Abundances of Methanogens and Cellulolytic Bacteria in In Vitro Ruminal Cultures . *Applied and Environmental Microbiology*, 77(8), 2634–2639. <https://doi.org/10.1128/aem.02779-10>

- Zhou, Z., Yu, Z., & Meng, Q. (2012). Effects of nitrate on methane production, fermentation, and microbial populations in in vitro ruminal cultures. *Bioresource Technology*, *103*(1), 173–179. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.013>
- Ziemer, C. J., Sharp, R., Stern, M. D., Cotta, M. A., Whitehead, T. R., & Stahl, D. A. (2000). Comparison of microbial populations in model and natural rumens using 16S ribosomal RNA-targeted probes. *Environmental Microbiology*, *2*(6), 632–643. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2000.00146.x>

CAPÍTULO 1. NITRATO PROTEGIDO CON JABÓN Y SU EFECTO EN LA PRODUCCIÓN DE METANO, FERMENTACIÓN Y DEGRADABILIDAD DE LA MATERIA SECA *IN VITRO*.

Abstract

Due to growing concerns about global warming, attention has been given to the role of nitrate (NO_3^-) as a means of mitigating enteric methane (CH_4) emissions, as NO_3^- can act as an alternative sink for hydrogen (H_2) in the rumen. With the aim of developing a method of protection of NO_3^- and testing it with an unprotected source to evaluate its effect on the dry matter (DM) degradation and the production of CH_4 *in vitro*, 4 treatments were evaluated that consisted of a substrate of Kikuyo grass (*Pennisetum clandestinum*) (KK) as a base diet and the mixture of this with 3 additives: kikuyo + free potassium nitrate (NL), kikuyo + potassium nitrate protected with soap (NP) and kikuyo + urea (KU). Each treatment with free or encapsulated NO_3^- presents an inclusion of NO_3^- of 3% of the incubated DM. Treatments were evaluated as repeated measures over time, using PROC MIXED from SAS. The results indicate that the inclusion of NP in DM degradation, gas production and CH_4 production ($p < 0.05$). LN decreased gas production at 48 h and CH_4 production at 24 and 48 h ($p < 0.05$), without affecting DM degradation. In conclusion, the results indicate that in a diet with kikuyo, the use of NP in an inclusion of NO_3^- of 3% of the DM, can reduce the production of CH_4 by 53% after 48 hours *in vitro*. However, the use of soy soap as a method of protecting NO_3^- should be considered in more detail, since its lipid nature can present a high toxic potential on ruminal microorganisms, decreasing the DM degradation.

Keywords: *soap, Kikuyu, urea, ruminal fluid, degradation.*

Resumen

Debido a la creciente preocupación por el calentamiento global, se ha prestado atención al papel del nitrato (NO_3^-) como medio de mitigar las emisiones de metano (CH_4) entérico, ya que el NO_3^- puede actuar como un sumidero alternativo de hidrógeno (H_2) en el rumen. Con el objetivo de desarrollar un método de protección de NO_3^- y probarlo con una fuente desprotegida para evaluar su efecto sobre la materia seca degradada (MSD) y la producción de CH_4 *in vitro*, se evaluaron 4 tratamientos que consistieron en un sustrato de pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) (KK) como dieta base y la mezcla de este con 3 aditivos: kikuyo + nitrato de potasio libre (NL), kikuyo + nitrato de potasio protegido con jabón (NP) y kikuyo + urea (KU). Cada tratamiento con NO_3^- libre o encapsulado, presenta una inclusión de NO_3^- del 3% de la MS incubada. Los tratamientos se evaluaron como medidas repetidas en el tiempo, utilizando PROC MIXED de SAS. La inclusión de NP disminuyó la MSD ($P < 0.0016$) con respecto al KK durante las primeras 24 h de incubación. La producción total de gas, CH_4 y la proporción de CH_4/MSD ($P < 0.0001$) se redujeron con la inclusión de NL y NP a lo largo de las 48 h *in vitro*. En conclusión, los resultados indican que en una dieta con kikuyo, el uso de NP en una inclusión de NO_3^- del 3% de la MS, puede llegar a reducir en un 53% la producción de CH_4 transcurridas 48 horas *in vitro*. Sin embargo, el uso del jabón de soya como método de protección de NO_3^- debe ser considerado con más detalle, debido a que su naturaleza lipídica puede presentar un alto potencial tóxico sobre los microorganismos ruminales, disminuyendo la MSD.

Palabras clave: jabón, kikuyo, urea, líquido ruminal, degradación.

Introducción

El metano (CH_4) es el gas de efecto invernadero (GEI) antropogénico más abundante después del dióxido de carbono (CO_2). Si bien el CH_4 permanece en la atmósfera durante un período más corto de tiempo y se emite en cantidades más pequeñas que el CO_2 , su potencial de calentamiento global (es decir, la capacidad del gas de atrapar calor en la

atmósfera) es entre 25 y 34 veces mayor (IPCC 2013). Las emisiones de CH₄ entérico representan el 30% de las emisiones mundiales de este gas. Debido a que el CH₄ es un contaminante climático de vida corta, la reducción de las emisiones de CH₄ entérico pueden ayudar a mitigar el cambio climático dentro de nuestro actual tiempo de vida. (FAO 2018). La producción de (CH₄) ocurre durante la fermentación entérica de la materia orgánica, debido a la necesidad de remover el hidrógeno del rumen para mantener un bajo potencial redox en el sitio de la fermentación. El nitrato (NO₃⁻), un aceptor de electrones, se ha estudiado como una vía potencial para direccionar los equivalentes reducidos lejos de la metanogénesis; presentándose como una ruta disipadora de hidrógenos con utilidad para el animal y el medio ambiente (Lee y Beauchemin 2014). En el rumen el NO₃⁻ es reducido a nitrito (NO₂⁻) (NO₃⁻ + H₂ → NO₂⁻ + H₂O) y este al ion amonio (NH₄⁺) (NO₂⁻ + 3H₂ + 2H⁺ → NH₄⁺ + 2H₂O), proceso que captura cuatro moles de hidrogeno por mol de NO₃⁻ reducido (Hino y Asanuma 2003). La reducción de NO₃⁻ a NO₂⁻ tiene un ΔG = -130 kJ y de NO₂⁻ a NH₄⁺, presenta un ΔG = -371 kJ, los cuales son energéticamente más favorables que la producción de metano (ΔG = -67 KJ) (Ungerfeld y Kohn 2006). La reducción de NO₂⁻ a NH₄⁺ es un paso lento, debido a la baja producción de la enzima nitrito-reductasa de los microorganismos ruminales, lo que puede conducir a un aumento en los nitritos a nivel ruminal. Estos nitritos atraviesan la pared ruminal y pasan a la circulación sanguínea uniéndose a la hemoglobina y formando metahemoglobina, afectando el transporte de oxígeno en la sangre; lo que finalmente podría provocar la muerte por hipoxia (Bruning-Fann y Kaneene 1993).

Considerando que el suministro del NO₃⁻ puro puede presentar riesgos para la salud del animal, se han realizado varios trabajos con NO₃⁻ encapsulado para exponer el NO₃⁻ lentamente a los microorganismos ruminales y disminuir su potencial de toxicidad (Lee et al., 2015, 2017; Mamvura et al., 2014).

El objetivo de esta investigación fue desarrollar un método de protección de NO₃⁻ y testarlo con una fuente no protegida para evaluar su efecto sobre sobre la degradación de la materia seca y la producción de metano *in vitro*.

Materiales y métodos

Con el propósito de evaluar el efecto del NO_3^- libre y protegido sobre la MSD y producción de CH_4 *in vitro*, fueron llevados a cabo los siguientes procesos.

Encapsulación del nitrato

La protección del NO_3^- se realizó con el uso de un jabón, producido artesanalmente a partir de la saponificación de un aceite de soya comercial. Brevemente, 9 gr de hidróxido de sodio (NaOH) y 9 ml de agua fueron mezclados en un beaker con la ayuda de un agitador de vidrio, luego se adicionó 9 ml de etanol y se agitó por dos minutos (mezcla 1). En un recipiente de vidrio aparte se mezclaron 20 ml de agua con 20 ml de etanol (mezcla 2). A la mezcla 1 se le adicionó 5 gr de aceite de soya, se mezcló hasta que se solidificó (mezcla 3). La mezcla 3 se puso a calentar a una temperatura de 80 °C en agitación constante hasta que se observó la formación de espuma, momento en el cual se le adicionó la mezcla 2 para disminuir la espuma, esta se tornó de color amarillo (mezcla 4) y se mantuvo en agitación por 30 minutos. En un recipiente aparte se mezclaron 25 gr de cloruro de sodio (NaCl) con 75 ml de agua y se calentaron a 100 °C durante 5 min y posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente (mezcla 5). Finalmente se unieron las mezclas 4 y 5 y se agitaron durante un minuto hasta que se observó un color blanco, momento en el cual se procedió a filtrar en un papel filtro estándar y un embudo. Después del filtrado se le adicionó nitrato de potasio (KNO_3) para formar el NO_3^- protegido. Este producto final se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 24 h para su posterior uso en la técnica *in vitro*.

Composición nutricional del pasto kikuyo (*Pennisetum Clandestinum* Host. Ex Chiov)

Luego de ser cosechadas, las muestras del pasto kikuyo fueron parcialmente secadas en un horno de ventilación forzada a 60 °C por 72 h, molidas con un tamiz de 1 mm en un molino Thomas–Wiley (Arthur M. Thomas, Philadelphia, PA, USA) y almacenadas en

bolsas plásticas selladas y marcadas para su posterior análisis químico. Los análisis de MS, proteína cruda (PC) y cenizas se hicieron de acuerdo (AOAC 2005). La fibra detergente neutra (FDN) fue analizada inicialmente usando amilasa estable al calor para su posterior análisis de fibra en detergente ácido (FDA) según (Van Soest, Robertson y Lewis, 1991).

Tabla 1. Composición nutricional (base seca) del pasto kikuyo (*Pennisetum Clandestinum* Host. Ex Chiov)

Composición nutricional	%
Materia seca - MS	23.5
Proteína cruda -PC	20.60
Fibra en detergente neutro - FDN	57.15
Fibra en detergente ácido - FDA	30.3
Cenizas	11.48

El contenido de nitrógeno amoniacal (N-NH₃) presente en los aditivos seleccionados para usar en la técnica *in vitro* (Tabla 2), fue medido a través del el método de Kjeldahl según la AOAC (1995).

Tabla 2. Concentración de nitrógeno en los aditivos evaluados

Muestra	%N (g nitrógeno/100 g muestra)
Urea	48,17
KNO ₃	13,0
Jabón + KNO ₃	3,9

KNO₃, nitrato de potasio; jabón, aceite de soya saponificado.

Técnica *in vitro*

Inóculo

En la técnica *in vitro* se usaron 3 inóculos que fueron colectados de 3 vacas Holstein adultas, canuladas y no lactantes, ubicadas en la Hacienda La Montaña, propiedad de la Universidad de Antioquia. La dieta base era pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*), sal mineralizada y agua; la colecta del líquido ruminal o inóculo fue realizada de forma manual a través de la fistula en las horas de la mañana (6 am) y transportado hasta el laboratorio en recipientes térmicos previamente climatizados con agua a 39 °C. En el laboratorio el líquido ruminal fue gaseado con CO₂ y filtrado a través de 4 capas de algodón y conservado en un baño maría a 39 °C para el proceso de inoculación.

Fermentación *in vitro*

Para la incubación *in vitro* fue empleado como alimento base el pasto kikuyo (*Pennisetum Clandestinum Host. Ex Chiov*) de 45 días de rebrote, cuya composición química esta descrita en la Tabla 1. El pasto kikuyo, luego de ser cosechado fue pre-secado en estufa de ventilación forzada a 65 °C por 72 h y posteriormente fue molido a 1 mm utilizando un molino Thomas-Wiley y almacenado en un recipiente cerrado a temperatura ambiente. Los tratamientos evaluados fueron pasto kikuyo incubado como tratamiento control (KK), pasto kikuyo + nitrato sin protección (NL), pasto kikuyo + nitrato protegido (NP) y pasto kikuyo + urea (KU). Los tratamientos con NO₃⁻ fueron ajustados para aportar 3% de nitrato / g MS incubada. El NP corresponde al nitrato protegido que se elaboró con anterioridad. El tratamiento con urea se incluyó para evidenciar el efecto que tendría la adición de nitrógeno sobre la degradación de la materia seca y la producción de CH₄.

Un día antes del inicio del experimento, una solución buffer fue preparada como lo describe McDougall (1948). Esta solución se mezcló con cada inóculo en una proporción 9:1 (buffer: inóculo). Una muestra de 0.5 g de pasto kikuyo y los aditivos a evaluar fueron pesados y dispuestos en frascos de vidrio con capacidad de 100 ml. Posteriormente, un

volumen de 50 ml de la solución buffer-inóculo fue adicionado a cada frasco, durante el proceso continuamente se gaseó con CO₂ para garantizar condiciones de anaerobiosis y se procedió a su sellado con tapones de caucho. Los frascos sellados se mantuvieron en estufa de ventilación forzada a 39 °C y fueron retirados del proceso de incubación en los horarios de 24 y 48 horas posteriores a la incubación para determinar la degradación de la MS y la producción de CH₄.

En total se incubaron 60 frascos: 48 frascos con sustrato e inóculo (4 tratamientos * 3 repeticiones/ tratamiento * 2 horarios de lectura * 2 replicas/ horario) y 12 frascos correspondientes a los blancos (2 horarios de lectura* 3 inóculos * 2 blancos por horario). Los blancos son frascos con solución buffer e inóculo sin sustrato ni aditivo, cuya función es corregir la producción de gases y degradación de la MS generado por el inóculo.

Perfil de fermentación

La producción total de gases fue medida a las 24 y 48 h de incubación a través de la medición de la presión generada en cada frasco con el uso de un transductor digital (Ashcroft 2089QG- Precision Digital Test Gauges, USA) medida en libras por pulgadas cuadradas (PSI), este dato fue transformado a volumen (ml) con la aplicación de la ecuación $Y = -0.1375 + 5.1385X + 0.0777X^2$ (Posada et al., 2006). Posterior a esta medición se procedió a tomar una muestra de gas para determinar la concentración de gas CH₄, para esto, una válvula de 3 salidas fue empleada. La primera salida fue conectada a una aguja (0.6 mm), la segunda conectada al transductor de presión y la tercera a una jeringa plástica que sirvió para la extracción de la muestra de gas. La aguja acoplada a la válvula fue insertada a través de la tapa de caucho para la medición de la presión y posteriormente, los gases acumulados en la parte superior del frasco se retiraron con el uso de la jeringa hasta el punto en que la presión registrada en el transductor alcanzó a ser cero. El gas colectado en la jeringa fue almacenado en bolsas de poliolefina coextruida tipo Clear Flex (Baxter, USA). Estas bolsas generalmente utilizadas para el empaque de suero fisiológico, cuentan con un conector de polietileno de dos tubos equipados con unas membranas especializadas para permitir el ingreso del

gas a través de una aguja hacia el interior de la bolsa para ser almacenado y evitar la salida de este al exterior, según el protocolo descrito por Posada et al. (2014). Luego de finalizar la toma de muestras, se procedió con la medición de las concentraciones de CH₄ por cromatografía gaseosa. Una submuestra de 100 µl de gas fue tomada de cada bolsa con la ayuda de una jeringa para ser inyectada en un cromatógrafo de gases Thermo Trace GC Ultra (Thermo Scientific, USA) dispuesto con un detector de ionización de llama (FID). Se emplearon las condiciones cromatográficas descritas por Apráez et al. (2012). Columna apolar de 30 m, 0.25 mm y 0.25 µm. El puerto de inyección del gas contaba con una temperatura de 200 °C, modo de inyección Split 50:1, temperatura del detector 250 °C y una temperatura inicial del horno de 30 °C durante 5 min, con una rampa de 30 °C/min hasta completar 200 °C; finalmente se utilizó helio como gas de arrastre a razón de 1 ml/min.

La producción de CH₄ se estableció como el producto del volumen total de gas registrado en el tiempo de incubación (24 y 48 h) y la concentración de CH₄ determinada en la muestra por cromatografía de gases.

Después del muestreo de gas en cada horario de medición se abrieron los frascos para medir la materia seca degradada (MSD), la cual fue determinada por diferencia de peso entre la MS incubada (MSI) y el residuo después de su incubación. Para determinar la MSD por gravimetría, el contenido de cada frasco fue filtrado a través de crisoles de vidrio (porosidad 1, 100 - 160 µm) con ayuda de una bomba de vacío. El conjunto crisol-residuo fue secado en estufa de ventilación forzada a 60 °C por 48 horas y posteriormente pesado. Luego de descontar el peso del crisol se obtuvo el valor de la MS degradada como la diferencia entre la MS del residuo y la MS del blanco, todo esto dividido entre el valor de la MS inicialmente incubada (Posada et al., 2014). La fracción líquida de cada frasco de incubación se preservó con la adición de ácido sulfúrico (98% v/v) gota a gota hasta lograr un pH promedio de 2; cada muestra fue centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos y finalmente se tomó una submuestra de 1.5 mL de sobrenadante para la medición de los ácidos grasos volátiles (AGV), (acético, propiónico y butírico), por

cromatografía gaseosa. Las muestras fueron inyectadas en un cromatógrafo de gases Thermo Trace GC Ultra (Thermo Scientific, USA). Las condiciones cromatográficas fueron adaptadas de Apráez et al. (2012). Se empleó una columna capilar supelcowax-10 de 30 m, 0.25 mm y 0.25 μm . La programación de la temperatura fue inicialmente de 68 °C por un minuto, luego aumentó 10 °C/min hasta alcanzar 140 °C durante un minuto y finalmente tuvo un aumento de 40 °C/min hasta alcanzar 200 °C. Se utilizó un detector FID a 280 °C y la temperatura del inyector Split fue de 250 °C con un volumen de inyección de 1 μl . La concentración de AGV (mmol/L) fue calculada a partir de la concentración (ppm) determinada por cromatografía y asumiendo una masa molar de 60.05, 74.08 y 88.11 g/mol para el ácido acético, propiónico y butírico, respectivamente. El sobrenadante restante se utilizó para determinar las concentraciones de nitrógeno amoniacal (N-NH₃) por el método de Kjeldahl (AOAC 1995).

Análisis estadístico

Para medir el efecto del tratamiento sobre la producción de CH₄, producción de gases, MSD a nivel *in vitro*, un modelo de medidas repetidas en el tiempo fue empleado, con ayuda del procedimiento PROC MIXED de SAS (SAS® University Edition, 2019) donde los efectos fijos correspondieron al tratamiento y el tiempo (horarios), y el efecto aleatorio a la fuente de inóculo ruminal (animal). Las medias se ajustaron y compararon según la prueba de *Tukey - Kramer* ($P < 0.05$).

Para determinar las diferencias entre tratamientos con respecto a la producción de AGV y N-NH₃ a las 24 horas se utilizó un modelo completamente aleatorizado, empleando el procedimiento GLM de SAS (SAS® University Edition, 2019). Las diferencias entre medias fueron determinadas a través de un test de comparaciones múltiples de *Duncan* ($P < 0.05$).

Resultados

Degradación de la materia seca, producción de gases y metano *in vitro*

El efecto del NO_3^- sobre la MSD, producción de gases y producción de CH_4 *in vitro* en los intervalos de medición de 0 a 24 h y 0 a 48 h se presentan en la Tabla 3. Ambos tratamientos con NO_3^- presentaron una disminución en la MSD (g) a las 24 h de incubación. Sin embargo, el NP fue el que más afectó la degradación con una reducción del 24% Vs. el 18% del NL con respecto al KK ($P < 0.0016$). A las 48 h de incubación no se presentaron diferencias estadísticas entre tratamientos. Cuando esta variable fue expresada en MSD como proporción de la MSI (MSD/MSI, %), a las 24 h el tratamiento NP disminuyó en un 15% ($P < 0.0001$) con respecto al KK. Transcurridas 48 h, se observa una reducción del 14% con NL y 11% con NP en comparación con el tratamiento de KU ($P < 0.0001$). Cuando se contrastan los tratamientos KU y KK, se evidencia que la adición de urea al ambiente de fermentación no tuvo efecto sobre la degradación de la materia seca y la producción de CH_4 , indicando que el aporte de nitrógeno en el tratamiento control (KK) fue el suficiente para mantener la actividad microbiana durante el proceso de incubación.

La producción total de gas se redujo significativamente con el tratamiento NP a las 24 horas de incubación, en comparación con los tratamientos KK y KU. Transcurridas 48 horas de incubación *in vitro*, los tratamientos NP y NL disminuyeron en promedio un 30% la producción total de gas con relación a los tratamientos KK y KU ($P < 0.05$). Cuando se expresó el volumen de gas en mL /g MSD, el tratamiento NP produjo un 35% y 28% menos de gas que el KK durante las 24 y 48 horas *in vitro*.

Los tratamientos NL y NP redujeron en un 68% y 80% la producción total de CH_4 con respecto al KK ($P < 0.05$) a las 24 horas. Finalizadas las 48 horas el tratamiento NL mantiene un 68% de reducción en el volumen de CH_4 y NP alcanza una disminución del 53% con respecto al KK. El volumen de CH_4 (mL) por gramo de MSD presentó cambios

significativos con los tratamientos de NP y NL con respecto al tratamiento KK ($P < 0.05$). Se produjeron 23 y 35 ml de CH_4/g de MSD menos que con el NP a las 24 y 48 horas, respectivamente, en comparación con el KK. Con el tratamiento NL la diferencia fue de 19 y 45 mL de CH_4/g de MSD a las 28 y 48 horas.

Tabla 3. Efecto del nitrato (NO_3^-) sin protección y protegido con jabón en la producción total de gas, producción de metano (CH_4) y materia seca degradada (MSD) en dos diferentes horarios de fermentación *in vitro*.

Variable	Horario incubación	Tratamientos ¹				SEM	Efectos		
		KK	NL	NP	KU		T ²	Ti ³	Tx Ti ⁴
MSD ⁵ , g	0 a 24 h	0.266 ^a	0.218 ^{bc}	0.202 ^c	0.248 ^{ab}	0.009	0.0016	<.0001	0.0261
	0 a 48 h	0.271	0.270	0.267	0.302				
MSD como proporción de la MSI ⁶ , %	0 a 24 h	55.5 ^{ab}	49.23 ^{bc}	47.03 ^c	56.1 ^a	1.462	<.0001	<.0001	0.332
	0 a 48 h	64.57 ^{ab}	58.50 ^b	60.53 ^b	67.93 ^a				
Gas total, ml	0 a 24 h	46.9 ^a	35.15 ^{ab}	23.39 ^b	45.12 ^a	2.891	<.0001	<.0001	0.0174
	0 a 48 h	84.15 ^a	57.12 ^b	60.09 ^b	84.42 ^a				
CH ₄ total, ml	0 a 24 h	8.19 ^a	2.61 ^b	1.59 ^b	7.77 ^a	0.714	<.0001	<.0001	0.0013
	0 a 48 h	17.70 ^a	5.69 ^b	8.30 ^b	16.35 ^a				
CH ₄ como proporción del gas total, %	0 a 24 h	17.50 ^a	7.35 ^b	6.75 ^b	17.20 ^a	0.86	<.0001	<.0001	0.0534
	0 a 48 h	21.01 ^a	9.74 ^b	13.83 ^b	19.38 ^a				
Gas/MSD, ml/g	0 a 24 h	177.82 ^a	161.04 ^{ab}	115.34 ^b	181.49 ^a	13.695	<.0001	<.0001	0.0114

	0 a 48 h	313.89 ^a	211.21 ^c	225.62 ^b	279.68 ^{ab}				
CH ₄ /MSD, ml/g	0 a 24 h	30.89 ^a	11.96 ^b	7.81 ^b	31.24 ^a				
	0 a 48 h	66.02 ^a	20.97 ^b	31.15 ^b	54.2 ^a	3.104	<.0001	<.0001	0.0033

¹KK, kikuyo (*Pennisetum clandestinum*); NL, kikuyo + nitrato; NP, kikuyo + nitrato + jabón; KU; kikuyo + urea. La inclusión de nitrato fue del 3% de la MS.

²T, Efecto del tratamiento

³Ti, Efecto del horario de incubación

⁴TxTi, Efecto de la interacción entre el tratamiento y el horario de incubación

⁵MSD, Materia seca degradada

⁶MSI, Materia seca incubada

^{a, b, c}Medias con diferente letra en la fila presentan diferencia estadística (P<0,05).

Producción de NH₃ y AGV

En la Tabla 4, se presenta el efecto de la adición de NO₃⁻ protegido y sin protección sobre la producción de AGV y nitrógeno amoniacal (N-NH₃) en un sistema de fermentación *in vitro*. La producción de AGV y N-NH₃ no fue afectada por la adición de NO₃⁻ o urea al ambiente de fermentación (p>0.05).

Tabla 4. Efecto de la adición de nitrato (NO₃⁻) protegido y sin protección sobre la producción de ácidos grasos volátiles (AGV) y nitrógeno amoniacal (N-NH₃) a las 24 horas de fermentación *in vitro*.

Variable	Tratamientos				SEM	P-value
	KK	KN	KNJ	KU		
Acético, mmol/lit	62.9	58.9	76.7	98.2	5.27	0.291
Propiónico, mmol/lit	16.9	14.5	12.3	20.3	1.44	0.44
Butírico, mmol/lit	8.54	7.7	7.1	8.5	0.26	0.201
N-NH ₃ , mg/L	14	10.5	10.5	11.66	0.75	0.693

¹KK, kikuyo (*Pennisetum clandestinum*); NL, kikuyo + nitrato; NP, kikuyo + nitrato + jabón; KU; kikuyo + urea. La inclusión de nitrato fue del 3% de la MS.; N-NH₃, Nitrogeno amoniacal.

^{a, b, c}Medias con diferente letra en la fila presentan diferencia estadística entre tratamientos (P<0,05).

Discusión

Producción de metano y degradación de la MS.

La disminución en la MSD presentada con el NP pudo haber sido consecuencia del jabón empleado para la protección. Existen evidencias de que el jabón de soya presenta una alta disociación en medios con pH cercanos a 6.5 (Pritam S. 1990). Esta característica del jabón de soya podría producir un incremento en el contenido de ácidos grasos poliinsaturados, lo cuales deprimen significativamente la digestibilidad de la pared celular (Jenkins and Palmquist 1982). De haberse presentado una alta disociación del jabón, se podría favorecer la velocidad de liberación del NO₃⁻ lo que también pudo haber favorecido la disminución en la MSD. Por lo tanto, con el NP se pudo presentar un efecto aditivo de los ácidos grasos insaturados y el NO₂⁻ en la reducción de la MSD. En ambos tratamientos NL y NP se pudo reducir la MSD por el efecto tóxico del NO₂⁻, el cual genera la inhibición del crecimiento y la abundancia de metanógenos y otras bacterias importantes como *F. succinogenes* y *R. flavefaciens* en la degradación de la materia seca en rumen (Natel et al., 2019; Zhao et al., 2018).

La mitigación en la producción de CH₄ por la inclusión de NO₃⁻ *in vitro* ha sido reportada previamente (Zhou *et al.*, 2012a; Perdok, 2014; Lee *et al.*, 2017). En el presente estudio, la utilización de una dosis del 3% de NO₃⁻, con el tratamiento de NL, redujo en un 68% la producción de CH₄ por cada gramo de MSD durante las 48 h de incubación. La reducción observada con NL en la producción de CH₄ pudo deberse a la alta capacidad reductora del NO₃⁻ en medio anaerobio (Leng, 2014). El NO₃⁻ se comporta como un sumidero alternativo de hidrógeno en rumen, a través de la reducción hasta NH₄⁺, proceso energéticamente mas favorable ($\Delta G = -501$ kJ) que la reducción de CO₂ a CH₄ ($\Delta G = -67$ KJ) (Ungerfeld and Kohn 2006). Además, el NO₂⁻, proveniente de la reducción del NO₃⁻ pudo haber ejercido un tóxico sobre la población de metanógenos y algunas

bacterias bacterias celulolíticas (Zhou, Meng y Yu, 2011; Zhao *et al.*, 2018b) como se mencionó anteriormente, lo que puede ser consecuente con la tendencia observada en la reducción de la MSD.

Con el NP se alcanzó un porcentaje de reducción del 74% en la producción de CH₄ en ml / gramo de MSD, afectando la degradación de la MS en un 21%, a las 24 horas en comparación con el control. Natel *et al.* (2019), evaluando una dosis similar de NP (3 % de la MS incubada), en una dieta 80:20 (forraje: concentrado) encontraron una reducción del 10% en la producción de CH₄ en ml / gramo de MOD (materia orgánica degradada) durante el mismo tiempo de incubación, sin afectar la degradación de la MO incubada. Con una inclusión del 15% de NP en 24 horas *in vitro* Lee et al. (2017) obtuvieron una reducción del 45% en el volumen de CH₄ producido con respecto al control.

El propósito de usar NP es disminuir la velocidad de disolución del NO₃⁻, para favorecer el crecimiento de bacterias NO₃⁻ y NO₂ reductoras que aceleren la formación de NH₄⁺ (Lee et al., 2015). El incremento en este tipo de bacterias favorece la velocidad de reducción de NO₃⁻ a NO₂⁻ y a su vez de NO₂⁻ a NH₄⁺ lo que implicaría una disminución en el riesgo de toxicidad que representa el NO₂⁻ tanto para los microorganismos ruminales como para el animal hospedero. Teóricamente, la reducción de los 0.015 g de NO₃⁻ debería disminuir 5.32 mL de CH₄ (Lin et al., 2013; Patra y Yu 2015), pero con NP se obtuvo una reducción total de 9.4 mL de CH₄, lo que corresponde a un 76% más de lo esperado. Este comportamiento posiblemente se presentó por un efecto factorial de los ácidos grasos poliinsaturados provenientes de la disociación del jabón y el NO₂⁻, proveniente de la reducción del NO₃⁻, sobre la disminución en la MSD lo que finalmente favoreció la reducción en la producción de CH₄ *in vitro*. La disociación del jabón elaborado con aceite de soja pudo haber favorecido la reducción en la producción de CH₄, ya que se han reportado estudios como el de Wang et al., (2016), donde encontraron una fuerte correlación entre el alto grado de instauración del aceite de soja y la reducción significativa en el número de metanógenos y densidad de protozoos en rumen. Esta correlación favoreció la reducción en la producción de CH₄ en un 60% con respecto al control en 36 horas *in vitro*. Machmüller (2006) en un análisis realizado a

ocho experimentos *in vitro* y cuatro *in vivo* acerca del potencial de los ácidos grasos de cadena media sobre la producción de CH₄, reportó una disminución significativa en el número de metanógenos y una reducción hasta del 40% en la liberación de CH₄ con el uso de aceite de soja.

Producción de AGV y NH₃

En el presente trabajo no se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en el perfil de fermentación por el uso de NO₃⁻, sin embargo, si se presentó una diferencia numérica del 28% en la producción de propiónico con el NL y del 40% con NP, en comparación con el tratamiento con urea. La adición de NO₃⁻ en rumen puede disminuir la producción de CH₄ y a la vez de propionato, ya que, reduce la disponibilidad de hidrógenos, debido a que muchas bacterias reductoras de NO₃⁻ pueden usarlos como sustrato (Zumft 1993), por lo tanto, esto puede generar competencia no solo con la metanogénesis, sino también con la propiogénesis (van Zijderveld et al., 2010). Natel *et al.* (2019) encontraron que la inclusión de NO₃⁻ protegido a razón del 3% de la MS incubada en una dieta 80:20 (concentrado: forraje) resultó en una reducción lineal en la producción de ácido propiónico y un aumento en la de acético. Contrario a esto (Lund *et al.*, 2014) reportan que la producción de AGV no se vio afectada estadísticamente por la adición de NO₃⁻ en ninguna de las concentraciones empleadas (6.66, 13.3 y 20 g/kg MS).

La concentración de NH₃ a las 24h de incubación no presentaron diferencias entre tratamientos. Contrario a lo encontrado en otros estudios (Wang *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2017), donde las dietas con urea presentaron un incremento en la concentración de NH₃ en comparación con los tratamientos que contenían NL y NP. La razón para que el tratamiento KU no presentara un aumento significativo en la concentración de NH₃, transcurridas 24 horas, puede ser debido a que la urea es una fuente de nitrógeno altamente disponible, esta se hidroliza rápidamente a NH₃ y es utilizada por los microorganismos ruminales para su crecimiento y desarrollo durante las tres primeras horas de incubación (Leng, 2008), disminuyendo así los niveles de NH₃ e incrementando

posiblemente la población bacteriana y la actividad fermentativa, comportamiento que coincide con el aumento en la MSD observado con el tratamiento KU (Tabla 3).

El hecho de que no se presentaran diferencias en la concentración de NH_3 entre los tratamientos NL y NP con respecto al control pudo darse por el tipo de metabolismo presentado por el NO_3^- . En el rumen el NO_3^- se metaboliza principalmente por reducción asimilatoria hasta NH_3 pero dependiendo del equilibrio de las actividades enzimáticas, se puede formar N_2O a través de la desnitrificación. Debido a que el inóculo ruminal utilizado en el actual estudio se obtuvo de animales no adaptados al NO_3^- , es posible que el NO_2^- se haya acumulado en el sistema y en lugar de reducirse a NH_3 se haya desviado a la vía de denitrificación, convirtiendo NO_2^- a N_2O , principal fuente de N_2O en condiciones anaeróbicas (Kaspar y Tiedje, 1981). Con una inclusión de 2 y 2.5% de NO_3^- en el total de la MS incubada por 24 h, Welty *et al* (2019), observaron que el NO_3^- tuvo un efecto mínimo sobre la concentración de NH_3 , el cual solo registró un incremento significativo una hora después de iniciar el ensayo *in vitro* y el resto del tiempo los valores cayeron y permanecieron bajos durante la incubación.

En conclusión, los resultados indican que en una dieta con kikuyo, el uso de NP en una inclusión de NO_3^- del 3% de la MS, puede llegar a reducir en un 53% la producción de CH_4 48 horas *in vitro*. Sin embargo, el uso del jabón de soya como método de protección de NO_3^- debe ser considerado con más detalle, debido a que su naturaleza lipídica puede presentar un alto potencial tóxico sobre los microorganismos ruminales, disminuyendo la MSD.

Bibliografía

AOAC. 1995. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 16. ed., 5. Washington D.C.: AOAC International. <http://www.worldcat.org/title/official-methods-of-analysis-of-aoac-international/oclc/473640402> (August 21, 2017).

Bruning-Fann, C. S., & Kaneene, J. B. (1993). The effects of nitrate, nitrite and N-nitroso

- compounds on human health: a review. *Veterinary and Human Toxicology*, 35(6), 521–538. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8303822>
- FAO, O. de las N. U. para la A. y la A. (2018). Soluciones ganaderas para el cambio climático. *Fao*, 8. Retrieved from <https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=2ahUKEwihjKH8ezoAhVVA2MBHbArAh4QFjAAegQIARAB&url=http%3A%2F%2Fwww.fao.org%2F3%2Fi8098ES%2Fi8098es.pdf&usg=AOvVaw2HMQHMWDwQTXS7ZZ9Y2tVJ>
- Hino, T. and Asanuma. N. (2003). Suppression of ruminal methanogenesis by decreasing the substrates available to methanogenic bacteria. *Nut, Abst. Rev, (Series B)*, 1–8.
- Jenkins, T. C., & Palmquist, D. L. (1982). Effect of added fat and calcium on in vitro formation of insoluble fatty acid soaps and cell wall digestibility. *Journal of Animal Science*, 55(4), 957–963.
- Kaspar, H. F., & Tiedje, J. M. (1981). Dissimilatory reduction of nitrate and nitrite in the bovine rumen: Nitrous oxide production and effect of acetylene. *Applied and Environmental Microbiology*, 41(3), 705–709. <https://doi.org/10.1128/aem.41.3.705-709.1981>
- Lee, C., Araujo, R. C., Koenig, K. M., & Beauchemin, K. A. (2015). Effects of encapsulated nitrate on enteric methane production and nitrogen and energy utilization in beef heifers. *Journal of Animal Science*, 93(5), 2391–2404. <https://doi.org/10.2527/jas2014-8845>
- Lee, Chanhee, Araujo, R. C., Koenig, K. M., & Beauchemin, K. A. (2017). In situ and in vitro evaluations of a slow release form of nitrate for ruminants: Nitrate release rate, rumen nitrate metabolism and the production of methane, hydrogen, and nitrous oxide. *Animal Feed Science and Technology*, 231(July), 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.07.005>
- Lee, Chanhee, & Beauchemin, K. A. (2014). A review of feeding supplementary nitrate to ruminant animals: nitrate toxicity, methane emissions, and production performance. *Canadian Journal of Animal Science*, 94(4), 557–570. <https://doi.org/10.4141/cjas->

2014-069

- Leng; (2008). The Potential of Feeding Nitrate to Reduce Enteric Methane Production. *Department of Climate Change Report*, 1–90. Retrieved from [http://www.penambulbooks.com/Downloads/Leng-Final](http://www.penambulbooks.com/Downloads/Leng-Final%202008.pdf) Modified 17-9-2008.pdf%5Cnhttps://scholar.google.com/scholar?q=The+potential+of+feeding+nitrate+to+reduce+enteric+methane+production+in+ruminants.&btnG=&hl=en&as_sdt=0%2C5#0
- Leng, R. a. (2014). Interactions between microbial consortia in bio films : a paradigm shift in rumen microbial ecology and enteric methane mitigation. *Animal Production Science*, A-Y. <https://doi.org/10.1071/AN13381>
- Lin, M., Schaefer, D. M., Zhao, G. Q., & Meng, Q. X. (2013). Effects of nitrate adaptation by rumen inocula donors and substrate fiber proportion on in vitro nitrate disappearance, methanogenesis, and rumen fermentation acid. *Animal*, 7, 1099–1105. <https://doi.org/10.1017/S1751731113000116>
- Lund, P., Dahl, R., Yang, H. J., Hellwing, A. L. F., Cao, B. B., & Weisbjerg, M. R. (2014). The acute effect of addition of nitrate on in vitro and in vivo methane emission in dairy cows. *Animal Production Science*, 54(9), 1432–1435. <https://doi.org/10.1071/AN14339>
- Machmüller, A. (2006). Medium-chain fatty acids and their potential to reduce methanogenesis in domestic ruminants. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 112(2), 107–114. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.agee.2005.08.010>
- Mamvura, C. I., Cho, S., Mbiriri, D. T., Lee, H. G., & Choi, N. J. (2014). Effect of encapsulating nitrate in sesame gum on in vitro rumen fermentation parameters. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 27(11), 1577–1583. <https://doi.org/10.5713/ajas.2014.14280>
- McDougall, E. I. (1948). Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *The Biochemical Journal*, 43(1), 99–109. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16748377>
- Natel, A. S., Abdalla, A. L., de Araujo, R. C., McManus, C., Paim, T. do P., de Abdalla

- Filho, A. L., ... Nazato, C. (2019). Encapsulated nitrate replacing soybean meal changes in vitro ruminal fermentation and methane production in diets differing in concentrate to forage ratio. *Animal Science Journal*, 90(10), 1350–1361. <https://doi.org/10.1111/asj.13251>
- Patra, A. K., & Yu, Z. (2015). Effects of adaptation of in vitro rumen culture to garlic oil, nitrate, and saponin and their combinations on methanogenesis, fermentation, and abundances and diversity of microbial populations. *Frontiers in Microbiology*, 6(DEC), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01434>
- Perdok, H. B. (2014). *Dietary nitrate supplementation reduces methane emission in beef cattle fed*. (April), 2317–2323. <https://doi.org/10.2527/jas2011-4209>
- Pritam S., S. and D. L. P. (1990). Dissociation of Calcium Soaps of Long-Chain Fatty Acids in Rumen Fluid. *Journal of Dairy Science*, 73(7), 1784–1787. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(90\)78858-3](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(90)78858-3)
- Posada, s.L. & Ramírez-Agudelo, John & Rosero Noguera, Ricardo. (2014). Producción de metano y digestibilidad de mezclas kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) - papa (*Solanum tuberosum*). *Agronomía Mesoamericana*. 25. 141-150. [10.15517/am.v25i1.14214](https://doi.org/10.15517/am.v25i1.14214).
- SAS® University Edition. (2019). SAS. Retrieved from http://www.sas.com/en_us/software/university-edition.html
- Ungerfeld, E., & Kohn, R. (2006). The Role of Thermodynamics in the Control of Ruminal Fermentation. In *Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism and Impact of Nutrition on Gene Expression, Immunology and Stress* (pp. 55–85).
- van Zijderveld, S. M., Gerrits, W. J. J., Apajalahti, J. A., Newbold, J. R., Dijkstra, J., Leng, R. A., & Perdok, H. B. (2010). Nitrate and sulfate: Effective alternative hydrogen sinks for mitigation of ruminal methane production in sheep. *Journal of Dairy Science*, 93(12), 5856–5866. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3281>
- Wang, M., Wang, R., Yang, S., Deng, J. P., Tang, S. X., & Tan, Z. L. (2016). Effects of three methane mitigation agents on parameters of kinetics of total and hydrogen gas production, ruminal fermentation and hydrogen balance using in vitro technique.

- Animal Science Journal*, 87(2), 224–232. <https://doi.org/10.1111/asj.12423>
- Welty, C. M., Wenner, B. A., Wagner, B. K., Roman-Garcia, Y., Plank, J. E., Meller, R. A., ... Firkins, J. L. (2019). Rumen microbial responses to supplemental nitrate. II. Potential interactions with live yeast culture on the prokaryotic community and methanogenesis in continuous culture. *Journal of Dairy Science*, 102(3), 2217–2231. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15826>
- Zhao, L., Meng, Q., Li, Y., Wu, H., Huo, Y., Zhang, X., & Zhou, Z. (2018a). Nitrate decreases ruminal methane production with slight changes to ruminal methanogen composition of nitrate-adapted steers. *BMC Microbiology*, 18(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1164-1>
- Zhao, L., Meng, Q., Li, Y., Wu, H., Huo, Y., Zhang, X., & Zhou, Z. (2018b). Nitrate decreases ruminal methane production with slight changes to ruminal methanogen composition of nitrate-adapted steers. *BMC Microbiology*, 18(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1164-1>
- Zhou, Z., Meng, Q., & Yu, Z. (2011). Effects of Methanogenic Inhibitors on Methane Production and Abundances of Methanogens and Cellulolytic Bacteria in In Vitro Ruminal Cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(8), 2634–2639. <https://doi.org/10.1128/aem.02779-10>
- Zhou, Z., Yu, Z., & Meng, Q. (2012). Effects of nitrate on methane production, fermentation, and microbial populations in in vitro ruminal cultures. *Bioresource Technology*, 103(1), 173–179. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.013>
- Zumft, W. G. (1993, October). The biological role of nitric oxide in bacteria. *Archives of Microbiology*, Vol. 160, pp. 253–264. <https://doi.org/10.1007/BF00292074>

CAPÍTULO 2. NITRATO ENCAPSULADO Y SU EFECTO EN LA PRODUCCIÓN DE METANO Y POBLACIÓN DE METANÓGENOS *IN VITRO*.

Abstract

Climate change due to anthropogenic greenhouse gas emissions, such as methane (CH₄) produced largely by enteric fermentation of pasture animals, is a current threat that requires better feeding practices and dietary changes such as the use of CH₄ inhibitors. The use of protected nitrates in the ruminant diet functions as an H₂ sink, reducing enteric CH₄ emissions and reducing the risk of toxicity, both for bacteria at the ruminal level and for the host animal. This study evaluated the protection of nitrates and its effect on the reduction of CH₄, dry matter (DM) degradation, fermentation profile, concentration of nitrates, nitrites and populations of methanogens at the *in vitro* level. Crystalline microcellulose (CMC) pellets were manufactured for the protection of nitrate (NP) and 4 treatments were evaluated at *in vitro* level: control, UR, NL and NP, for 12, 24 and 48h. In the first 12 hours of incubation, both NL and NP reduced the percentage of CH₄ production by 44% and 26% ($P < 0.0001$), with respect to the control; while at 24 and 48 h, only the LN reduced this percentage by 43% and 38% ($P < 0.0001$), compared to the control, NP and UR treatments that presented similar values to each other. The amount of methanogens was not affected by the inclusion of nitrates in the substrate. In conclusion, the results indicate that NP, evaluated in the present study, shows a mitigation potential of CH₄ only during the first 12 h of incubation, without affecting the DM degradation. NL did reduce enteric CH₄ production, but temporarily affected DM degradation. No relationship was found between the reduction in CH₄ production caused by NL and the copy number of the *mcrA* gene, implying that CH₄ inhibition was not affected by changes in the total methanogen population.

Resumen

El cambio climático debido a las emisiones antropogénicas de gases de efecto invernadero, como el metano (CH_4) producido en gran parte por la fermentación entérica de animales en pastoreo y en confinamiento, es una amenaza actual que requiere de mejores prácticas en la alimentación y cambios en la dieta como el uso de inhibidores de CH_4 . El uso de nitratos (NO_3^-) protegidos en la dieta de rumiantes funciona como un sumidero de hidrógenos (H_2), reduciendo las emisiones de CH_4 entérico y disminuyendo el riesgo de toxicidad, tanto para las bacterias a nivel ruminal, como para el animal hospedero. Este estudio evaluó la protección de NO_3^- y su efecto en la disminución de CH_4 , materia seca degradada (MSD), perfil de fermentación, concentración de NO_3^- , nitritos (NO_2^-) y poblaciones de metanógenos a nivel *in vitro*. Se fabricaron pellets de microcelulosa cristalina (CMC) para la protección del nitrato y se evaluaron a nivel *in vitro* 4 tratamientos: control, UR, NL y NP, durante 12, 24 y 48h. se evaluaron 4 tratamientos que consistieron en un sustrato de heno pangola (*Digitaria decumbens* Stent) y concentrado en una proporción de 60% heno: 40% concentrado (control) como dieta base. Los 3 tratamientos restantes se diferenciaban en el tipo de suplemento nitrogenado empleado, de la siguiente manera: control + urea (UR), control + nitrato de potasio libre (NL), control + nitrato de potasio protegido (NP). Cada tratamiento con nitrato, libre o encapsulado presentaba una inclusión de NO_3^- del 3% de la MS incubada. En las primeras 12 horas de incubación, tanto el NL como el NP redujeron el porcentaje de producción de CH_4 en un 44% y 26% ($P < 0.0001$), con respecto al control; mientras que a las 24 y 48 h solo el NL redujo este porcentaje en un 43% y 38% ($P < 0.0001$), en comparación con los tratamientos control, NP y UR que presentaron valores similares entre si. La cantidad de metanógenos no fue afectada por la inclusión de nitratos en el sustrato. En conclusión, los resultados indican que el NP, evaluado en el presente estudio, muestra un potencial de mitigación de CH_4 solo durante las primeras 12 h de incubación, sin afectar la MSD. El NL redujo efectivamente la producción de CH_4 entérico, pero afectó transitoriamente la MSD. No se encontró una relación entre la reducción en

la producción de CH₄ originada por el NL y el número de copias del gen mcrA, lo que implica que la inhibición del CH₄ no se vió afectada por los cambios en la población total de metanógenos.

Introducción

El metano (CH₄) se conoce como un potente gas de efecto invernadero (GEI), presentando 25 veces más potencial de calentamiento global que el dióxido de carbono (CO₂). Además es considerado como un GEI de larga vida debido a que es químicamente más estable y persiste en la atmósfera por largos periodos de tiempo, de modo que sus emisiones ejercen influencia en el clima a largo plazo (IPCC, 2017). A nivel mundial, los rumiantes son responsables de aproximadamente 85 Tg (1 Tg = 10⁹ Kg = 1 millón de toneladas métricas) de los 550 Tg de CH₄ liberados anualmente (McGinn et al., 2006). Gran parte de las emisiones mundiales de CH₄ provienen de la fermentación entérica de animales en pastoreo (Sejian et al., 2011). Por lo tanto, la reducción de las emisiones de CH₄ se reconoce como una opción efectiva para la mitigación del cambio climático, lo que se ha convertido en una prioridad de investigación en la nutrición de rumiantes a nivel mundial. La mayor parte de la producción de CH₄ durante la fermentación ruminal es el resultado de la reducción de CO₂ con hidrogeno (H₂) por las arqueas metanogénicas que residen en el rumen; Este proceso permite la eliminación del exceso de H₂ para que el NADH se reconstituya en NADH⁺, fase esencial para dar continuidad a la fermentación anaeróbica del rumen y para el crecimiento microbiano. Los nitratos (NO₃⁻) son inhibidores eficaces del CH₄ debido a que la presencia de estos en rumen dirige el H₂ de la metanogénesis a la reducción del NO₃⁻ a amonio (NH₄⁺), disminuyendo así la producción de CH₄ (Allison y Reddy 1984). Por otra parte, el proceso de reducción del nitrato (NO₃⁻ + H₂ → NO₂⁻ + H₂O, ΔG= -130), (NO₂⁻ + 3H₂ + 2H⁺ → NH₄⁺ + 2 H₂O, ΔG= -37) es termodinámicamente más favorable que la formación de CH₄ (CO₂ + 4H → CH₄ + 2 H₂O, ΔG= -67.4) (Ungerfeld y Kohn 2006). Es importante también considerar que la reducción de nitrito (NO₂⁻) a NH₄⁺ es más lenta que la reducción de NO₃⁻ a NO₂⁻,

lo que lleva a una acumulación de NO_2^- en el ambiente ruminal; El exceso de NO_2^- en rumen podría ser otro mecanismo de acción para la disminución del CH_4 , ya que este compuesto tiene la capacidad de inhibir la funcionalidad de los metanógenos al afectar directamente el sistema portador de electrones que hace parte de su metabolismo (Ungerfeld, 2015). Sin embargo, el NO_2^- también puede ser tóxico para el animal hospedero debido a que puede atravesar las paredes ruminales y entrar al torrente sanguíneo para combinarse con la hemoglobina en los glóbulos rojos y formar metahemoglobina. El ion ferroso de la hemoglobina se convierte en la forma férrica y la capacidad de los glóbulos rojos para transportar oxígeno al tejido corporal se reduce. Por lo tanto, minimizar el potencial de intoxicación para el animal es la clave para suplementar con nitratos; una forma de minimizar este potencial de intoxicación es el uso de nitratos encapsulados. Los nitratos encapsulados en rumen se usan con el propósito de disminuir la velocidad de liberación del NO_3^- y a su vez la cantidad de NO_2^- , intermediario en el proceso de reducción del NO_3^- . Un desarrollo mas lento de este proceso favorece el crecimiento de bacterias reductoras de nitratos y nitritos (Lin et al., 2013), lo que incrementaría la producción enzimática de estas, haciendo posible obtener una completa reducción del NO_3^- hasta NH_4^+ , disminuyendo así la producción de CH_4 a nivel ruminal y el potencial tóxico del NO_2^- sobre los microorganismos ruminales y el hospedero.

El presente estudio se realizó con el propósito de cumplir con dos objetivos. El primero fue desarrollar dos métodos de protección de nitratos y seleccionar uno de ellos, según su tasa de liberación a través del tiempo, para su posterior uso dentro de una técnica *in vitro* de fermentación ruminal. El segundo objetivo fue estimar el efecto del nitrato protegido sobre la producción de CH_4 , la materia seca degradada (MSD), perfil de fermentación, y poblaciones de metanógenos a nivel *in vitro*.

Materiales y métodos

Para cumplir con los objetivos este estudio se llevaron a cabo dos experimentos; En el primer experimento se desarrolló un método de protección de nitratos que pasó a ser

evaluado en el segundo experimento donde se estimó el efecto del NO_3^- sobre la MSD, producción de CH_4 y poblaciones metanogénicas *in vitro*.

Experimento 1

Protección de nitratos

Para la protección se usó carboximetil celulosa (CMC) PH 102. (Avicel®) y polivinilpirrolidona (Pvp) K-30 (Sigma-Aldrich®), compuestos aglutinantes y estabilizantes comúnmente utilizados en granulaciones secas o húmedas de tipo farmacéutico. Esta etapa experimental fue desarrollada en el laboratorio de Diseño y Formulación de Medicamentos, Cosméticos y Afines (CFA) de la Universidad de Antioquia.

El proceso realizado fue el siguiente:

Se prepararon 2 aglutinantes que posteriormente fueron mezclados en diferentes proporciones para cada tipo de protección

Aglutinante # 1: Solución al 30% p/p de CMC; 30 g de CMC en 70 g de agua destilada.

Aglutinante # 2: Solución al 30% p/p de Pvp; 30 g de Pvp en 70 g de agua destilada.

Luego de tener los aglutinantes se procedió a preparar los gránulos para la protección de los nitratos.

Elaboración del granulo de P1

Se incorporaron 60 g de nitrato de calcio (CALCINIT, 15.5-0-0, YARA, Bogotá, Col.), con 140 g de CMC, 50 g del aglutinante # 1 y 100 g del aglutinante # 2; se mezcló en forma manual por 10 minutos. Una vez homogénea la mezcla se granuló en un tamiz # 16 a temperatura ambiente y el granulado se recibió en una bandeja de acero inoxidable, para ser posteriormente secado en estufa de ventilación forzada a 40 °C por 24 h.

Elaboración del granulo de P2

Se incorporaron 80 g de nitrato de calcio (CALCINIT, 15.5-0-0, YARA, Bogotá, Col.), con 120 g de CMC, 150 g del aglutinante # 1 y 100 g del aglutinante # 2; se mezcló en forma manual por 10 minutos. Una vez homogénea la mezcla se granuló en un tamiz # 16 a temperatura ambiente y el granulado se recibió en una bandeja de acero inoxidable, para ser posteriormente secado en estufa de ventilación forzada a 40 °C por 24 h.

Se lograron dos tipos de gránulos, los cuales fueron llamados Protección 1 (P1) y Protección 2 (P2), con 17% y 17.8 % de NO_3^- , respectivamente. La diferencia en la composición de los gránulos consistió principalmente en la adición de los aglutinantes con la intención de generar una dinámica diferente en la liberación del NO_3^- .

Solubilidad del nitrato protegido

Con el objetivo de determinar el grado de protección del nitrato, la solubilidad de los gránulos fue determinada en diferentes horarios. Para ello se incubaron 5.9 g de P1 y 5.6 g de P2, correspondiente a una concentración de incubación de 1.0 g de NO_3^- por litro de buffer. La prueba de disolución *in vitro* se realizó de acuerdo con la especificación de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP, 2000). El aparato de disolución USP 2 (paleta) se usó a una velocidad de 50 rpm en 900 ml de medio de disolución (McDougall 1948) pH 7.0, mantenido a $39 \pm 0,5$ °C usando un baño de agua equipado con un agitador y calentador de velocidad variable (Erweka, DT6, GmbH, Alemania). Se extrajeron muestras de 5 ml a través de un filtro para jeringa tipo PVDF a los 15, 60, 180, 300 y 420 minutos, respectivamente, y se reemplazaron con un volumen igual de medio fresco para mantener un volumen de disolución constante. Posteriormente el NO_3^- liberado en cada intervalo de tiempo se midió por espectrofotometría a una absorbancia de 220 nm (Synergy HT Multi'Mode Microplate Reader -BioTek®), según el protocolo reportado por (Rodríguez 2007). Dentro de la prueba de solubilidad no fue incluido el nitrato de calcio $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ sin protección debido a que es un compuesto que puede alcanzar el 100% de solubilidad durante los primeros 10 minutos de incubación (NRC, 2000).

Posteriormente se procedió con la construcción de una curva de calibración, la cual fue utilizada para predecir la concentración del nitrato dentro de las muestras evaluadas. Esta curva fue lograda con el siguiente conjunto de soluciones estándares de concentraciones conocidas de nitrato.

Preparación de estándares

A partir de una solución patrón de nitratos de 100 mg N-NO₃⁻/L, se prepararon soluciones de 0,03 - 0,10 - 2.0 y 5.0 mg N-NO₃⁻/L para la curva de calibración.

- Estándar de 5.0 mg N-NO₃⁻/L: Se tomaron 25 ml de una solución intermedia de 10 mg N-NO₃⁻/L y se llevaron a un volumen de 50 mL en un balón aforado con agua ultra pura (UP).
- Estándar de 2.0 mg N-NO₃⁻/L: Se tomaron 10 ml de una solución intermedia de 10 mg N-NO₃⁻ /L y se llevaron a un volumen de 50 mL en un balón aforado con agua UP.
- Estándar de 0.10 mg N-NO₃⁻/L: Se tomaron 2 ml de una solución intermedia de 10 mg N-NO₃⁻/L y se llevaron a un volumen de 50 mL en un balón aforado con agua UP.
- Estándar de 0.03 mg N-NO₃⁻/L: Se tomaron 2 ml de la solución patrón de 2 mg N-NO₃⁻/L y se llevaron a un volumen de 200 mL en un balón aforado con agua UP.
- Los estándares de control 0.20 y 1.00 mg N-NO₃⁻/L se prepararon en cada determinación, tomando alícuotas de 2 y 10 mL, respectivamente, del patrón intermedio de 10 mg N - NO₃⁻/L y se completaron a un volumen de 100 mL, en un balón aforado con agua UP.

Análisis

Preparación de la curva estándar

- Se midieron 25 mL de cada uno de los estándares y se transfirieron a un erlenmeyer de 125 mL, mezclando cada uno con 0.5 mL de solución de HCl 1 N.
- Se tomaron 0.1 ml de muestra y se ajustaron a un volumen de 5 ml con agua ultra pura para ajustar la concentración del NO_3^- dentro de la curva estándar preparada.

Medición espectrofotometría

La lectura de la absorbancia del nitrato se hizo a una longitud de onda de 220 y 275 nm para determinar la interferencia debida a la materia orgánica disuelta.

Procesamiento de datos

El espectrofotómetro arroja resultados en $\text{mg N-NO}_3^-/\text{L}$ de acuerdo con el factor de dilución digitado en el momento de la lectura, aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{mg/L N-NO}_3^- = m \times (\text{Absorbancia}_{220 \text{ nm}} - (2 \times \text{absorbancia}_{275\text{nm}}))$$

Donde,

m = inverso de la pendiente de la curva de calibración.

Absorbancia = Lectura realizada por el espectrofotómetro.

mg/L N-NO_3^- = Concentración de nitratos calculada y registrada por el espectrofotómetro UV.

Se construyó una curva de calibración graficando la absorbancia debida a la concentración de NO_3^- contra la concentración de N-NO_3^- de los estándares. Con la absorbancia corregida de cada muestra se obtuvo la concentración de la muestra directamente de la curva estándar.

Experimento 2

Con el propósito de evaluar el efecto del nitrato, libre y encapsulado, sobre la MSD y producción de CH₄, fue realizado un experimento *in vitro* en el laboratorio de nutrición animal, ubicado en la Sede de Investigación Universitaria (SIU) de la Universidad de Antioquia.

Composición nutricional de la dieta incubada

Las muestras de heno pangola (*Digitariadecumbens* Stent) y concentrado fueron parcialmente secadas en un horno de ventilación forzada a 60 °C por 24 h, molidas con un tamiz de 1 mm en un molino Thomas–Wiley (Arthur M. Thomas, Philadelphia, PA, USA) para su posterior análisis de MS, proteína bruta (PB), cenizas (MI) (AOAC, 2005; AOAC, 2007), fibra detergente neutra (FDN) (Van Soest et al., 1991) y EB (ISO, 1998).

Tabla 1. Composición nutricional de la dieta incubada

Variable*	Heno pangola (<i>Digitariadecumbens</i> Stent)	Concentrado
MS, %	88.0	88.7
PB, %	2.81	16
FDN, %	63.64	
MO, %	93.86	89.0
ELN, %	25.5	65.0
EE, %	1.94	0.67
Cenizas, %	6.6	10.5

*MS: materia seca, PB: proteína bruta, FDN: fibra en detergente neutro, MO: materia orgánica, ELN: extracto libre de nitrógeno, EE: extracto etéreo

Inóculo

En la técnica *in vitro* se usaron 3 inóculos que fueron colectados de 3 vacas Holstein adultas, canuladas y no lactantes, ubicadas en la hacienda “La Montaña”, propiedad de la Universidad de Antioquia. La dieta base era pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum* Hochst. ex Chiov), sal mineralizada y agua; la colecta del líquido ruminal (inóculo), a través de la fistula, fue realizada en las horas de la mañana (6 am) y transportado hasta el laboratorio en recipientes térmicos previamente climatizados con agua a 39 °C. En el

laboratorio cada inóculo fue continuamente gaseado con dióxido de carbono (CO_2) y filtrado a través de 4 capas de algodón y conservado en un baño maría a 39°C hasta el proceso de inoculación.

Fermentación *in vitro*

Para la incubación *in vitro* fueron evaluados 4 tratamientos. El primer tratamiento, correspondiente al control, estuvo conformado por una mezcla de heno pangola (*Digitaria decumbens* Stent) y concentrado en una proporción de 60% heno: 40% concentrado (Tabla 1). Los 3 tratamientos restantes se diferenciaban en el tipo de suplemento nitrogenado empleado, de la siguiente manera: control + urea (UR), control + nitrato de potasio libre (NL), control + nitrato de potasio protegido (NP). Cada tratamiento con nitrato, libre o encapsulado presentaba una inclusión de NO_3^- del 3% de la MS incubada. En el tratamiento de NP se incluyó la protección P1 elaborada anteriormente, como se describe en la parte inicial de la metodología. El tratamiento con urea (UR) se incluyó para evaluar la adición de una fuente de nitrógeno no proteico diferente al NO_3^- . La cantidad de urea adicionada en el tratamiento UR fue proporcional a la cantidad de nitrógeno aportada por el NO_3^- . La fuente de NO_3^- empleada fue *nitrato de calcio* (CALCINIT, 15.5-0-0, YARA, Bogotá, Col.).

Para llevar a acabo la técnica *in vitro*, se preparó una solución buffer según (McDougall, 1948). Brevemente, se mezclaron 9.0 g de bicarbonato de sodio (NaHCO_3), 4.65 g de fosfato disódico (Na_2HPO_4), 0.57 g de cloruro de potasio (KCl), 0.47 g de cloruro de sodio (NaCl), 0.12 g de sulfato de sodio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) y 0.05 g de cloruro de calcio (CaCl_2) completando con agua destilada hasta un volumen de 1 Lt de solución.

Para el proceso de incubación, el fluido ruminal fue mezclado con la solución buffer (McDougall, 1948) a razón de 1:9 en frascos individuales de 100 ml que tenían previamente 0.5 g de sustrato y aditivo correspondiente a cada tratamiento. En todos los frascos se utilizó CO_2 para mantener las condiciones anaeróbicas. Después de cada inoculación, las botellas fueron inmediatamente cerradas con tapones de caucho y

almacenadas en cajas de polietileno para ser llevadas a una estufa de ventilación forzada a 39 °C durante el periodo de incubación de 12, 24 y 48 h respectivamente.

En total se incubaron 90 frascos: 72 frascos con sustrato e inóculo (4 tratamientos * 3 repeticiones/ tratamiento * 3 horarios de lectura * 2 replicas/ horario) y 18 frascos correspondientes a los blancos (3 horarios de lectura* 3 inóculos * 2 blancos por horario). Los blancos son frascos con solución buffer e inóculo sin sustrato ni aditivo, cuya función es corregir la producción de gases y MSD adicionada en el inóculo.

Perfil de fermentación

La producción total de gases fue medida en los horarios 12, 24 y 48 h de incubación a través de la medición de la presión generada en cada frasco con el uso de un transductor digital (Ashcroft 2089QG- Precision Digital Test Gauges, USA) medida en libras por pulgadas cuadradas (PSI), este dato fue transformado a volumen (ml) con la aplicación de la ecuación $Y = -0.1375 + 5.1385X + 0.0777X^2$ (Posada et al., 2006). Posterior a esta medición se procedió a tomar una muestra de gas para determinar la concentración de gas CH₄, para esto, una válvula de 3 salidas fue empleada. La primera salida fue conectada a una aguja (0.6 mm), la segunda conectada al transductor de presión y la tercera a una jeringa plástica que sirvió para la extracción de la muestra de gas. La aguja acoplada a la válvula fue insertada a través de la tapa de caucho para la medición de la presión y posteriormente, los gases acumulados en la parte superior del frasco se retiraron con el uso de la jeringa hasta el punto en que la presión registrada en el transductor alcanzó a ser cero. El gas colectado en la jeringa fue almacenado en bolsas de poliolefina coextruida tipo Clear Flex (Baxter, USA). Estas bolsas generalmente utilizadas para el empaque de suero fisiológico, cuentan con un conector de polietileno de dos tubos equipados con unas membranas especializadas para permitir el ingreso del gas a través de una aguja hacia el interior de la bolsa para ser almacenado y evitar la salida de este al exterior, según el protocolo descrito por Posada et al. (2014). Luego de finalizar la toma de muestras, se procedió con la medición de las concentraciones de CH₄ por cromatografía gaseosa. Una submuestra de 100 µl de gas fue tomada de cada bolsa

con la ayuda de una jeringa para ser inyectada en un cromatógrafo de gases Thermo Trace GC Ultra (Thermo Scientific, USA) dispuesto con un detector de ionización de llama (FID). Se aplicaron las condiciones cromatográficas adaptadas de Apráez et al. (2012). Columna apolar de 30 m, 0.25 mm y 0.25 μm . El puerto de inyección del gas contaba con una temperatura de 200 °C, modo de inyección Split 50:1, temperatura del detector 250 °C y una temperatura inicial del horno de 30 °C durante 5 min, con una rampa de 30 °C/min hasta completar 200 °C; finalmente se utilizó helio como gas de arrastre a razón de 1 ml/min.

Después del muestreo de gas en cada horario de medición se colectaron 2 mL del líquido de 48 de los 90 frascos incubados, que correspondían a dos de las tres réplicas de cada tratamiento. Las muestras se almacenaron en tubos a -20 °C que posteriormente fueron usados para la cuantificación de las arqueas metanogénicas por qPCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real).

Otros 2 ml de líquido de cada frasco fueron colectados y almacenados a -80 °C para determinar las concentraciones de NO_3^- y NO_2^- .

Para determinar la MSD por gravimetría, el contenido de cada frasco fue filtrado a través de crisoles de vidrio (porosidad 1, 100 - 160 μm) con ayuda de una bomba de vacío. El conjunto crisol-residuo fue secado en estufa de ventilación forzada a 60 °C por 48 horas y posteriormente pesado. Luego de descontar el peso del crisol se obtuvo el valor de la MS degradada como la diferencia entre la MS del residuo y la MS del blanco, todo esto dividido entre el valor de la MS inicialmente incubada (Posada et al., 2014).

La fracción líquida de cada frasco de incubación se preservó con la adición de ácido sulfúrico (98% v/v) gota a gota hasta lograr un pH promedio de 2; cada muestra fue centrifugada a 4000 rpm por 10 minutos y finalmente se tomó una submuestra de 1.5 mL de sobrenadante para la medición de los ácidos grasos volátiles (AGV), (acético, propiónico y butírico), por cromatografía gaseosa. Las muestras fueron inyectadas en un cromatógrafo de gases Thermo Trace GC Ultra (Thermo Scientific, USA). Las condiciones cromatográficas fueron adaptadas de (Apráez et al., 2012). Se empleó una

columna capilar supelcowax-10 de 30 m, 0.25 mm y 0.25 μm . La programación de la temperatura fue inicialmente de 68 $^{\circ}\text{C}$ por un minuto, luego aumentó 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta alcanzar 140 $^{\circ}\text{C}$ durante un minuto y finalmente tuvo un aumento de 40 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta alcanzar 200 $^{\circ}\text{C}$ un minuto. Se utilizó un detector FID a 280 $^{\circ}\text{C}$ y la temperatura del inyector Split fue de 250 $^{\circ}\text{C}$ con un volumen de inyección de 1 μl . El sobrenadante restante se utilizó para determinar las concentraciones de nitrógeno amoniacal (N- NH_3) por el método de Kjeldahl (AOAC, 1995).

Para determinar las concentraciones de NO_3^- y NO_2^- , fue empleado un kit de ensayo colorimétrico de nitrato / nitrito (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI).

Se prepararon los reactivos necesarios para el análisis, tampón de ensayo, enzima nitrato reductasa, cofactores de nitrato reductasa, el estándar nitrato, el estándar nitrito, Griess R1 y Griess R2 siguiendo las recomendaciones del fabricante (Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit). Posteriormente se procedió con la elaboración de la curva estándar de nitrato, utilizando las concentraciones recomendadas en el inserto del kit, anteriormente nombrado; finalmente se realizó la lectura de las muestras a una absorbancia de 540 nm usando un lector de placa de un equipo Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts)

Cálculos:

1. Trazado de las curvas estándar.

Se diagramaron las absorbancias a 540 nm en función de la concentración de nitrato o nitrito.

$[\text{Nitrato} + \text{Nitrito}] (\mu\text{M}) = (A_{540} - \text{intercepto en Y} / \text{pendiente}) * (200 \mu\text{L} / \text{volumen de la muestra} (\mu\text{L}) * \text{dilución})$

$[\text{Nitrito}] (\mu\text{M}) = (A_{540} - \text{intercepto en Y} / \text{pendiente}) * (200 \mu\text{L} / \text{volumen de la muestra} (\mu\text{L}) * \text{dilución})$

$[\text{Nitrato}] (\mu\text{M}) = (\text{Nitrato} + \text{Nitrito}) - (\text{Nitrito})$

$\mu\text{M} = \text{micromol}$

μL = microlitro

A_{540} = absorbancia a 540 nanómetros

Cuantificación del gen *mcrA* a través de una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).

Para determinar el efecto del nitrato sobre la población de metanógenos en el ensayo *in vitro*, se utilizaron las técnicas moleculares de extracción de ADN y cuantificación del gen *mcrA* a través de una reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).

Este gen fue seleccionado por la importancia que tiene dentro del proceso de producción de CH_4 ; ya que, la enzima metilcoenzima M reductasa (MCR) es la encargada de catalizar el último paso la síntesis biológica de CH_4 que desarrollan las *Archeas* en el rumen; además, se cree que este complejo enzimático es exclusivo de los metanógenos (Thauer 1998). La proteína MCR comprende 3 subunidades (α , β y γ). La subunidad α de MCR está codificada por el gen *mcrA*, que está altamente conservado entre todos los metanógenos, lo que sugiere que este gen es un objetivo adecuado para la detección cuantitativa en métodos basados en PCR (Li et al. 2012) y posiblemente un indicador cuantitativo para el rendimiento de CH_4 .

Extracción de ADN

Se extrajo ADN de líquido ruminal usando el kit comercial "GeneJET genomic ADN purification", (ThermoFisher Scientific), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El ADN fue cuantificado usando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Montchanin, DE) y se verificó su integridad mediante geles de agarosa. Brevemente, se centrifugaron 2 mL de líquido ruminal a 12.000 x g durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante. Posteriormente, se resuspendió el pellet en 500 μL de buffer de lisis para bacterias Gram-positivas. Las muestras fueron incubadas a 37°C durante toda la noche. Luego se centrifugaron las células durante 10 minutos a 3.000 x g y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió el pellet en 180 μL de solución de digestión y se adicionaron 20 μL de proteinasa K, se agitó hasta obtener una mezcla

uniforme. Luego fue incubada la muestra a 56°C durante 1 hora; a continuación, se adicionaron 20 µL de RNAsa A, se mezcló y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se adicionaron 200 µL de solución de lisis y se agitó durante 15 segundos hasta obtener una mezcla homogénea; se agregaron 400 µL de etanol 50% y se mezcló para ser transferido a la columna de purificación del kit. Se centrifugó la columna por 1 minuto a 6.000 x g. Se descartó el tubo colector y se colocó un nuevo tubo, se adicionaron 500 µL de buffer de lavado I y se centrifugó durante 1 minuto a 8.000 x g. Luego se descartó el líquido del tubo colector y se adicionaron 500 µL de buffer de lavado II, se procedió a centrifugar durante 3 minutos a una de velocidad 12.000 x g, se descartó el tubo colector y se transfirió la columna de purificación a un tubo de 1.5 mL; se agregaron 200 µL de buffer de elución a la columna, se dejó incubar por 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 8.000 x g durante 1 minuto. Finalmente, se descartó la columna de purificación y se almacenó el ADN a -20°C para su posterior análisis.

Análisis cuantitativo de poblaciones metanogénicas por qPCR

Un fragmento de 128 pares de bases (pb) del gen *metil coenzima M reductasa (mcrA)*, fue amplificado, usando los primers forward 5'-TTCGGTGGATCDCARAGRGC y reverse 5'-GBARGTCGWAWCCGTAGAATCC (Denman et al., 2007). Para este ensayo, se usó el kit QuantiTect SYBR Green PCR (Qiagen, Hilden, Alemania). La mezcla de la reacción fue de 50 µL, compuesta por 25 µL del Master Mix 2x, 1 µL de cada primer a una concentración de 10 µM, 2 µL del ADN y 21 µL de agua grado molecular. El ensayo se realizó bajo las siguientes condiciones de termociclado: un ciclo a 50 °C durante 2 min y 95 °C durante 2 min; seguido de 40 ciclos a 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 1 min. La detección de fluorescencia se realizó al final de cada paso de desnaturalización y extensión. La especificidad del amplicón se realizó a través del análisis de la curva de disociación de los productos finales de la PCR, aumentando la temperatura a una velocidad de 1 °C cada 30 segundos, desde 60 a 95 °C.

Para la curva de cuantificación, se amplificó un segmento de aproximadamente 460 pb del gen *mcrA* usando un primer forward 5'-TTCGGTGGATCDCARAGRGC y reverse 5'-GBARGTCGWAWCCGTAGAATCC (Luton et al. 2002). La reacción fue realizada en un mix de PCR de 30 μ L, que contenía 2.5 nM de $MgCl_2$, 1 U de la enzima Taq Platinum (Invitrogen, Carlsbad, California), 10 μ M de cada primer, ADN y se completó con agua grado molecular. Las condiciones de termociclado fueron: un ciclo 94 °C por 2 min, 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 60 °C por 15 s y 68 °C por 1 min. El producto de PCR fue analizado en un gel de agarosa al 2% con la tinción GelRed (Biotium, Fremont, California). Este producto fue purificado y clonado en un qPCR 2.1 TOPO vector (Invitrogen, Carlsbad, CA). El plásmido se cuantificó usando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Montchanin, DE). Se calculó el número de copias por μ L y se realizaron diluciones seriadas en escala logarítmica, desde 2.00E+08 hasta 2.00E+03, que fueron usadas como estándar para la curva de cuantificación de la qPCR. Los resultados fueron analizados con un iQ software versión 3.1 (BioRad Laboratories); Finalmente con los resultados de la curva de cuantificación se llegó a conocer el número de copias del gen *mcrA* / mL de líquido ruminal de cada muestra.

Análisis estadístico

Para medir el efecto del tratamiento sobre la producción de CH_4 , producción de gases, MSD, porcentaje de nitrógeno, concentración de NO_3^- y NO_2^- copias del gen *mcrA*, a nivel *in vitro* se empleó un análisis de medidas repetidas en el tiempo, con ayuda del procedimiento PROC MIXED de SAS (SAS® University Edition 2019), donde los efectos fijos correspondieron al tratamiento y el tiempo (horarios), y el efecto aleatorio correspondió a la fuente de inóculo ruminal (animal). Las medias de los tratamientos se compararon con la prueba de *Tukey - Kramer* ($P < 0.05$).

Resultados

Experimento 1

Solubilidad del nitrato protegido.

En la Figura 1, se observa como la liberación del NO_3^- a través del tiempo (15, 60, 180, 300 y 420 min) presentó un comportamiento lineal para los dos tipos de protección evaluados P1 y P2. El modelo de regresión para la liberación del NO_3^- con P1 fue $y=46.972 + 0.0415x$ cuya pendiente (0.0415) indica una tasa de liberación del NO_3^- mayor que la presentada con P2 $y=40.197 + 0.0292x$.

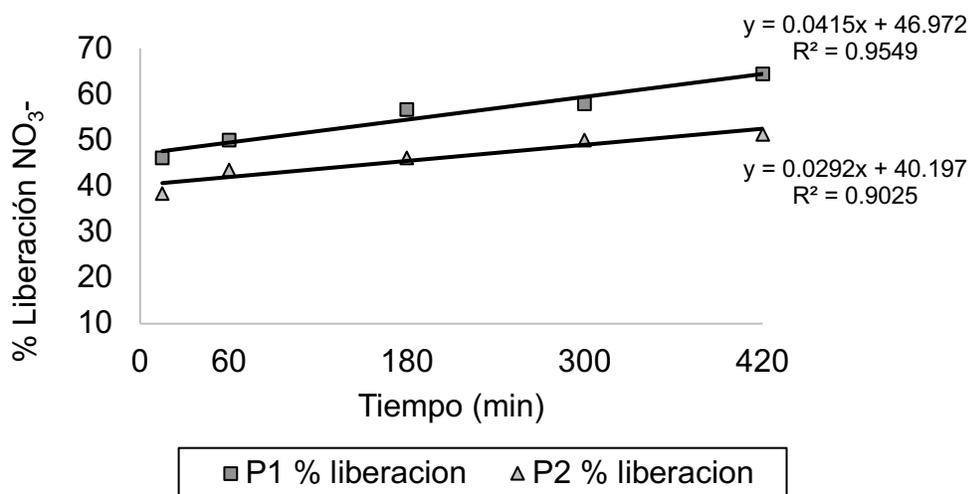


Figura 1. Relación lineal entre el porcentaje de liberación del NO_3^- a través del tiempo (15, 60, 180, 300 y 420 min) de los tipos de protección P1 y P2, medido a través de una prueba de disolución in vitro de acuerdo con la especificación de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP, 2000).

El porcentaje de liberación del NO_3^- se muestra en la Tabla 2, donde inicialmente, a los 15 minutos de incubación se alcanzó un porcentaje de liberación en promedio del 46 y 38% para P1 y P2, respectivamente, llegando a una liberación del NO_3^- incubado a los 420 minutos del 64.4% para P1 y 51.3% para P2.

Tabla 2. Porcentaje de liberación del nitrato (NO_3^-) a través del tiempo.

Parámetros	Tiempo de liberación (minutos)				
	15	60	180	300	420
% de recuperación de NO_3^- en *P1	46.22	50.00	56.67	58.00	64.44
% de recuperación de NO_3^- en **P2	38.46	43.59	46.15	50.00	51.28

*P1: Protección 1

**P2: Protección 2

NO_3^- : concentración del ion nitrato medido por espectrofotometría.

Solubilidad del nitrato de calcio (CALCINIT, 15.5-0-0, YARA, Bogotá, Col): 220 g/100 mL (25 °C)

En la Tabla 3, se presentan los parámetros de disolución de los nitratos protegidos; El tipo de protección P1 permitió una liberación de 691.2 mg de NO_3^- en 420 min de incubación, a razón de 27.92 mg/h, con una tasa de liberación del 2.6 % / h. Mientras que P2 permitió una liberación de 534.8 mg de NO_3^- en 420 min a razón de 19.10 mg/h, con una tasa de liberación del 1.83 % / h.

Tabla 3. Parámetros de disolución del nitrato (NO_3^-) protegido obtenidos durante 7 h de medición

Parámetros	Tipo de protección	
	¹ P1	² P2
Concentración inicial de NO_3^- incubado (mg/Lt)	1000	1000
Liberación del NO_3^- en 420 min (%)	64.44	51.28
Liberación del NO_3^- en 420 min (mg)	691.17	534.82
Liberación del NO_3^- (%/min)	0.04	0.03
Liberación del NO_3^- (mg/min)	0.47	0.32
Liberación del NO_3^- (%/h)	2.60	1.83
Liberación del NO_3^- (mg/h)	27.92	19.10

¹P1: Protección 1

²P2: Protección 2

NO_3^- : concentración del ion nitrato medido por espectrofotometría UV.

Experimento 2

Producción total de gases, CH_4 y degradación de la MS.

En la Tabla 4, se observan los resultados del efecto del NO_3^- libre y protegido sobre la MSD, producción total de gases y CH_4 en tres diferentes intervalos de incubación *in vitro* (0-12, 0-24 y 0-48 h). El NL, a las 24 h de incubación, redujo significativamente la MSD como proporción de la MSI con respecto a los demás tratamientos evaluados; en promedio la reducción ocasionada por el NL en esta variable fue del 4.7% a las 48 horas *in vitro*, en comparación con NP y UR. El volumen de gases producidos durante el proceso de fermentación fue equivalente entre tratamientos a las 12 horas de incubación. Transcurrido este horario, la producción de gases fue significativamente menor en el tratamiento NL comparado con el tratamiento NP, indicando que la protección del NO_3^- influyó sobre el proceso de fermentación.

La producción total de CH_4 (mL) y mL CH_4 /g MSD fueron afectadas por los tratamientos evaluados a través del tiempo ($P < 0.0001$). Tanto el NL como el NP redujeron el porcentaje de producción de CH_4 en un 44% y 26% ($P < 0.0001$) en las primeras 12 horas de incubación con respecto al tratamiento control; en los tiempos de incubación 24 y 48 horas el tratamiento NL logró reducir la producción de CH_4 en un 44% y 38%, en comparación con los tratamientos control, NP y UR ($P < 0.0001$) que presentaron valores similares entre sí. Transcurrido el primer intervalo de incubación, el tratamiento de NL presentó un 67% más de MSD / mL de CH_4 producido, seguido del NP con un incremento del 50% en dicha relación al ser comparados con los tratamientos control y UR ($P < 0.0001$). A las 24 horas de incubación el tratamiento de NL presentó un aumento del 56% ($P < 0.0001$) en esta variable en comparación con los restantes tratamientos evaluados. En el intervalo de 0 a 48 horas no se presentaron diferencias entre tratamientos.

Tabla 4. Efecto del nitrato libre (NL) y protegido (NP) sobre la producción total de gas, CH₄ y degradación de la MS en tres diferentes horarios (12, 24 y 48 h) de medición *in vitro*.

Variable	Horario de incubación	Tratamientos ¹				SEM	T ²	Efectos	
		Control	NL	NP	UR			Ti ³	Tx Ti ⁴
MSD ⁵ , g	0 a 12 h	0.24 ^b	0.24 ^b	0.26 ^a	0.25 ^a	0.003	<0.0001	<0.0001	0.0002
	0 a 24 h	0.32 ^c	0.32 ^c	0.36 ^a	0.34 ^b				
	0 a 48 h	0.36 ^c	0.37 ^{bc}	0.41 ^a	0.38 ^b				
MSD como proporción de la MSI ⁶ , %	0 a 12 h	46.97 ^{ab}	45.95 ^b	47.31 ^{ab}	49.07 ^a	0.602	<0.0001	<0.0001	0.249
	0 a 24 h	64.29 ^a	61.45 ^b	64.76 ^a	66.25 ^a				
	0 a 48 h	71.99 ^{ab}	70.81 ^b	74.33 ^a	74.43 ^a				
Gas total, mL	0 a 12 h	30.4	16.9	25.1	30.9	4.152	<0.0001	<0.0001	0.083
	0 a 24 h	62.8 ^{ab}	42.3 ^b	67.9 ^a	60.0 ^{ab}				
	0 a 48 h	86.8 ^a	65.7 ^b	100.3 ^a	83.1 ^{ab}				
CH ₄ total, mL	0 a 12 h	3.2	1.4	2.3	4.46	1.412	<0.0001	<0.0001	<.0001
	0 a 24 h	8.0 ^a	3.6 ^b	8.4 ^a	8.9 ^a				
	0 a 48 h	15.9 ^a	7.1 ^b	19.6 ^a	17.7 ^a				
CH ₄ como proporción del gas total, %	0 a 12 h	12.6 ^a	7.2 ^b	9.3 ^b	13.6 ^a	0.894	<0.0001	<0.0001	0.016
	0 a 24 h	12.9 ^a	7.1 ^b	12.4 ^a	13.1 ^a				
	0 a 48 h	17.6 ^a	10.8 ^b	19.5 ^a	18.9 ^a				
Producción de gas, mL/g de MSD	0 a 12 h	128.5 ^a	69.9 ^b	95.0 ^{ab}	122.6 ^a	11.369	<0.0001	<0.0001	0.462
	0 a 24 h	201.6 ^a	131.0 ^b	187.5 ^a	177.0 ^{ab}				
	0 a 48 h	246.0 ^a	176.4 ^b	241.6 ^a	218.5 ^{ab}				
CH ₄ mL/g de MSD	0 a 12 h	16.1 ^a	5.6 ^b	8.6 ^{ab}	17.3 ^a	1.116	<0.0001	<0.0001	0.0003
	0 a 24 h	24.5 ^a	11.0 ^b	23.3 ^a	26.3 ^a				
	0 a 48 h	43.8 ^a	21.1 ^b	47.1 ^a	46.6 ^a				
MSD g/mL de CH ₄	0 a 12 h	0.06 ^c	0.18 ^a	0.12 ^b	0.06 ^c	0.007	<0.0001	<0.0001	<0.0001
	0 a 24 h	0.04 ^b	0.09 ^a	0.04 ^b	0.04 ^b				
	0 a 48 h	0.02	0.05	0.02	0.02				

¹Control: Heno pangola (*Digitaria decumbens* Stent) + concentrado en una proporción de 60:40; UR, control + urea; NL, control + nitrato de potasio libre; NP, control + nitrato de potasio encapsulado. Cada tratamiento con nitrato, libre o encapsulado presenta una inclusión de NO₃⁻ del 3% de la MS incubada.

²T, Efecto del tratamiento

³Ti, Efecto del horario de incubación

⁴TxTi, Efecto de la interacción entre el tratamiento y el horario de incubación

⁵MSD, Materia seca degradada

⁶MSI, Materia seca incubada

a, b, c Medias con diferente letra en la fila presentan diferencia estadística (P <0,05).

Parámetros de fermentación ruminal, liberación de nitrato, nitrito y cantidad de metanógenos.

En la Tabla 5, se observa el efecto del NO_3^- libre y protegido sobre el perfil de fermentación en tres diferentes horarios (12, 24 y 48 h) de incubación *in vitro*. Los tratamientos evaluados no mostraron ningún efecto a través del tiempo sobre la producción de los AGV ($p > 0.05$), excepto por el tratamiento de NL en las primeras 12 h de incubación, donde se registra una disminución en la producción de ácido propiónico comparado con NP, UR y control ($p = 0.0027$).

Tabla 5. Efecto del nitrato libre y protegido sobre el perfil de fermentación en tres diferentes horarios (12, 24 y 48 h) de medición *in vitro*.

Variable	Horario incubación	Tratamientos ¹				SEM	T	Efectos	
		Control	NL	NP	UR			Ti	Tx Ti
Acético, mmol/l	0 a 12 h	43.13	43.54	62.74	56.8	15.207	0.946	<0.0001	0.212
	0 a 24 h	81.12	129.36	103.48	90.24				
	0 a 48 h	121.45	94.79	88.89	115				
Propiónico, mmol/l	0 a 12 h	25.49 ^a	14.14 ^b	25.55 ^a	34.78 ^a	3.631	0.003	<0.0001	0.383
	0 a 24 h	53.5	45.49	57.02	57.31				
	0 a 48 h	59.98	55.11	52.79	62.76				
Butírico, mmol/l	0 a 12 h	5.2	3.29	5.2	5.01	1.772	0.289	<0.0001	0.995
	0 a 24 h	9.76	7.29	8.31	10.23				
	0 a 48 h	12.8	10.19	11.08	12.18				
A:P ²	0 a 12 h	1.71	3.16	2.45	1.61	0.383	0.035	0.3167	0.285
	0 a 24 h	1.5	2.86	1.81	1.57				
	0 a 48 h	1.98	1.74	1.7	1.83				

¹Control: Heno pangola (*Digitaria decumbens* Stent) + concentrado en una proporción de 60:40; UR, control + urea; NL, control + nitrato de potasio libre; NP, control + nitrato de potasio encapsulado. Cada tratamiento con nitrato, libre o encapsulado presenta una inclusión de NO_3^- del 3% de la MS incubada.

²A:P; relación en la producción de acético y propiónico

^{a,b}Medias con diferente letra en la fila presentan diferencia estadística entre tratamientos ($P < 0,05$).

El efecto del NO_3^- en su forma libre y protegida sobre la producción de NH_3 , liberación de NO_3^- , NO_2^- y copias del gen *mcrA*/mL líquido ruminal en tres diferentes horarios (12, 24 y 48 h) de incubación *in vitro* se muestra en la Tabla 6.

A las 12 h de incubación, los tratamientos de NL, NP y UR registraron los mayores niveles de N- NH_3 en comparación con el control; transcurridas 24 h en los frascos que contenían el tratamiento con UR fue encontrado un mayor nivel de N- NH_3 con respecto al control; mientras que a las 48 h se incrementó la concentración de esta variable con los tratamientos de NP y UR ($p= 0.0307$).

Las concentraciones de NO_3^- y NO_2^- en el ambiente de fermentación solo fueron diferentes en las primeras 12 horas de incubación. En este horario, las concentraciones de estos compuestos fueron estadísticamente superiores en el tratamiento NL ($p < 0.001$).

En la Figura 2, se puede observar la relación entre el número de copias del gen *mcrA* / mL líquido ruminal (línea punteada) y el volumen (mL) de CH_4 (barras grises) durante los tres intervalos de incubación *in vitro* (0-12 h, 12-24 y 24-48h). Las gráficas indican que se produjeron volúmenes diferentes de CH_4 con cantidades similares de copias del gen *mcrA*. Así, la producción de CH_4 fue menor con NL y NP a las 12 horas, pero el número de copias del gen *mcrA* de estos dos tratamientos no difirió con los otros tratamientos. Con el tratamiento de NL se mantuvo la tendencia en la disminución del volumen de CH_4 durante las siguientes 24 y 48 horas de incubación, sin presentar una variación significativa en la cantidad de metanógenos de este tratamiento con respecto a los demás tratamientos evaluados en los mismos horarios.

Tabla 6. Efecto del nitrato libre y protegido sobre la producción nitrógeno nitrato, nitrito y copias del gen *mcrA* en tres diferentes horarios (12, 24 y 48 h) de medición *in vitro*.

Variable	Horario incubación	Tratamientos ¹				SEM	Efectos		
		Control	NL	NP	UR		T	Ti	Tx Ti
N-NH ₃ , mg/L	0 a 12 h	0.09 ^b	0.49 ^a	0.44 ^a	0.65 ^a	0.064	<0.0001	<0.0001	0.031
	0 a 24 h	0.23 ^b	0.54 ^{ab}	0.51 ^{ab}	0.72 ^a				
	0 a 48 h	0.56 ^b	0.58 ^b	1.00 ^a	1.07 ^a				
NO ₃ ⁻ (1*10 ⁻⁶ mol/L)	0 a 12 h	6.69 ^b	102.52 ^a	6.30 ^b	6.62 ^b	2.508	<0.0001	<0.0001	<0.0001
	0 a 24 h	7.65	6.92	7.45	7.63				
	0 a 48 h	7.93	7.37	7.47	7.11				
NO ₂ ⁻ (1*10 ⁻⁶ mol/L)	0 a 12 h	7.35 ^b	10.75 ^a	8.08 ^b	7.69 ^b	0.193	0.001	<0.0001	<0.0001
	0 a 24 h	8.94	9.02	8.97	9.12				
	0 a 48 h	9.27	9.12	9.6	9.59				
Copias gen <i>mcrA</i> /mL liq ruminal	0 a 12 h	5.94E+09	6.06E+09	6.53E+09	6.86E+09	2.20E+09	0.715	<0.0001	0.834
	0 a 24 h	1.01E+10	9.52E+09	7.81E+09	9.01E+09				
	0 a 48 h	1.50E+10	1.58E+10	1.61E+10	2.00E+10				

¹Control: *Heno pangola (Digitaria decumbens Stent)* + concentrado en una proporción de 60:40; UR, control + urea; NL, control + nitrato de potasio libre; NP, control + nitrato de potasio encapsulado. Cada tratamiento con nitrato, libre o encapsulado presenta una inclusión de NO₃⁻ del 3% de la MS incubada. N-NH₄, Nitrogeno amoniacal.

^{a,b}Medias con diferente letra en la fila presentan diferencia estadística ($P < 0,05$).

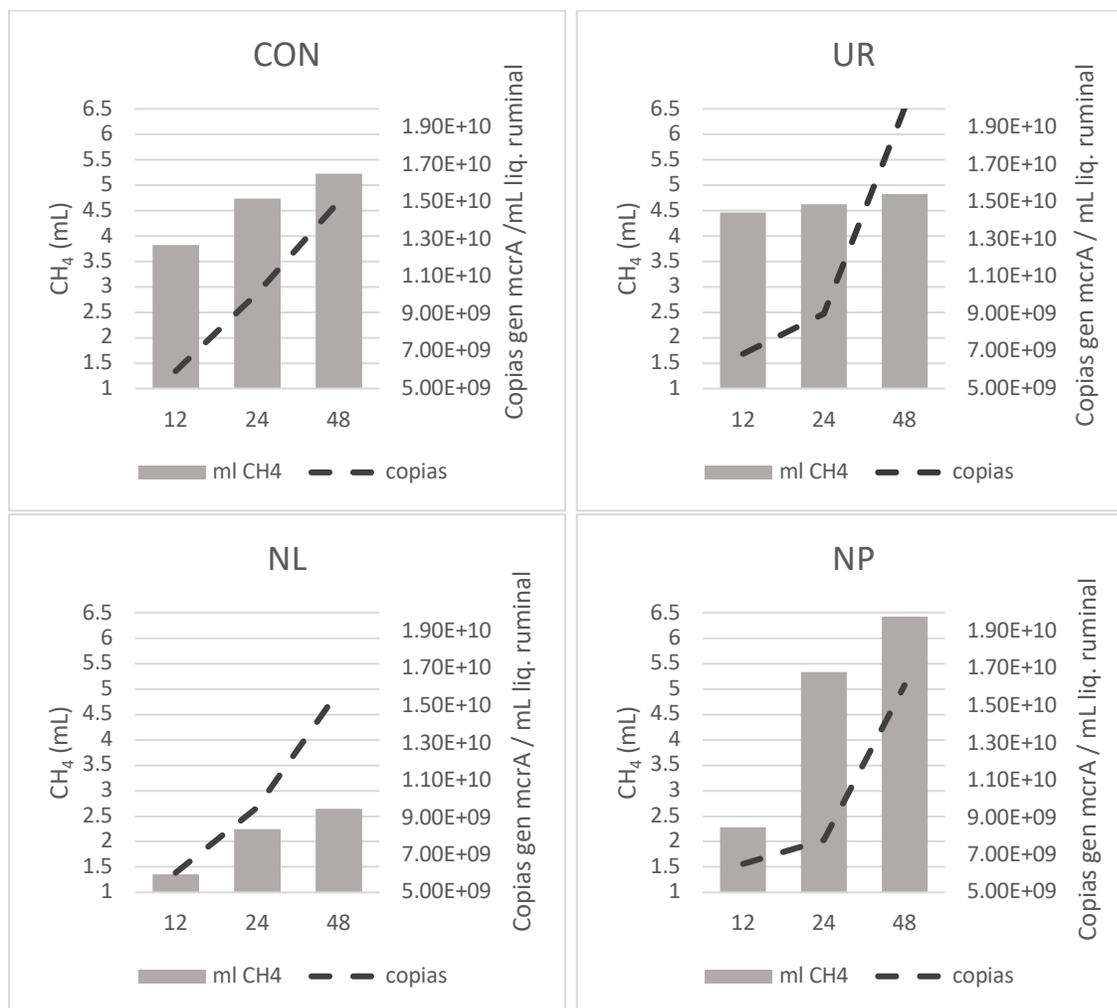


Figura 2. Relación entre el número de copias del gen *mcrA*/mL líquido ruminal y la producción de CH₄(mL), durante los tres intervalos de medición 0-12 h, 12-24 y 24-48h *in vitro*. El número de copias del gen *mcrA* representa la población de Arqueas metanogénicas medidas por qPCR. Tratamientos; Control: Heno pangola (*Digitaria decumbens* Stent) + concentrado en una proporción de 60:40; UR, control + urea; NL, control + nitrato de potasio libre; NP, control + nitrato de potasio encapsulado. Cada tratamiento con nitrato, libre o encapsulado presenta una inclusión de NO₃-del 3% de la MS incubada.

Discusión

En este estudio se realizaron dos experimentos. En el primer experimento, se midió la capacidad de disolución de dos tipos de granulación para la encapsulación del NO₃⁻, con el fin de seleccionar uno de ellos para su posterior evaluación *in vitro*. En el segundo

experimento, se evaluó el efecto del NO_3^- encapsulado (P1) sobre la producción de CH_4 , MSD y población de metanógenos durante 48 h de incubación *in vitro*.

Curva de disolución del nitrato protegido

En el experimento uno, evaluando dos tipos de protección para el NO_3^- , P1 y P2 a través de una curva de disolución, se obtuvo un porcentaje de liberación del NO_3^- del 64 % con P1 y 51% con P2, lo que corresponde a un 20% más de NO_3^- liberado con P1, finalizados los 420 minutos de incubación (Tabla 2). Con el tipo de protección P1, la liberación del NO_3^- puede predecirse utilizando el modelo de regresión $y = 0.0415x + 46.972$, donde el valor de la intersección en el eje "y" indica que inicialmente se presenta un porcentaje de liberación del NO_3^- del 46.97% a una tasa del 0.041 % por hora, mientras que con P2 el modelo fue $y = 0.0292x + 40.197$, lo que implica una tasa de liberación del 0.029% por hora, un 30% menor que con P1. Aunque los dos compuestos fueron formulados con un porcentaje similar de inclusión del NO_3^- del 17 y 17.8%, para P1 y P2, respectivamente, la diferencia en el comportamiento de disolución podría estar relacionada con el menor porcentaje de adición del aglutinante #1 (solución al 30% p/p de CMC) dentro de la formulación de los gránulos, lo que posiblemente condujo a que estos presentaran una mayor dilución y por lo tanto un incremento en la liberación del NO_3^- . De los dos tipos de protección evaluados, fue con P1 que se obtuvo un mayor valor en la tasa de liberación del NO_3^- a través del tiempo lo que finalmente condujo a un incremento en el porcentaje de liberación de este durante las 7 horas de incubación. Gracias a estas características el P1 fue seleccionado para su posterior evaluación en la prueba de degradabilidad *in vitro*. El porcentaje de liberación del NO_3^- obtenido con P1 (64%) fue el más cercano al reportado por Lee et al. (2017) quienes encontraron en promedio un 60% de liberación del NP en solución buffer a las 7 horas de incubación y una disolución inmediata del 99.9% del NO_3^- sin encapsular.

Degradación de la materia seca, producción de gases y metano (CH_4).

El nitrato sin protección provocó una reducción en la MSD como proporción de la MSI a las 24 horas de incubación con respecto a los tratamientos NP y UR (Tabla 4). Esta reducción puede estar relacionada con el efecto tóxico del NO_2^- sobre algunas especies de bacterias celulolíticas, ya que, puede llegar a inhibir las bacterias que producen ATP mediante sistemas de transporte de electrones como las *R. flavefaciens* que obtiene hasta el 50% de su ATP a través de este proceso (Zhou et al., 2012), lo que finalmente podría estar generando una disminución en la capacidad fermentativa de estos microorganismos ruminales.

El tratamiento NP tiene la capacidad de mitigar cerca de la mitad (47%) del CH_4 que se produce por cada gramo de MSD (Tabla 4) durante las primeras 12 horas *in vitro*. Además de reducir el 26% en la proporción correspondiente al CH_4 dentro del total de gases producido. Tal comportamiento puede ser consecuencia del método de encapsulación elegido, ya que este pudo haber liberado cerca del 64% del NO_3^- encapsulado en las primeras horas de incubación (Tabla 3) y retener hasta un 34% de NO_3^- evitando que este tuviera efecto sobre la producción de CH_4 en las siguientes 24 y 48 de evaluación. Este resultado difiere de lo obtenido por Lee et al. (2017), quienes evaluando una inclusión de NP del 2.5% de la MS encontraron una disminución del 32% en la producción de CH_4 a las 24 horas de incubación.

La reducción en la producción de CH_4 con NL ha sido ampliamente reportada en la literatura (Zhou et al., 2012; Lin et al., 2013; Patra et al., 2015; Lee et al. 2017). Estequiométricamente, durante el proceso de reducción de una mol de NO_3^- a NH_4^+ se suprime la producción de una mol de CH_4 (Hulshof et al., 2009; Van Zijderveld et al., 2011). En el actual estudio la reducción total de los 0.015 g de NO_3^- incubados en la dieta del NL, debió disminuir la producción de CH_4 en 5.32 ml, pero la mitigación registrada a las 48 horas de incubación fue de 8.8 mL, lo que corresponde a un 65% menos de lo esperado teóricamente. El incremento en la capacidad de mitigación del NL pudo darse por un efecto tóxico del NO_3^- y NO_2^- sobre las bacterias fermentadoras, lo que implica que, la competencia por el H_2 no fué el único mecanismo de supresión presentado. Según lo reportado por Assanuma et al. (2014), las poblaciones de bacterias celulolíticas

mas representativas, *F. succinogenes*, *R. flavefaciens* y *R. albus*, pueden disminuir durante la alimentación con NO_3^- , además el crecimiento de las tres bacterias celulolíticas puede inhibirse por el incremento en el nivel de NO_2^- en rumen, como se mencionó anteriormente. El NO_2^- también puede ser tóxico para hongos y protozoos, los cuales están estrechamente relacionados con los metanógenos (Yang et al., 2016).

Parámetros de fermentación ruminal, liberación de nitrato y nitrito.

Algunos autores reportan que la inclusión de NO_3^- en la dieta no genera cambios significativos en la producción de AGV (Lin et al. 2013; Shi et al., 2012). La disminución en la concentración de ácido propiónico con NL a las 12 horas (Tabla 4) puede explicarse por la mayor afinidad que tiene el H_2 con el NO_3^- , cuyo proceso de reducción es termodinámicamente mas favorable que la metanogénesis y la propiogénesis (Ungerfeld, 2013); de modo que, tanto la producción de CH_4 como de propionato se puede suprimir en rumen cuando se usan dietas con NO_3^- . Sin embargo, en el presente estudio con el NL no se observó una disminución en la concentración de ácido propiónico en las mediciones de las 24 y 48 horas, pero si en la producción de CH_4 , lo que sugiere que la reducción del NO_3^- después de las 12 horas de incubación compitió principalmente con la metanogénesis en lugar de la propiogénesis.

Las concentraciones de N-NH_3 fueron mayores para los tratamientos con NO_3^- y urea. Las diferencias encontradas entre estos tratamientos y el control se deben al proceso de hidrólisis que presentan estos compuestos nitrogenados en el medio ruminal. La urea se hidroliza rápidamente a NH_3 , el cual representa una fuente de N altamente disponible para los microorganismos ruminales (NRC 2000). La fuente de NH_3 en los tratamientos con NO_3^- proviene del proceso de reducción del NO_3^- a NO_2^- y este a NH_3 , cuando el NO_3^- compete con el CO_2 por el H_2 disponible para la formación de CH_4 (Patra y Yu, 2014). Este proceso de hidrólisis a partir del NO_3^- es mas lento que el que se presenta con la urea (Leng, 2008), lo que es consecuente con el aumento en las concentraciones de NO_2^- en este mismo horario, ya que, la reducción de NO_3^- a NO_2^- es mas rápida que la

reducción de NO_2^- a NH_4 , generando una acumulación transitoria de NO_2^- (Leng et al., 2008). La acumulación de este compuesto altamente tóxico para las bacterias ruminales pudo haber favorecido la disminución en la MSD y el volumen de CH_4 observados con tratamiento de NL (Tabla 4). En apoyo de tal mecanismo, Marais et al. (1988) observaron que los *Ruminococcus sp.*, importantes productores de H_2 en el ecosistema ruminal (Stewart y Flint, 1997), eran extremadamente sensibles a concentraciones bajas de NO_2^- , lo que pudo haber afectado la transferencia de H_2 entre especies.

Con el uso del NP se esperaba una liberación paulatina de NO_3^- , lo que al parecer se presentó en este estudio, ya que no se observaron picos de NO_3^- y NO_2^- en las primeras 12 horas de incubación como los manifestados con el tratamiento de NL. La ausencia de estos picos posiblemente redujo el riesgo de toxicidad para las bacterias ya que, no se observó disminución en la MSD el tratamiento de NP.

El efecto de los NO_3^- sobre las poblaciones metanogénicas fue determinado a través de una prueba de PCR en tiempo real. Para la medición de la población de metanógenos se utilizó el gen *mcrA*, debido a que, solo se han encontrado una o dos copias de este dentro de los genomas de metanógenos secuenciados, este gen se convierte en una herramienta precisa para estimar el número de arqueas dentro de una muestra de líquido ruminal (Lee et al. 2009); cada copia del gen podría contar como una arquea metanogénica en el rumen. En el presente estudio no se encontraron diferencias significativas en el número de copias del gen *mcrA*/mL líquido ruminal, entre los tratamientos evaluados a través del tiempo (Tabla 5). Sin embargo, como se mencionó anteriormente, si se presentaron diferencias en la producción de CH_4 entre tratamientos (Tabla 3). Las gráficas presentadas en la figura 2, muestran como hay una amplia variación entre la producción de CH_4 (mL) por cada intervalo de medición, en cada tratamiento, pero no se observa un cambio significativo en el número de copias del gen *mcrA* / mL de líquido ruminal. Puntualmente, es posible observar como el NP esta produciendo un 59% más de CH_4 que el NL en el intervalo de medición de 24-48 h, con

una cantidad de copias del gen *mcrA*/ mL líquido ruminal similar (1.61 E+10 Vs.1.58 E+10). Esto demuestra, que el volumen de CH₄ producido *in vitro* no estuvo relacionado con el número de metanógenos presentes en el proceso de incubación. El hecho de que se tenga una menor producción de CH₄ con una población similar de metanógenos podría explicarse por el cambio metabólico que estos pueden presentar en el rumen. Es decir, los metanógenos hidrogenótrofos, que obtienen su energía a partir de la reducción del CO₂ a CH₄ con H₂ como principal donante de electrones, también pueden utilizar formiato para obtener energía, aunque con una menor eficiencia, lo que conlleva a una menor producción de CH₄ (Liu y Whitman, 2008). Resultados similares son reportados por Zhao et al. (2018), donde el NO₃⁻ redujo en gran medida la producción de CH₄, sin generar cambios significativos en la cantidad y la diversidad de los metanógenos más importantes a nivel ruminal.

En conclusión, los resultados indican que el NP, evaluado en el presente estudio, muestra un potencial de mitigación de CH₄ solo durante las primeras 12 h de incubación, sin afectar la MSD. El NL redujo efectivamente la producción de CH₄, pero afectó transitoriamente la MSD. No se encontró una relación entre la reducción en la producción de CH₄ originada por el NL y el número de copias del gen *mcrA*, lo que implica que la inhibición del CH₄ no se vió afectada por los cambios en la población total de metanógenos.

Bibliografía

- Allison, M. J., & Reddy, C. A. (1984). *Adaptations of gastrointestinal bacteria in response to changes in dietary oxalate and nitrate*. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US8605628>
- AOAC. (1995). *Official methods of analysis of AOAC International* (16. ed., 5). Retrieved from <http://www.worldcat.org/title/official-methods-of-analysis-of-aoac->

international/oclc/473640402

- Apréaz J E, D. J. M. y N. J. P. (2012). Nutrient content, in vitro degradation and gas production potential of grasses and forage trees and shrubs found in the high tropics of Nariño. Retrieved April 2, 2020, from Livestock Research for Rural Development. Volume 24 (3) website: <http://www.lrrd.org/lrrd24/3/apra24044.htm>
- Formulario Nacional del Farmacopea de los Estados Unidos USP24-NF19 (2000). Convencion de Farmacopedia de Estados Unidos, Inc: Rockville, MD, pp 1882-1883, 2051, 2670 Yasir, M., Asif, M., Kumar, A. and Aggarval A. (2010). Sistema de clasificación de Biofarmaceutica: *Int. J. PharmTech Res.* 2(3):1683.
- Hulshof, R. B. A., Berndt, A., Gerrits, W. J. J., Zijderveld, S. M. Van, Newbold, J. R., & Perdok, H. B. (2009). *Dietary nitrate supplementation reduces methane emission in beef cattle fed.* (2008), 2317–2323. <https://doi.org/10.2527/jas2011-4209>
- IPCC. (2017). IPCC Special Report on Climate Change, Desertification, Land Degradation, Sustainable Land Management, Food Security, and Greenhouse gas fluxes in Terrestrial Ecosystems. *Research Handbook on Climate Change and Agricultural Law*, 7,13-15. <https://doi.org/10.4337/9781784710644>
- Lee, C., Araujo, R. C., Koenig, K. M., & Beauchemin, K. A. (2017). In situ and in vitro evaluations of a slow release form of nitrate for ruminants: Nitrate release rate, rumen nitrate metabolism and the production of methane, hydrogen, and nitrous oxide. *Animal Feed Science and Technology*, 231(July), 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.07.005>
- Lee, S. W., Im, J., Dispirito, A. A., Bodrossy, L., Barcelona, M. J., & Semrau, J. D. (2009). Effect of nutrient and selective inhibitor amendments on methane oxidation, nitrous oxide production, and key gene presence and expression in landfill cover soils: Characterization of the role of methanotrophs, nitrifiers, and denitrifiers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(2), 389–403. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2238-7>
- Leng, R. A. (2008). *The potential of feeding nitrate to reduce enteric methane production in ruminants, A Report to The Department of Climate Change, Commonwealth*

Government of Australia, Canberra, ACT, Australia.

- Li, L., Schoenhals, K. E., Brady, P. A., Estill, C. T., Perumbakkam, S., & Craig, A. M. (2012). Flaxseed supplementation decreases methanogenic gene abundance in the rumen of dairy cows. *Animal*, 6(11), 1784–1787. <https://doi.org/10.1017/S175173111200078X>
- Lin, M., Schaefer, D. M., Zhao, G. Q., & Meng, Q. X. (2013). Effects of nitrate adaptation by rumen inocula donors and substrate fiber proportion on in vitro nitrate disappearance, methanogenesis, and rumen fermentation acid. *Animal*, 7(7), 1099–1105. <https://doi.org/10.1017/S1751731113000116>
- Liu, Y., & Whitman, W. B. (2008). Metabolic, phylogenetic, and ecological diversity of the methanogenic archaea. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1125(April), 171–189. <https://doi.org/10.1196/annals.1419.019>
- Luton, P. E., Wayne, J. M., Sharp, R. J., & Riley, P. W. (2002). The mcrA gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. *Microbiology*, 148(11), 3521–3530. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-11-3521>
- Marais, J. P., Therion, J. J., Mackie, R. I., Kistner, A., & Dennison, C. (1988). Effect of nitrate and its reduction products on the growth and activity of the rumen microbial population. *British Journal of Nutrition*, 59(2), 301–313. <https://doi.org/10.1079/bjn19880037>
- McDougall, E. I. (1948). Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *The Biochemical Journal*, 43(1), 99–109. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16748377>
- McGinn, S. M., Flesch, T. K., Harper, L. A., & Beauchemin, K. A. (2006). An Approach for Measuring Methane Emissions from Whole Farms. *Journal of Environmental Quality*, 35(1), 14–20. <https://doi.org/10.2134/jeq2005.0250>
- NRC, (National Research Council). (2000). *Nutrient Requirements of Beef Cattle* (7th ed.). Washington D.C.: National Academies Press.
- Patra, Amlan K., & Yu, Z. (2015). Effects of adaptation of in vitro rumen culture to garlic

- oil, nitrate, and saponin and their combinations on methanogenesis, fermentation, and abundances and diversity of microbial populations. *Frontiers in Microbiology*, 6(DEC), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01434>
- Patra, Amlan Kumar, & Yu, Z. (2014). Combinations of nitrate, saponin, and sulfate additively reduce methane production by rumen cultures in vitro while not adversely affecting feed digestion, fermentation or microbial communities. *Bioresource Technology*, 155, 129–135. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.099>
- Posada, S. L., Noguera, R., & Bolívar, D. (2006). Relación entre presión y volumen para la implementación de la técnica in vitro de producción de gases en Medellín, Colombia. *Rev Col Cienc Pec*, 194. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/rccp/v19n4/v19n4a06.pdf>
- Ramírez, J., Posada, S., & Noguera, R. (2014). Ruminant methanogenesis and mitigation strategies. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, Vol. 9(2), 307–323. Retrieved from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1900-96072014000200014&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- Rodriguez, C. H. (2007). *Determinación de nitratos en aguas por espectrofotometría UV* (p. 8). p. 8. Retrieved from <http://www.ideam.gov.co/documents/14691/38155/Nitrato+en+agua+por+Espectrofotometría+UV.pdf/ee058d7c-98fd-4d6c-924c-b4e5864c2d32>
- Sejian, V., Lal, R., Lakritz, J., & Ezeji, T. (2011). Measurement and prediction of enteric methane emission. *International Journal of Biometeorology*, 55(1), 1–16. <https://doi.org/10.1007/s00484-010-0356-7>
- Shi, C., Meng, Q., Hou, X., Ren, L., & Zhou, Z. (2012). Response of ruminal fermentation, methane production and dry matter digestibility to microbial source and nitrate addition level in an in vitro incubation with rumen microbes obtained from wethers. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 11(18), 3334–3341. <https://doi.org/10.3923/javaa.2012.3334.3341>
- Stewart C.S., Flint H.J., B. M. P. (1997). *The Rumen Microbial Ecosystem* (Hobson P.N). https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-94-009-1453-7_2

- Thauer, R. (1998). Biochemistry of methanogenesis: a tribute to. *Microbiology*, 144(1998), 2377–2406. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-9-2377>
- Ungerfeld, E., & Kohn, R. (2006). The Role of Thermodynamics in the Control of Ruminant Fermentation. In *Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism and Impact of Nutrition on Gene Expression, Immunology and Stress* (pp. 55–85).
- Ungerfeld, E. M. (2015). Shifts in metabolic hydrogen sinks in the methanogenesis-inhibited ruminal fermentation: a meta-analysis. *Frontiers in Microbiology*, 6, 37. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00037>
- Van Zijderveld, S. M., Gerrits, W. J. J., Dijkstra, J., Newbold, J. R., Hulshof, R. B. A., & Perdok, H. B. (2011). Persistency of methane mitigation by dietary nitrate supplementation in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 94(8), 4028–4038. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4236>
- Yang, C., Rooke, J. A., Cabeza, I., Wallace, R. J., Nolan, J. V., & Wallace, R. J. (2016). Nitrate and Inhibition of Ruminant Methanogenesis: Microbial Ecology, Obstacles, and Opportunities for Lowering Methane Emissions from Ruminant Livestock. 7(February), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00132>
- Zhao, L., Meng, Q., Li, Y., Wu, H., Huo, Y., Zhang, X., & Zhou, Z. (2018). Nitrate decreases ruminal methane production with slight changes to ruminal methanogen composition of nitrate-adapted steers. *BMC Microbiology*, 18(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1164-1>
- Zhou, Z., Yu, Z., & Meng, Q. (2012). Effects of nitrate on methane production, fermentation, and microbial populations in in vitro ruminal cultures. *Bioresource Technology*, 103(1), 173–179. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.013>

CAPÍTULO 3. EFECTO DEL NITRATO ENCAPSULADO SOBRE LAS EMISIONES DE METANO, UTILIZACIÓN DE LA ENERGÍA Y BALANCE DE NITRÓGENO EN NOVILLOS DE CEBA EN TRÓPICO ALTO.

Abstract

The use of nitrate (NO_3^-) as a sink for hydrogen (H_2) at the ruminal level is a strategy to reduce enteric methane (CH_4) emissions, however, it is a potentially toxic alternative for the animal. A protected NO_3^- was elaborated in order to evaluate its effect on enteric CH_4 emissions, dry matter consumption (DMI), energy balance, nitrogen utilization and methemoglobin (MetHb) formation in blood of Brangus steers confined in the high tropics. Nine male steers (341.1 ± 23.02 Kg) were assigned to individual pens in a triplicate Latin square design with 3 blocks and 3 treatments such as: Control (urea), NL = 3% NO_3^- on dry basis and NP = 3% of NO_3^- protected on a dry basis. The diets were isonitrogenated with a 65:35 pangola hay: concentrate ratio. The experiment lasted 63 days and consisted of an initial adaptation of 30 days (housing and chambers) and 3 measurement periods each of 31 days (15 days of adaptation to NO_3^- and 16 of measurements). There were no toxic levels of blood MetHb with any treatment. The production of CH_4 was lower for the treatments with NL and NP with respect to the control in (16.91 and 17.95 Vs. 23.24 L / Kg of CMS; $p < 0.05$). A lower partition factor (Y_m) was observed with NL and NP with respect to the control (4.10 and 4.37 Vs 5.43 Y_m ; $p < 0.05$). NP led to a decrease in the percentage of metabolizable energy consumption (CEM) and retained energy (ER) (15.35 and 5.67%), with respect to the control (20.40 and 8.36%), respectively. Retained nitrogen (g / d) was observed in less quantity in the diet with NP (60.82) when compared with the control (92.51) and the NL (107.29). In conclusion, supplementation with 3% NP in the diet of Brangus steers, reduced the production of enteric CH_4 by 23% compared to the control diet, without presenting toxic levels of MetHb in the blood. However, NP negatively affected DM intake, nitrogen retention, digestibility, and diet metabolicity.

Resumen

El uso de nitrato (NO_3^-) como sumidero de hidrógeno (H_2) a nivel ruminal representa una estrategia para la disminución en las emisiones de metano (CH_4) entérico, sin embargo, es una alternativa potencialmente tóxica para el animal, debido al aumento de metahemoglobina (MetHb) por la absorción de nitrito (NO_2^-) desde el rumen a la sangre. Se elaboró un NO_3^- protegido con el objetivo de evaluar su efecto sobre las emisiones de CH_4 entérico, consumo de materia seca (CMS), balance energético, utilización del nitrógeno y formación de metahemoglobina (MetHb) en sangre de novillos Brangus. Nueve novillos machos (341.1 ± 23.02 Kg) fueron asignados a corrales individuales en un diseño de cuadrado latino triplicado con 3 bloques (periodos) y 3 tratamientos como: Control (urea), NL = 3% de NO_3^- en base seca y NP= 3% de NO_3^- protegido en base seca. Las dietas fueron isonitrogenadas con una proporción de heno de pangola: concentrado 65:35. El experimento tuvo una duración de 63 días y consistió en una adaptación inicial de 30 días (estabulación y cámaras) y 3 periodos de medición cada uno de 31 días (15 días de adaptación al NO_3^- y 16 de mediciones). No se presentaron niveles tóxicos de MetHb con ningún tratamiento. El consumo de materia seca total (CMSt) con NP tuvo una reducción significativa ($P = 0.012$) con respecto al control debido a una disminución del 6% en el consumo de materia seca del suplemento (CMSs) del NP con respecto al control ($P < 0.0001$). La producción de CH_4 fue menor para los tratamientos con NL y NP con respecto al control en (16.91 y 17.95 Vs. 23.24 L/Kg de CMS; $P < 0.0001$). Se observó un menor factor de partición (Ym) con NL y NP con respecto al control (4.10 y 4.37 Vs 5.43 Ym ; $P < 0.05$). El NP llevó a la disminución en el porcentaje del consumo de energía metabolizable (CEM) (15.35%) y energía retenida (ER) (5.67%), con respecto al control (20.40 y 8.36 %; $P < 0.0001$), respectivamente. El nitrógeno retenido (g/d) fue menor con NP (60.82) al ser comparado con el control (92.51) y el NL (107.29) $P = 0.0004$. En conclusión, la suplementación con un 3% de NP en la dieta de novillos Brangus, redujo la producción de CH_4 entérico en un 23% en comparación con la dieta control, sin presentar niveles tóxicos de MetHb en sangre. Sin

embargo, el NP afectó negativamente el consumo de MS, retención de nitrógeno, retención energética y metabolibilidad de la dieta.

Introducción

Actualmente se presenta un aumento en el promedio de la temperatura global debido a diversas actividades humanas a nivel mundial, entre ellas la ganadería, reconocida como una importante actividad pecuaria en todos los países del mundo (IPCC 2017). La fermentación entérica de los rumiantes es una de las principales fuentes antropogénicas de metano (CH_4) en el mundo, aportando del 16 al 20% de este gas a la atmósfera, convirtiéndose en uno de los mayores contribuyentes potenciales al fenómeno del calentamiento global (Sejian et al., 2015). En este contexto, la mitigación de las emisiones de CH_4 se ha convertido en una prioridad de investigación en la nutrición de rumiantes.

La fermentación ruminal produce un exceso de H_2 que necesita ser removido del rumen a través de diferentes reacciones, entre ellas la producción de CH_4 , paso necesario para que el proceso de fermentación y crecimiento microbiano continúe eficientemente (Immig et al., 1996). Se han usado varias estrategias para la utilización de H_2 en rumen como alternativa a la metanogénesis, entre ellas el uso de nitrato (NO_3^-) como sumidero de H_2 que, teóricamente, consume ocho electrones de H_2 por cada mol de NH_4^+ producida. Por otra parte, es necesario considerar que la utilización del H_2 en la reducción del NO_3^- a NH_4^+ es energéticamente más favorable que la formación de CH_4 (Ungerfeld y Kohn 2006). No obstante, el empleo de NO_3^- en dietas para rumiantes debe ser cuidadoso, una vez que los NO_3^- pueden inducir a una intoxicación por nitrito (NO_2^-) en el animal debido a la formación de la metahemoglobina (MetHb), compuesto que disminuye la capacidad en el transporte de oxígeno de la sangre (Bruning-Fann y Kaneene 1993). Con el fin de limitar el riesgo de toxicidad por NO_2^- en rumen se ha recurrido a la adaptación gradual de NO_3^- en la ración y a la encapsulación de este compuesto, en procura de reducir su velocidad de liberación en rumen, (Lee et al. 2015; Olijhoek et al. 2016). El objetivo de

este trabajo fue estudiar el efecto del NO_3^- encapsulado mediante el uso de aglutinantes como la carboximetilcelulosa (CMC) y la polivinilpirrolidona (PVP) sobre las emisiones de CH_4 entérico, el consumo de materia seca (CMS), el balance energético, la utilización del nitrógeno y la formación de MetHb en novillos Brangus.

Materiales y métodos

Comité de ética

Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética para la Experimentación con Animales de la Universidad de Antioquia (acta 76 de mayo 10 de 2012), cumpliendo con lo dispuesto en la Ley 84 de 1989, "Estatuto Nacional de Protección de los Animales", y en la Resolución 008430 de 1993, "Normas científicas y administrativas para la investigación en salud", expedidas por el Ministerio de Salud de la República de Colombia.

Encapsulación del nitrato (NO_3^-)

La encapsulación o protección del NO_3^- se realizó a partir de nitrato de calcio (Calcinit YARA, Colombia) (30 Kg), celulosa microcristalina (CMC) Ph 102 Avicel® (Avicel PH-101; Sigma-Aldrich, 6950 Ambassador Dr, Allentown, PA 18106) (27 Kg) y lactosa (3.3 Kg); Estos materiales fueron inicialmente mezclados en seco en una mezcladora de polvo tipo horizontal (Pulvex; Tlazintla C.P. 08710, CDMX) durante 30 minutos. Posteriormente, se adicionó agua destilada hasta completar 11 litros permaneciendo en agitación por 10 minutos más. A continuación, se esparció la mezcla en bandejas de aluminio para secar en estufa a 60 °C durante 4 horas; paso seguido, se dispusieron las bandejas a temperatura ambiente por una hora y se procedió a transferir la mezcla a una granuladora (YK-160). A la salida de los gránulos, se adicionó polivinilpirrolidona (PVP K30; Sigma-Aldrich, 6950 Ambassador Dr, Allentown, PA 18106) (10 Kg), para cubrir la superficie de los gránulos y finalmente ser extendidos nuevamente en bandejas de

aluminio para su secado final en estufa a 60 °C durante 4 horas y obtener así, los gránulos del nitrato protegido.

Localización e instalaciones

El experimento fue realizado en el laboratorio de calorimetría animal, ubicado en la Hacienda "La Montaña", propiedad de la Universidad de Antioquia. La propiedad esta ubicada en el municipio de San Pedro de los Milagros del departamento de Antioquia. La zona de vida es bosque húmedo Montano Bajo (bh-MB), con una temperatura promedio de 15°C, a una altura de 2350 a 2500 metros sobre el nivel del mar y una humedad relativa del 72%, de acuerdo con la clasificación de Holdridge (1967).

Las instalaciones destinadas para el confinamiento contaban con un cobertizo, con techo alto que permitía una ventilación e iluminación natural y a la vez protegía a los animales de la lluvia y el sol directo. El piso de hormigón fue cubierto con tapetes de goma para proteger a los animales de posibles lesiones en las patas causadas por la abrasión. Los animales fueron dispuestos en corrales individuales de (1.3 m ancho x 1.8 m de largo), con comedero y bebedero automático individual para garantizar el libre acceso al alimento y agua de bebida.

Cámaras respirométricas

Para las mediciones por respirometría, se dispuso de dos cámaras de circuito abierto, construidas en acero inoxidable, con un volumen aproximado de 24.6 m³ (2.7 m de ancho, 3.8 m de largo y 2.4 m de altura). Las cámaras cuentan con ventanas laterales de vidrio (1.40 m ancho x 1.30 m largo), para permitir el contacto visual entre los animales y reducir el estrés durante las mediciones. Al interior de las cámaras los animales fueron asegurados en un brete y tenían acceso a un comedero y bebedero. Durante las mediciones se garantizó una temperatura de 21-22 °C y una humedad del 55%, a través del empleo de aire acondicionado y deshumificador.

Alimentación

La dieta consistió en un 65% de heno de pangola (*Digitaria eriantha*, sin. *D. decumbens*) y 35% de concentrado y suplemento mineral. Esta formulación se diseñó siguiendo los estándares nutricionales recomendados por el NRC (2016). La composición de la dieta se muestra en la Tabla 1. Los tratamientos se diferenciaban por el suplemento de nitrógeno empleado, cuyas fuentes fueron: urea para el control, nitrato de calcio para el nitrato libre (NL) y nitrato de calcio encapsulado para el nitrato protegido (NP). Se suplementó con urea para obtener raciones isonitrogenadas. La fuente de nitrato empleada fue nitrato de calcio (CALCINIT, YARA; Bogotá, Colombia) cuya concentración de NO_3^- fue del 63% (protocolo GE-PR-004-GDCON). Por lo tanto, para lograr un aporte del 3% de NO_3^- en el tratamiento de NL fue necesario una inclusión de nitrato de calcio (CALCINIT) del 4.8% dentro de la formulación. La fuente de NP contaba con una concentración del 18% de NO_3^- , lo que condujo a una adición del 16.7% del NP, para obtener un aporte del 3% de NO_3^- en la dieta.

Los animales fueron alimentados cuatro veces al día, a las 8:00, 11:00, 14:00 y 18:00 horas, durante el periodo experimental cuando estuvieron en el establo, y dos veces al día, a las 8:00 y 18:00 horas, cuando estuvieron en la cámara. La cantidad de alimento ofrecido a cada animal se ajustó a una oferta del 2.5 % del peso vivo en materia seca (MS). A lo largo del periodo experimental la dieta fue ajustada para garantizar un consumo de NO_3^- equivalente al 3% de la MS consumida. Para el tratamiento con urea, la cantidad de urea fue ajustada de tal manera que el aporte de nitrógeno (74.4 g) de este tratamiento fuera equivalente al nitrógeno aportado por los tratamientos con NO_3^- . La ingesta de MS se calculó como la diferencia entre el alimento ofrecido y el rechazo.

Tabla 1. Ingredientes del alimento y composición química de las dietas

Item	Tratamientos		
	Control ¹	NL ²	NP ³
Ingredientes (MS, %)			
Maíz amarillo	6.02	6.36	6
Torta de soya	5.02	6	6.5

Semilla de algodón	1	0.5	0.92
Salvado de trigo	16.5	11.92	0
Grasa sobrepasante ⁴	1.09	2.56	2.08
Melaza ⁵	2.31	1.86	1.8
Sal mineralizada ⁶	1.2	1	1
Heno (<i>Digitariadecumbens Stent.</i>)	65.0	65.0	65.0
Urea	1.62		
NL		4.8	
NP			16.7
Composición química (% de MS ± DE)			
MS %	86.4 ± 0.9	86.4 ± 0.5	85.9 ± 0.6
MO %	91.8 ± 0.4	89.4 ± 0.4	88.9 ± 0.9
PC %	17.4 ± 0.6	16.7 ± 2.0	16.6 ± 1.4
EB, Mcal/Kg MS	3.97 ± 0.2	3.8 ± 0.1	3.7 ± 0.2
NO ₃ ⁻		3.0	3.0
FDN %	45.4 ± 0.4	44.7 ± 0.4	43.2 ± 0.4
FDA %	26.9 ± 0.2	26.7 ± 0.2	26.3 ± 0.2

¹Control= 1.62% urea en la dieta en MS.

²NL=nitrato libre, nitrato de Calcio (62.8% NO₃-)

³NP= nitrato protegido, nitrato de Calcio (18% NO₃-)

⁴Grasa sobrepasante = grasa (84%), ácidos grasos saturados (50.5%), ácidos grasos insaturados (49.5%), ácidos grasos libres (84%)

⁵Composición química de la melaza adicional = MS (17.2%), PC (14.8%) y EB (2.7 Mcal/Kg MS)

⁶Sal mineralizada= Ca (14.0%), P (8.0%), Mg (0.6%), S (6.0%), Zn (0.8%), Cu (0.33%), I (0.02%), Co (0.005%), Se (0.0075%)

Animales y manejo

Se utilizaron nueve novillos mestizos Brangus (Brahman x Angus) castrados, con un peso vivo promedio de 341.1 ± 23.02 Kg y aproximadamente 20 meses de edad. Antes de iniciar el experimento, los animales fueron desparasitados contra ecto y endoparásitos y adaptados a la estabulación e ingreso a las cámaras respirométricas por un periodo de 30 días. Al finalizar este periodo, los animales presentaron un consumo equivalente tanto fuera como dentro de las cámaras. Se llevaron a cabo 3 periodos de medición, cada uno de 31 días (15 de adaptación y 16 días de colecta). Los animales fueron pesados al comienzo del experimento y en cada periodo de medición antes de ingresar a las

cámaras respirométricas, con el propósito de registrar la ganancia de peso durante el periodo experimental.

Para limitar la aparición de problemas de intoxicación con NO_3^- , cada periodo experimental de 31 días fue dividido en dos fases, fase de adaptación (15 días) y fase de medición (16 días). Durante la fase de adaptación el nivel de NO_3^- fue incrementando desde el 1 hasta el 3% del consumo de materia seca (CMS) cada 5 días. Durante el periodo de medición se tomaron muestras de la oferta y el rechazo del alimento, además de muestras de heces y orina para determinar el CMS, digestibilidad, balance energético, balance de nitrógeno y calorimetría. En total se realizaron 3 periodos experimentales donde los animales fueron aleatorizados y asignados a un tratamiento por periodo.

Ensayos de digestibilidad

Dentro de la fase de medición, el ensayo de digestibilidad aparente fue realizado durante cinco (5) días, luego de haber finalizado el periodo de adaptación a la dieta experimental. Para obtener la digestibilidad aparente del alimento fue necesario la medición del consumo total de MS y la colecta total de heces de cada animal.

El consumo total de materia seca (CMSt) correspondiente a la sumatoria del consumo de materia seca del suplemento (CMSs) y del heno (CMsh) se obtuvo a través de la diferencia entre la oferta y el rechazo diario de alimento por cada animal. El consumo de cada nutriente se obtuvo determinando la composición nutricional del alimento ofrecido y rechazado. Muestras de 250 g del alimento ofrecido y rechazado fueron diariamente colectadas y almacenadas a -10°C , obteniendo al final una muestra compuesta del alimento rechazado y otra del alimento ofrecido por animal para su posterior caracterización nutricional.

El consumo de materia seca (CMS), consumo de proteína bruta (CPB), consumo de materia orgánica (CMO) y consumo de energía bruta (CEB) se expresó en kg/animal/día y g/kg de peso metabólico ($\text{PV}^{0.75}$); adicionalmente, el CMS se expresó como porcentaje del PV.

Para determinar la producción de MS fecal la totalidad de las heces fueron diariamente recolectadas y pesadas. Del total diario de cada animal se obtuvo una submuestra de 200 g aproximadamente para ser almacenada a -10°C. Al término de los cinco días se obtuvo una muestra compuesta por animal para su posterior análisis químico.

La digestibilidad aparente (DA) de la MS y de los nutrientes se obtuvo a través de la ecuación $DA(\%) = [(Nutriente\ consumido, g - Nutriente\ en\ las\ heces, g) / Nutriente\ consumido, g] * 100$.

Colecta de orina

Durante 5 días consecutivos se midió la producción de orina de cada uno de los animales. Para esto, se adaptó un arnés con una manguera plástica que dirigía la orina a un recipiente graduado para la medición del volumen producido. Cada 24 horas se registraba el dato de producción de orina y se tomaba una muestra del 10% del volumen total. Se hicieron alícuotas de 100 ml, las cuales fueron acidificadas con un ml de ácido sulfúrico (H₂SO₄) al 90% y almacenadas a 4 °C. Al final de cada periodo de medición se realizó un pool de muestras con las alícuotas previamente almacenadas por cada animal para su posterior análisis químico.

Consumo y producción de gases

Finalizada la prueba de digestibilidad, los animales ingresaron de forma individual a las cámaras respirométricas para cuantificar la producción de calor (PC) y CH₄.

Las mediciones en las cámaras se realizaron en periodos de 23 horas por día, durante tres días consecutivos por cada animal por periodo. Los datos colectados en la cámara se extrapolaron a periodos de 24 horas para su análisis estadístico y reporte. Al interior de las cámaras se manejó una temperatura de 21-22 °C y una humedad relativa del 55%. Cada cámara contaba con una entrada de aire (atmosférico) y una salida. El aire saliente se succiono continuamente a una tasa de 500 L/min, mediante un sistema de flujo de masas (Flowkit 2000; Sable Systems, Las Vegas, USA). Los analizadores de dióxido de carbono (CO₂) (CA-10A), CH₄ (MA-10) y oxígeno (O₂) (FC-10) (Sable Systems International, Las Vegas, USA) se calibraron antes de cada periodo de mediciones

inyectando una concentración conocida de CO₂ (0.48%) y CH₄ (0.098%); el analizador de O₂ se calibró utilizando la concentración ambiental de este gas (20,946% STP). Las concentraciones de CO₂, O₂ y CH₄ del aire externo como del interior de la cámara se registraron y almacenaron cada segundo con ayuda de un soporte lógico (ExpeData-UI2, Sable Systems International). Todos los datos fueron corregidos por temperatura, presión estándar (STP) y humedad.

Producción de calor

Conocidos los volúmenes de consumo de O₂ y producción de CO₂ y CH₄ se procedió a emplear la ecuación propuesta por Brouwer (1965) para estimar la producción de calor (PC): $PC \text{ (kcal/d)} = 3.886 \times O_2 \text{ (L/d)} + 1.200 \times CO_2 \text{ (L/d)} - 1.431 \times N \text{ orina (g/d)} - 0.518 \times CH_4 \text{ (L/d)}$.

Balance energético

El consumo de energía bruta (CEB) de cada animal se determinó por la diferencia entre la cantidad de energía bruta (EB) presente en el alimento ofrecido y la EB presente en el alimento rechazado. El consumo de energía digestible (CED) se determinó al descontar del CEB el contenido de EB presente en las heces. El consumo de energía metabolizable (CEM) correspondió a la diferencia entre el CED y la pérdida de energía presente en la orina y el CH₄. La energía retenida (ER) fue estimada como la diferencia entre el CEM y la PC. La unidad de expresión de los valores de CEB, CED, CEM y ER fue Mcal/día. Los cocientes entre CED/CEB (digestibilidad de la energía), CEM/CEB (metabolicidad de la energía), CEM/CED, energía retenida (ER) /CEB y ER/CEM se establecieron para determinar la eficiencia de utilización de la energía.

Balance de nitrógeno

Para el cálculo del balance de nitrógeno (BN) fue necesario determinar la concentración de nitrógeno (N) en el alimento ofrecido, las sobras, la orina y las heces. El N retenido se determinó empleando la siguiente expresión matemática:

$$\text{N retenido (g/animal/día)} = [\text{N Ingerido (g/animal/día)} - \text{N fecal (g/animal/día)} - \text{N orina (g/animal/día)}].$$

Medición de metahemoglobina (MetHb) en sangre

Durante el periodo de adaptación al NO_3^- y la urea, muestras de sangre de cada animal fueron tomadas en los días 0, 5, 10 y 15 correspondientes a los días que se incrementó la dosis de NO_3^- en la dieta (0, 1, 2 y 3% de la MS, respectivamente).

Las muestras de sangre fueron tomadas de la vena yugular en tubos al vacío con EDTA tapa lila, 3 horas después la primera oferta de alimento, siguiendo las recomendaciones de Lee et al. (2017). Inmediatamente las muestras fueron almacenadas a $-5\text{ }^\circ\text{C}$ para posterior análisis en el laboratorio según protocolo adaptado de Sato (2005). Se estableció que si la concentración de MetHb excedía el 20% del total de la hemoglobina (Hb), el animal tendría que salir del estudio aunque los signos subclínicos de la metahemoglobinemia por lo general solo se producen cuando se alcanzan valores de MetHb de 30 a 40% o mayores (Bruning-Fann and Kaneene 1993).

Mediciones en el laboratorio

Las muestras de alimento, sobras y heces fueron parcialmente secadas en un horno de ventilación forzada a $60\text{ }^\circ\text{C}$ por 72 h, molidas con un tamiz de 1 mm en un molino Thomas–Wiley (Arthur M. Thomas, Philadelphia, PA, USA) y se almacenaron en bolsas plásticas selladas y marcadas para su posterior análisis químico. Las sobras y heces se analizaron como muestras combinadas para cada animal. Los análisis de MS, proteína cruda (PC) y cenizas se hicieron de acuerdo (AOAC 2005). La fibra detergente neutra (FDN) fue analizada usando amilasa estable al calor según (Van Soest, Robertson y Lewis, 1991). La energía bruta de las muestras fue analizada con la ayuda de una bomba

calorimétrica (AC600 Semi- automática Isoperibolica, Michigan, USA). Para la medición de la energía bruta (EB) en la orina se usaron compresas de algodón de peso conocido, se impregnaron con un peso conocido de orina y se midió la energía en conjunto. La resta entre la energía en la muestra compuesta por la orina y la compresa menos la energía de la compresa fue el valor de la EB de la orina. Para determinar la MS de la orina, se usaron copas de polietileno de peso conocido, se pesó una alícuota de 20 ml de orina y se seco en estufa de ventilación forzada por a 60 °C por 96 h.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron de acuerdo con un diseño en cuadrado latino 3 x 3, replicado 3 veces con periodos de 31 días (15 de adaptación y 16 días de colecta) de tal manera que se obtuvieron nueve observaciones por tratamiento.

Los datos fueron analizados usando el procedimiento GLM de SAS (SAS® University Edition 2019). La opción de LSMEANS fue usada para generar las medias entre tratamientos. El efecto del tratamiento fue definido por la prueba *F* de ANOVA. Las comparaciones entre medias de tratamientos fueron realizadas con la prueba de *Tukey* con una significancia del 5%.

Resultados

Composición de la dieta

Los ingredientes y la composición química de la dieta se reportan en la Tabla 1.

Metahemoglobina

En la Tabla 2 se muestran los niveles de MetHb en novillos alimentados con dosis crecientes de NO₃⁻ (1, 2 y 3% de NO₃⁻ en la MS). Las concentraciones de MetHb no fueron diferentes entre tratamientos y no se evidenciaron incrementos significativos cuando la dosis de NO₃⁻ paso del 1 al 3% de la MS ingerida (P > 0.05).

Tabla 2. Niveles de metahemoglobina (MetHb) en novillos alimentados con tres diferentes dosis de nitratos (1, 2 y 3 % de NO₃⁻ en la MS).

Item	Tratamientos			SEM	P-value
	Control ¹	NL ²	NP ³		
Met HB (% de Hb) ⁴					
Inclusión 1.0% NO ₃ en la dieta	4.62	4.5	4.56	2.913	0.811
Inclusión 2.0% NO ₃ en la dieta	4.61	4.52	4.55	2.928	0.838
Inclusión de 3% NO ₃ en la dieta	4.23	4.95	4.27	4.354	0.715

¹Control= 1.62% urea en la dieta en MS.

²NL=nitrato libre, nitrato de Calcio (62.8% NO₃⁻)

³NP= nitrato protegido, nitrato de Calcio (18% NO₃⁻)

⁴Met HB (% de Hb)= Porcentaje de metahemoglobina en sangre como respuesta a niveles crecientes de NO₃⁻ durante en proceso de adaptación a la dieta.

^{a, b} Letras diferentes en la misma fila indican diferencia estadística entre las medias de tratamiento (P<0.05)

Consumo de nutrientes

El efecto de la adición de NO₃⁻ en dietas para novillos Brangus sobre el consumo de nutrientes se presenta en la Tabla 3. Menores consumos de MS total (CMSt) en los tratamientos que incluyeron NO₃⁻ fueron observados. Una reducción significativa en el CMSt (8.6%) se registró en el tratamiento con NP con respecto al tratamiento control (P = 0.012). El origen de estas diferencias radica en los consumos de MS de suplemento (CMSs), donde los animales en el tratamiento de NP consumieron 24% y 13% menos suplemento que el observado en los tratamientos control y NL, respectivamente (P < 0.0001). El tratamiento NP redujo los consumos de proteína cruda (CPB) (P < 0.0001), materia orgánica (CMO) (P < 0.0005), y energía bruta (CEB) (P < 0.0001), con relación a los tratamientos control y NL.

Tabla 3. Efectos del nitrato protegido (NP) y el nitrato libre (NL) sobre el consumo de nutrientes en novillos Brangus en trópico alto.

Variable	Tratamientos			SEM	P-value
	Control ¹	NL ²	NP ³		
Peso vivo (kg)	385.67	382.44	381.33	3.486	0.5557
<i>Consumo diario e individual de materia seca y de nutrientes⁴</i>					
CMSt ⁵ (kg)	8.38 ^a	8.03 ^{ab}	7.66 ^b	0.173	0.012
CMS _h (kg)	5.48	5.48	5.45	0.137	0.988
CMS _s (kg)	2.9 ^a	2.55 ^{ab}	2.21 ^b	0.097	<.0001
CMSt (% PV)	2.27	2.26	2.12	0.046	0.051
CMSt (g/kg PV ^{0.75})	99.44 ^a	98.29 ^{ab}	92.47 ^b	1.988	0.034
CPB (kg)	1.38 ^a	1.31 ^a	1.14 ^b	0.029	<.0001
CPB (g/kg PV ^{0.75})	16.50 ^a	16.04 ^a	13.76 ^b	0.373	<.0001
CPB (% MSt)	16.54 ^a	16.36 ^a	15.02 ^b	0.298	0.0009
CMO (kg)	7.57 ^a	7.07 ^{ab}	6.71 ^b	0.153	0.0005
CMO (g/kg PV ^{0.75})	89.78 ^a	86.5 ^{ab}	81.03 ^b	1.779	0.0022
CMO (% MSt)	90.31 ^a	87.98 ^b	87.6 ^b	0.393	<.0001
CEB (Mcal)	33.83 ^a	31.39 ^{ab}	29.66 ^b	0.666	<.0001
CEB (Mcal/Kg PV)	0.40 ^a	0.38 ^{ab}	0.36 ^b	0.007	0.0003

¹Control= 1.62% urea en la dieta en MS.

²NL=nitrato libre, nitrato de Calcio (62.8% NO₃⁻)

³NP= nitrato protegido, nitrato de Calcio (18% NO₃⁻)

⁴MSt, materia seca total; MSh, materia seca de heno; MSs, materia seca de suplemento; PB, proteína bruta; MO, materia orgánica.

⁵Relación forraje:concentrado entre tratamientos: control (65:35), NL (68:32) y NP (71:29).

SEM, error estándar de la media

^{a, b} Letras diferentes en la misma fila indican diferencia estadística entre las medias de tratamiento (p<0.05)

Digestibilidad aparente

El efecto de la adición de urea y NO₃⁻ en dietas para novillos Brangus sobre la digestibilidad aparente de la MS, PB, MO y EB se reporta en la Tabla 4. Una mayor producción fecal se observó en el tratamiento con NP (P = 0.0201). Se presentaron diferencias significativas para NP en la digestibilidad aparente de la MS, PB, MO y EB

con una reducción del 16, 20, 16 y 15%, respectivamente, en comparación con el control ($P < 0.0001$). Además, el NP tuvo una menor digestibilidad aparente para PB y EB con respecto al NL y el control ($P < 0.0001$).

Tabla 4. Efectos del nitrato protegido (NP) y el nitrato libre (NL) sobre la digestibilidad aparente de la materia seca (MS), proteína bruta (PB), materia orgánica (MO) y energía bruta (EB) en novillos Brangus en trópico alto.

Variable	Tratamientos			SEM	P-value
	Control ¹	NL ²	NP ³		
MS fecal (kg/animal/d)	3.03 ^b	3.13 ^{ab}	3.45 ^a	0.109	0.0201
MS fecal (g/kg PV ^{0.75} /d)	36.00 ^b	38.51 ^{ab}	41.55 ^a	1.255	0.0071
Digestibilidad aparente (%)					
MS	63.59 ^a	60.17 ^{ab}	53.71 ^b	1.600	<.0001
PB	68.89 ^b	76.73 ^a	56.60 ^c	1.676	<.0001
MO	65.43 ^a	60.92 ^{ab}	54.68 ^b	1.64	<.0001
EB	68.83 ^a	67.91 ^a	58.36 ^b	1.296	<.0001

¹Control= 1.62% urea en la dieta en MS.

²NL=nitrato libre, nitrato de Calcio (62.8% NO₃-)

³NP= nitrato protegido, nitrato de Calcio (18% NO₃-)

^{a, b, c}Letras diferentes en la misma fila indican diferencia estadística entre las medias de tratamiento ($p < 0.05$)

Balance del nitrógeno

La eficiencia de utilización del N en novillos Brangus suplementados con urea y NO₃⁻ se presentan en la Tabla 5. La adición de NO₃⁻ no tuvo efectos sobre la producción total de orina en novillos Brangus ($P = 0.1426$). Una reducción significativa del 17% y del 13% en la ingesta de N (g/día) se presentó en los animales que consumieron la dieta con NP, en comparación con los tratamientos control y NL, respectivamente ($P < 0.0001$). La excreción fecal de N como porcentaje del N consumido incrementó en un 25 y 46% en los animales que consumieron la dieta con NP, en comparación con los tratamientos control y NL, respectivamente ($P < 0.0001$). La excreción de N urinario fue 30% inferior

con NP comparado con el control ($P = 0.0006$). En cuanto al N retenido como % del N consumido, con el tratamiento de NP se retuvo un 34% menos de N que con el control y un 42% menos que con el NL ($P = 0.017$).

Tabla 5. Efectos del nitrato protegido (NP) y el nitrato libre (NL) sobre la digestibilidad y utilización del nitrógeno en novillos Brangus en trópico alto.

Variable	Tratamientos			SEM	P-value
	Control ¹	NL ²	NP ³		
Orina (kg/animal/d) ⁴	8.47	6.4	8.13	0.541	0.1426
Orina (g/kg PV ^{0.75} /d)	100.29	79.38	96.67	6.22	0.2209
Balance de nitrógeno (g/animal/día)					
N consumo, g/d ⁵	221.56 ^a	210.18 ^a	182.47 ^b	4.706	<.0001
N fecal					
g/d	67.77 ^b	48.34 ^c	78.59 ^a	2.626	<.0001
% del N consumido	32.11 ^b	23.13 ^c	43.01 ^a	1.682	<.0001
N urinario					
g/d	61.28 ^a	54.55 ^{ab}	43.05 ^b	3.346	0.0006
% del N consumido	28.43	27.09	23.44	1.858	0.1453
N retenido ⁶					
g/d	92.51 ^a	107.29 ^a	60.82 ^b	7.017	0.0004
% del N consumido	39.45 ^{ab}	49.77 ^a	33.54 ^b	2.936	0.0174
g/kg PV ^{0.75}	1.09 ^a	1.39 ^a	0.73 ^b	0.079	0.0005

¹Control= 1.62% urea en la dieta en MS.

²NL=nitrato libre, nitrato de Calcio (62.8% NO₃-)

³NP= nitrato protegido, nitrato de Calcio (18% NO₃-)

⁴Densidad de la orina= 1.14 g/ml

⁵Consumo de N medido durante la colecta total de heces y orina (5 d/ periodo)

⁶N retenido= N Consumo – N heces – N orina

^{a, b}Letras diferentes en la misma fila indican diferencia estadística entre las medias de tratamiento ($p < 0.05$)

Balance y eficiencia de utilización de la energía

Los animales que consumieron la dieta con NP presentaron una disminución en los consumos de EB, ED, y EM en comparación con los animales que recibieron la dieta control (Tabla 6).

Con el tratamiento NP se manifestó un incremento en la pérdida energética a través de las heces en comparación con el control y el NL ($P = 0.003$). Las pérdidas energéticas en orina fueron en promedio un 20% menores con el tratamiento NP con respecto a los otros tratamientos evaluados ($P = 0.023$). Una menor pérdida de energía a través del CH_4 se observó en los tratamientos con NO_3^- (1.29 Mcal /día) en comparación con el tratamiento control (1.85 Mcal /día) ($P < 0.0001$). Una disminución promedio del 25 y 20% fue observada en el factor de partición (Y_m) para NL y NP con respecto al control ($P < 0.0001$).

Con el tratamiento de NL los animales presentaron incremento calórico del 27% comparados con los que consumían la dieta control ($P < 0.0001$).

Se presentó diferencia estadística en la eficiencia de la utilización de la energía del tratamiento NP comparado con el NL y control, siendo menor la relación presentada por NP cuando se expresó en términos de CED/CEB, CEM/CEB ($P < 0.0001$; Tabla 6). El porcentaje de ER a partir del CEM fue menor ($P < 0.0001$) para los animales bajo el tratamiento de NL, comparados con los tratamientos control y NP.

Tabla 6. Consumo de energía bruta (CEB), consumo de energía digestible (CED), consumo de energía metabolizable (CEM) (Mcal/día) y eficiencia de utilización de la energía de novillos Brangus suplementados con nitratos.

Variable	Tratamientos			SEM	P-value
	Control ¹	NL ²	NP ³		
<i>Balance energético (Mcal/día) durante la colecta total</i>					
CEB ⁴	33.83 ^a	31.39 ^{ab}	29.67 ^b	0.666	<.0001
Energía en las heces	10.51 ^b	10.07 ^b	12.17 ^a	0.407	0.003
CED ⁵	23.32 ^a	21.32 ^a	17.49 ^b	0.630	<.0001

Energía en orina	1.07 ^a	1.04 ^a	0.84 ^b	0.062	0.023
%EB	3.17	3.35	2.81	0.197	0.267
%ED	4.64	5.04	4.92	0.348	0.784
Energía en CH ₄	1.85 ^a	1.29 ^b	1.29 ^b	0.069	<.0001
%EB (Ym%) ⁶	5.41 ^a	4.06 ^b	4.33 ^b	0.143	<.0001
%ED	7.89 ^a	6.00 ^b	7.61 ^a	0.295	0.004
CEM ⁷	20.40 ^a	18.99 ^a	15.35 ^b	0.595	<.0001
Producción de calor ⁸	11.3 ^b	15.47 ^a	9.8 ^c	0.591	<.0001
ER ⁹	8.36 ^a	5.04 ^b	5.67 ^b	0.626	<.0001
<i>Eficiencia de utilización de la energía (%)</i>					
CED/CEB	68.83 ^a	67.9 ^a	58.36 ^b	1.295	<.0001
CEM/CEB	60.26 ^a	60.49 ^a	51.21 ^b	1.371	<.0001
CEM/CED	87.46	88.96	87.47	0.526	0.297
ER/CEB	25.29	15.5	18.95	2.088	<.0001
ER/CEM	41.68 ^a	23.69 ^b	34.65 ^a	2.989	<.0001

¹Control= 1.62% urea en la dieta en MS.

²NL=nitrato libre, nitrato de Calcio (62.8% NO₃-)

³NP= nitrato protegido, nitrato de Calcio (18% NO₃-)

⁴CEB= Consumo de energía bruta

⁵CED=CEB (Mcal/d) - energía excretada en heces (Mcal/d). Digestibilidad de la energía

⁶Ym: Factor de partición. Energía del alimento liberada en CH₄

⁷CEM Consumo de energía metabolizable = 100 - % energía en heces - % energía en orina - % energía en metano

⁸Producción de calor calculado con base en el consumo de O₂ y las emisiones de CO₂ y CH₄ (mirar ecuación en materiales y métodos)

⁹ER (%) = CEM (%) – producción de calor (%).

^{a, b} Letras diferentes en la misma fila indican diferencia estadística entre las medias de tratamiento (P<0.05)

Consumo y producción de gases de la respiración

Los consumos de O₂ y la producción de CO₂ y CH₄ se reportan en la Tabla 6. Los tratamientos con NO₃⁻ produjeron en promedio 138.2 L de CH₄/día, valor 29.7% inferior al registrado en el tratamiento control (196.6 L/día) (P < 0.001). Este mismo comportamiento fue registrado cuando se relaciona la producción de CH₄ (L/día) con el CMSt (Kg/día) (P < 0.001). La menor producción de CH₄ en los tratamientos con NO₃⁻ significó que una menor proporción de la EB consumida se perdiera en forma de este gas (Ym) durante el proceso fermentativo (P < 0.001). Se registraron diferencias para la

producción de CO₂ (P = 0.0024) y consumo de O₂ (P < 0.001) a favor del tratamiento NL comparado con los tratamientos control y NP.

Tabla 7. Producción de metano (CH₄), consumos de oxígeno (O₂) y dióxido de carbono (CO₂) de novillos Brangus suplementados con nitratos (NO₃⁻).

Variable	Tratamientos			SEM	P-value
	Control ¹	NL ²	NP ³		
CMS ⁴ durante las mediciones de gas (Kg/d)	8.38 ^a	8.03 ^{ab}	7.66 ^b	0.173	0.0122
CH ₄ (L/d)	196.55 ^a	137.42 ^b	139.03 ^b	6.739	<.0001
CH ₄ (L/Kg de MS consumida)	23.24 ^a	16.91 ^b	17.95 ^b	0.501	<.0001
CH ₄ (% de CEB, Ym ⁵)	5.43 ^a	4.10 ^b	4.37 ^b	0.116	<.0001
CO ₂ producción (L/d)	2282.24 ^b	2610.67 ^a	2028.28 ^b	87.76	0.0024
O ₂ consumo (L/d)	2252.09 ^b	3587.01 ^a	2290.29 ^b	141.93	<.0001
CH ₄ /CO ₂ proporción	8.57 ^a	4.96 ^c	6.93 ^b	0.104	<.0001

¹Control= 1.62% urea en la dieta en MS.

²NL=nitrato libre, nitrato de Calcio (62.8% NO₃⁻)

³NP= nitrato protegido, nitrato de Calcio (18% NO₃⁻)

⁴CMS= Consumo de materia seca

⁵Ym: Factor de partición. Energía del alimento convertido en CH₄

a, b, c Letras diferentes en la misma fila indican diferencia estadística entre las medias de tratamiento (P<0.05)

Discusión

Metahemoglobina

El incremento de la MetHb en sangre se produce gracias al aumento del NO₂⁻ en rumen, intermediario del proceso de reducción del NO₃⁻ a NH₄⁺. El NO₂⁻ se absorbe por las paredes del rumen hasta el torrente sanguíneo donde se une al hierro ferroso (Fe²⁺) y lo transforma en hierro férrico (Fe³⁺), generando el cambio de hemoglobina a MetHb, la cual es incapaz de transportar oxígeno a los tejidos (Ozmen et al., 2005). En este estudio, los niveles de MetHb no presentaron variaciones al incluir NO₃⁻ en la dieta (Tabla 2). Los resultados concuerdan con otros estudios donde también encontraron que la alimentación con NO₃⁻ no generó un incremento en la MetHb (Li et al., 2012; van

Zijderveld et al., 2010). El mayor valor de MetHb fue de 4.95%, el cual fue encontrado en animales que consumieron la dieta con NL. Los rumiantes presentan signos clínicos de metahemoglobinemia cuando alcanzan valores del 30 al 40% de MetHb (Bruning-Fann y Kaneene 1993). En este estudio los valores de MetHb estuvieron por debajo de estos niveles. Un suministro gradual de NO_3^- y un adecuado periodo de adaptación permite a los rumiantes hacer frente a niveles más altos de NO_3^- en sus dietas (Lee et al. 2015; van Zijderveld et al. 2010). En el presente estudio, se incluyó un periodo de adaptación de 30 días. Dicho proceso ayuda a disminuir el riesgo de toxicidad, ya que, permite el aumento de la población de bacterias reductoras de NO_3^- en rumen y por tanto se incrementa la capacidad de reducir NO_2^- a NH_4^+ (Allison y Reddy 1984), lo que conduce a un menor flujo de NO_2^- desde el rumen al torrente sanguíneo y por lo tanto reduce la formación de MetHb en sangre. Debido a que en este estudio no se presentaron niveles tóxicos de MetHb, podría decirse que el proceso de adaptación fue apropiado, disminuyendo así el riesgo de intoxicación por el incremento en el consumo de NO_3^- .

Consumo y digestibilidad aparente

Los animales que recibieron el tratamiento NP presentaron una menor ingestión de suplemento (Tabla 3). El menor consumo con este tratamiento puede ser atribuido a los materiales empleados en el proceso de protección o encapsulación del NO_3^- ; aunque se utilizaron compuestos sin olor y sabor como el CMC y el PVP, estos presentan un alto grado de viscosidad que al parecer no fue agradable para los animales al momento de consumirlo. Aunque, durante la oferta del alimento se trató de estimular el consumo con la adición de melaza en el concentrado, los novillos con la dieta de NP dejaron de ingerir en promedio el 20% de la MS ofrecida en el concentrado. En otros estudios se utilizaron métodos de encapsulación que al parecer favorecieron el consumo, al mejorar las propiedades organolépticas del NO_3^- (El-Zaiat et al. 2014; Lee et al. 2015), lo que puede explicar las diferencias encontradas en los resultados. Al igual que en estudios anteriores, la inclusión de NL no afectó el consumo de MS, Newbold et al. (2014) utilizando 2.2% de NO_3^- en la dieta, no encontraron diferencias en el consumo de MS de

novillos cruzados; Velazco et al. (2014) tampoco encontraron diferencias en el consumo de MS al alimentar novillos Angus, con una dieta que contenía 2.5% de NO_3^- . La menor digestibilidad observada puede atribuirse al método de protección del NO_3^- , ya que, el CMC utilizado en el proceso de protección es un polisacárido de alta viscosidad resistente a la fermentación microbiana (FDA 2004), lo que pudo hacer más difícil el proceso de liberación del NO_3^- haciéndolo menos disponible para la reducción hasta NH_4^+ y limitando la disponibilidad de nitrógeno para los microorganismos del rumen. Al parecer, el NO_3^- se mantuvo adherido al material utilizado para la protección durante todo el tracto digestivo hasta ser excretado en las heces, lo que, resultó en un mayor contenido de N en las heces de los animales bajo el tratamiento de NP.

Aunque muy pocos estudios han analizado los efectos del NO_3^- sobre la digestibilidad de los nutrientes, Nolan et al. (2010) no reportaron cambios en la digestibilidad en las dietas con NO_3^- , mientras que Lee et al. (2015b), reportaron un incremento en la digestibilidad del almidón a lo largo del tracto digestivo gracias a una mejor sincronización entre los carbohidratos y la liberación lenta del N usando dietas con NO_3^- encapsulados.

Balance de nitrógeno

Los animales que consumieron la dieta con NP presentaron una disminución en el consumo de N del 18% y un incremento en la excreción de N fecal del 16% con respecto al control (Tabla 5); como consecuencia se retuvo el 33.5% del N consumido. Este resultado concuerda con la menor ingesta de suplemento (Tabla 3) por parte de los novillos que se encontraban bajo este tratamiento. Contrario a los hallazgos reportados por Lee y col. (2015b), donde no se obtuvieron diferencias en la excreción fecal de N ni en la retención de este cuando determinaron la utilización y pérdidas de N con diferentes niveles de NO_3^- encapsulado (1, 2 y 3% de la MS) en novillos de carne.

La excreción urinaria de N fue menor en el tratamiento NP. Teniendo en cuenta que la excreción de N a través de la orina es impulsada principalmente por el aumento en la ingestión de N (Van Soest 1994; Marini y Van Amburg 2003) y es particularmente sensible al N degradable en rumen presente en la dieta (Holder et al., 2015), es probable

que el grado de protección logrado en el tratamiento NP haya reducido la solubilidad de los NO_3^- en el rumen y cambiado la ruta de eliminación a través de las heces.

La dieta con NL no presentó diferencias en el balance de N en comparación con el control (Tabla 5). Li et al. (2012) tampoco encontraron diferencias en las pérdidas de N en heces y orina, y en el N retenido en ovejas alimentadas con una dieta suplementada con NO_3^- . En la literatura se han reportado diferentes porcentajes de retención de N. Lee et al. (2015b) obtuvieron retenciones entre el 16 y el 21% en novillas de carne, Holder et al. (2015) entre 20 y 24% en novillos Holstein, y el más cercano a lo reportado en este estudio fue Bourg et al. (2012) quienes encontraron entre 37 y 45 % de N retenido en novillos Angus. Las diferencias obtenidas en estos estudios pueden ser explicadas por el método utilizado para el balance de nitrógeno que generalmente tiende a sobrestimar la cantidad de N retenido. Es así como, pérdidas de N por recolección incompleta de orina o heces, volatilización de N como amoníaco y pérdidas de escamas de tejido se computarán como N retenido con este método. Por otro lado, la raza del animal y el tipo de dieta genera cambios importantes en estos valores (Van Kempen et al., 2003; Holder et al. 2015). Independientemente de las dietas experimentales, no hubo balance de N negativo, lo que indica que la ingesta de proteínas estaba por encima de los requerimientos para el mantenimiento de los animales.

Balance y eficiencia de utilización de la energía

El menor CEB en el tratamiento NP (Tabla 6) esta condicionado al menor consumo de suplemento (Tabla 3). La mayor pérdida de energía a través de las heces con NP es consistente con el aumento en la excreción fecal (Kg/animal/día) observada en este tratamiento (Tabla 4). Las pérdidas de energía a través de CH_4 son proporcionales a su volumen de producción durante el proceso fermentativo (Tabla 6). La energía perdida como CH_4 puede variar entre 2 y el 15% del CEB, dependiendo de la dieta ingerida por los animales (Harper et al. 1999; Johnson & Johnson 1995; Silveira et al. 2019). Si bien las pérdidas de energía en forma de CH_4 en los tratamientos NL y NP fueron 4.1 y 4.3%, respectivamente, puede observarse que el cálculo del CEM para los animales con estas

dietas fue diferente entre sí, siendo menor para NP. Esta diferencia en el cálculo del CEM se debió a la mayor pérdida de energía en las heces que se presentó con NP en comparación con NL. Debido a que la calidad de la dieta puede influir significativamente en la pérdida de energía en las heces (Chaokaur et al. 2015), es posible que, aunque las dietas fueron formuladas isoenergéticas e isoproteicas, el porcentaje de inclusión de las materias primas haya influido de forma diferente en la excreción de la energía y demás nutrientes en el animal. Un 16.7% de NP dentro de la MS fue necesario para asegurar un aporte del 3% de NO_3^- en la dieta. Para lograr esta inclusión, se prescindió del salvado de trigo dentro de la formulación del tratamiento con NP pero se logró equiparar el aporte energético con los otros tratamientos ofrecidos. Aunque las dietas presentaban el mismo valor energético, el NP afectó la digestibilidad del alimento.

No obstante, el CEM fue mayor con el tratamiento NL en comparación con NP, se obtuvo una ER similar para ambos. La ER del NL disminuyó gracias al incremento calórico de los animales con este tratamiento. Durante todo el periodo experimental 3 de los 9 animales evaluados con NL, presentaron un incremento significativo en el consumo de O_2 y producción de CO_2 ; lo cual condujo al aumento en la producción de calor (Tabla 6). Estos resultados fueron diferentes a los reportados por otros autores donde la producción de calor y el consumo de O_2 no fue afectada por el uso de dietas con NO_3^- (Lee et al. 2015a; Silveira et al. 2019; van Zijderveld et al. 2011). El aumento en el consumo de O_2 pudo haberse dado como consecuencia de un incremento en los picos de NO_2^- en rumen con NL. Cuando el NO_3^- es altamente disponible en rumen se reduce rápidamente a NO_2^- el cual pasa al torrente sanguíneo a través de las paredes ruminales y se une a los eritrocitos formando MetHb (Takahashi & Young 1991). Debido a que las muestras de sangre para la medición de MetHb en este estudio fueron tomadas una sola vez, 3 horas después del inicio del tratamiento, es viable que se hayan tenido niveles altos de MetHb que no hayan sido registrados. De haberse presentado un incremento en la concentración de MetHb, los novillos posiblemente respondieron produciendo más hemoglobina, lo que compensa la disminución de la capacidad de transporte de oxígeno

de la sangre y lleva a un aumento el consumo promedio de oxígeno por animal (Winter y Hokanson 1964).

La relación entre el CEM y el CED hallada fue de 0.87, 0.89 y 0.87 para control, NL y NP, respectivamente. Aunque estos valores son superiores a los recomendados por la (ARC 1980), (NRC 2000) y (CSIRO 2007) (0.81, 0.80 y 0.82), respectivamente, se tienen estudios como los de Chaokaur et al. (2015) y Posada et al., (2017), donde se reportan proporciones similares a las encontradas en este trabajo, indicando que esta relación puede ser muy dinámica entre los diferentes tipos de animales y dietas evaluadas. La metabolibilidad (CEM/CEB) y digestibilidad (CED/CEB) de la energía (ARC, 1980) medidas en los animales que consumieron la dieta con NP fueron menores que el control y NL, debido al bajo consumo de energía a través del alimento y al incremento en la pérdida energética en las heces con este tratamiento (Tabla 6). Por lo tanto, los tratamientos de NP y NL produjeron una disminución en la pérdida de energía por CH_4 , pero la inclusión de NP redujo considerablemente la digestibilidad y metabolibilidad del alimento.

Producción de metano entérico

El NO_3^- compite eficazmente con la metanogénesis como sumidero del H_2 generado durante la fermentación (Allison y Reddy 1984). Además, es energéticamente más favorable reducir el NO_3^- y el NO_2^- que el CO_2 , superando a los metanógenos por el H_2 (Ungerfeld y Kohn 2006). En este experimento la reducción en la producción de CH_4 (g/Kg Msc) fue de 27% para NL y 25% para NP con respecto al tratamiento control, valores muy cercanos a lo reportado en previos estudios con niveles comparables de NO_3^- . Hulshof et al. (2015) con una inclusión del 2.2% de NO_3^- libre en la dieta de novillos cruzados obtuvieron una disminución del 27% en la emisión de CH_4 . Newbold et al., (2014) también reportaron un 29% de disminución en la producción de CH_4 con el uso del 3% de NO_3^- en novillos Holstein. Lee et al. (2015b) alimentando hembras de carne con 3% de NO_3^- encapsulado reportaron una disminución del 18% en la producción de

CH₄, mientras que Silveira et al. (2019) obtuvieron una reducción del 11% con el uso de 2.5% de NO₃⁻ encapsulado en cabras.

La supresión en la producción de CH₄ con NL puede estar asociado con un aumento en la producción de CO₂ (Tabla 6), debido a que el H₂ y el CO₂ son productos finales de la fermentación de los carbohidratos y los principales precursores de la metanogénesis en el rumen (Hungate 1966). Con la disminución en la cantidad de H₂ disponibles para la metanogénesis, es razonable que la concentración de CH₄ disminuya, ya que es un claro indicio de que el NO₃⁻ esta actuando como aceptor de electrones en lugar del CO₂. Con el NP no se observó un incremento en la producción de CO₂, indicando que la cantidad de NO₃⁻ reducido no fue tan alta como con el NL. El incremento en el volumen de producción del CO₂ con NL también puede estar relacionado con un aumento en el intercambio gaseoso por un mayor consumo de O₂.

La disminución en la emisión de CH₄ entérico con el NP podría esta relacionada con el porcentaje de inclusión del CMC y el PVP en la protección del NO₃⁻. Esto debido a que el tratamiento con NP no presentó cambios en el CMSt (Tabla 3), ni un incremento significativo en la producción de CO₂ (Tabla 6) con respecto al NL, pero si se observó una disminución en la digestibilidad aparente de la PB y EB en la dieta (Tabla 4), lo que pudo haber afectado negativamente la formación de CH₄ en rumen.

El factor de partición o *Y_m*, es un elemento crítico que se utiliza para evaluar la extensión potencial del calentamiento global en los inventarios ganaderos nacionales e internacionales (IPCC 2006; Steinfeld et al. 2006). El *Y_m* encontrado en el presente estudio fue de 4.06% para NL y 4.33% para NP, en promedio un 37% menos que lo recomendado por el IPCC (2006) para el ganado vacuno en América latina (*Y_m* = 6.5%). Los resultados son consistentes con trabajos previos como Van Zijderveld y col. (2011) quienes reportaron una baja tasa de emisión de CH₄ en ganado alimentado con NO₃⁻. Sin embargo, la significativa reducción en la pérdida de energía por la producción de CH₄ no representó un cambio significativo en la ganancia de peso de los animales.

En conclusión, la suplementación con un 3% de NP en la dieta de novillos Brangus, redujo la producción de CH₄ entérico en un 23% en comparación con la dieta control, sin

presentar niveles tóxicos de MetHb en sangre. Sin embargo, el NP afectó negativamente el consumo de MS, retención de nitrógeno, digestibilidad y metabolicidad de la dieta.

Bibliografía

- Allison, M. J., & Reddy, C. A. (1984). *Adaptations of gastrointestinal bacteria in response to changes in dietary oxalate and nitrate*. Retrieved from <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US8605628>
- AOAC. (2005). Official Methods of Analysis of AOAC International. *Association of Official Analysis Chemists International*.
- ARC, (Agricultural Research Council). (1980). The Nutrient Requirements of Ruminant Livestock. *Commonwealth Agricultural Bureaux, Slough, UK*.
- Bourg, B., Tedeschi, L. O., & Tricarico, J. M. (2012). Effects of a slow-release urea product on performance and carcass characteristics of growing cattle fed steam flaked corn. *American Dairy Society Association*, 90(June), 3914–3923. <https://doi.org/10.2527/jas2011-4832>
- Brouwer, E. (1965). Report of sub-committee on constants and factors. In: Blaxter K, editor. Energy metabolism. London: Academic Press. 441–443. - Open Access Library. Retrieved January 30, 2020, from Report of sub-committee on constants and factors. In: K. L. Blaxter, editor, Energy metabolism. European Association for Animal Production. Publication 11. Academic Press, London. website: <http://www.oalib.com/references/11886866>
- Bruning-Fann, C. S., & Kaneene, J. B. (1993). The effects of nitrate, nitrite and N-nitroso compounds on human health: a review. *Veterinary and Human Toxicology*, 35(6), 521–538. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8303822>
- Chaokaur, A., Nishida, T., Phaowphaisal, I., & Sommart, K. (2015). Effects of feeding level on methane emissions and energy utilization of Brahman cattle in the tropics. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 199, 225–230.

<https://doi.org/10.1016/j.agee.2014.09.014>

- CSIRO, (Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization). (2007). *Nutrient Requirements of Domesticated Ruminants*. Collingwood, Victoria, Australia.: CSIRO Publishing.
- El-Zaiat, H. M., Araujo, R. C., Soltan, Y. A., Morsy, A. S., Louvandini, H., Pires, A. V., ... Abdalla, A. L. (2014). Encapsulated nitrate and cashew nut shell liquid on blood and rumen constituents, methane emission, and growth performance of lambs. *Journal of Animal Science*, 92(5), 2214–2224. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-7084>
- FDA. (2004). Guidance for Industry Guidance for Industry. *Federal Register*, 505(September), 79. <https://doi.org/10.1186/1477-7525-4-79>
- Harper, L. A., Denmead, O. T., Freney, J. R., & Byers, F. M. (1999). Direct measurements of methane emissions from grazing and feedlot cattle. *Journal of Animal Science*, 77(6), 1392–1401. <https://doi.org/10.2527/1999.7761392x>
- Holder, V. B., Tricarico, J. M., Kim, D. H., Kristensen, N. B., & Harmon, D. L. (2015). The effects of degradable nitrogen level and slow release urea on nitrogen balance and urea kinetics in Holstein steers. *Animal Feed Science and Technology*, 200(1), 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.12.009>
- Holdridge, L. R. (1967). Life zone ecology. *Tropical Science Center*, 206. <https://doi.org/Via 10.1046/j.1365-2699.1999.00329.x>
- Hulshof, R. B. A., Berndt, A., Gerrits, W. J. J., Zijderveld, S. M. Van, Newbold, J. R., & Perdok, H. B. (2015). *Dietary nitrate supplementation reduces methane emission in beef cattle fed*. (2008), 2317–2323. <https://doi.org/10.2527/jas2011-4209>
- Hungate, R. E. (1966). CHAPTER VI – Quantities of Carbohydrate Fermentation Products. In *The Rumen and its Microbes* (pp. 245–280). <https://doi.org/10.1016/B978-1-4832-3308-6.50009-7>
- Immig, I., Demeyer, D., Fiedler, D., Van Nevel, C., & Mbanzamihigo, L. (1996). Attempts to induce reductive acetogenesis into a sheep rumen. *Archiv Fur Tierernahrung*, 49(4), 363–370. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8988318>
- IPCC. (2006). Chapter 10 Emissions From Livestock and Manure Management. *Forestry*,

- 4, 87. Retrieved from <http://www.ipcc-nggip.iges.or.jp/public/2006gl/index.html>
- IPCC. (2017). IPCC Special Report on Climate Change, Desertification, Land Degradation, Sustainable Land Management, Food Security, and Greenhouse gas fluxes in Terrestrial Ecosystems. *Research Handbook on Climate Change and Agricultural Law*, 7, 13-15. <https://doi.org/10.4337/9781784710644>
- Johnson, K. a, & Johnson, D. E. (1995). Methane emissions from cattle Methane Emissions from Cattle. *J Anim Sci*, 73, 2483–2492. <https://doi.org/1995.7382483x>
- Lee, C., Araujo, R. C., Koenig, K. M., & Beauchemin, K. A. (2015a). Effects of encapsulated nitrate on enteric methane production and nitrogen and energy utilization in beef heifers. *Journal of Animal Science*, 93(5), 2391–2404. <https://doi.org/10.2527/jas.2014-8845>
- Lee, C., Araujo, R. C., Koenig, K. M., & Beauchemin, K. A. (2015b). Effects of feed consumption rate of beef cattle offered a diet supplemented with nitrate ad libitum or restrictively on potential toxicity of nitrate. *Journal of Animal Science*, 93(10), 4956–4966. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-9435>
- Li, L., Schoenhals, K. E., Brady, P. A., Estill, C. T., Perumbakkam, S., & Craig, A. M. (2012). Flaxseed supplementation decreases methanogenic gene abundance in the rumen of dairy cows. *Animal*, 6(11), 1784–1787. <https://doi.org/10.1017/S175173111200078X>
- Licitra, G., Hernandez, T. M., & Van Soest, P. J. (1996). Feedbunk management evaluation techniques. *Animal Feed Science Technology*, 57, 347–358.
- Marini J.C., & M.E., A. Van. (2003). Nitrogen metabolism and recycling in Holstein heifers. *Journal of Animal Science*, 81(2), 545–552. Retrieved from <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed6&NEWS=N&AN=12643500>
- Newbold, J. R., Zijderveld, S. M. Van, Hulshof, R. B. A., Fokkink, W. B., Leng, R. A., Terencio, P., ... Tecnologia, P. De. (2014). *The effect of incremental levels of dietary nitrate on methane emissions in Holstein steers and performance in Nelore bulls 1 study effects of dietary nitrate on enteric methane Experiments were conducted at*

- Michigan State*. 5032–5040. <https://doi.org/10.2527/jas2014-7677>
- Nolan, J. V., Hegarty, R. S., Hegarty, J., Godwin, I. R., & Woodgate, R. (2010). Effects of dietary nitrate on fermentation, methane production and digesta kinetics in sheep. *Animal Production Science*, 50(8), 801. <https://doi.org/10.1071/AN09211>
- NRC. (2016). *Nutrient Requirements of Beef Cattle: Eighth Revised Edition*. <https://doi.org/10.17226/19014>
- Olijhoek, D. W., Hellwing, A. L. F., Brask, M., Weisbjerg, M. R., Højberg, O., Larsen, M. K., ... Lund, P. (2016). Effect of dietary nitrate level on enteric methane production, hydrogen emission, rumen fermentation, and nutrient digestibility in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 99(8), 6191–6205. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10691>
- Ozmen, O., Mor, F., Sahinduran, S., & Unsal, A. (2005). Pathological and toxicological investigations of chronic nitrate poisoning in cattle. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 87(1), 99–106. <https://doi.org/10.1080/02772240400007104>
- Posada-Ochoa, S. L., Noguera, R. R., Rodríguez, N. M., Costa, A. L., & Reis, R. (2017). Indirect calorimetry to estimate energy requirements for growing and finishing Nellore bulls. *Journal of Integrative Agriculture*, 16(1), 151–161. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(16\)61443-0](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(16)61443-0)
- Sejian, V., Gaughan, J., Baumgard, L., & Prasad, C. (2015). Climate change impact on livestock: Adaptation and mitigation. In *Climate Change Impact on Livestock: Adaptation and Mitigation*. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2265-1>
- Silveira, R. F., Fernandes, M. H. M. R., Almeida, A. K., Araujo, R. C., Biagioli, B., Lima, A. R. C., ... Resende, K. T. (2019). Energy partition and nitrogen utilization by male goats fed encapsulated calcium nitrate as a replacement for soybean meal. *Animal Feed Science and Technology*, 248(December 2018), 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.12.008>
- Steinfeld, H., Gerber, P., Wassenaar, T., & Castel, V. (2006). *Livestock's long shadow: environmental issues and options*. Retrieved from https://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=1B9LQQkm_qMC&oi=fnd&pg=PR16&ots=LO1-bS9ltK&sig=JiFc3712_qI0hD-KwtmnMW8y8X8

- Takahashi, J., & Young, B. A. (1991). Prophylactic effect of l-cysteine on nitrate-induced alterations in respiratory exchange and metabolic rate in sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 35(1–2), 105–113. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(91\)90103-Y](https://doi.org/10.1016/0377-8401(91)90103-Y)
- Ungerfeld, E., & Kohn, R. (2006). The Role of Thermodynamics in the Control of Ruminant Fermentation. In *Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism and Impact of Nutrition on Gene Expression, Immunology and Stress* (pp. 55–85).
- van Kempen T. A. T. G., Baker D. H., van H. E. 2003. Nitrogen losses in metabolism trials. *Journal of Animal Science*, 81(10), 2649–2650. Retrieved from <https://doi.org/10.2527/2003.81102649x>
- Van Soest, P. J. (1994). *Nutritional ecology of the ruminant* (2nd Edn). Ithaca, NY,US: Cornell University.
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B., & Lewis, B. A. (1991). Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74(10), 3583–3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
- van Zijderveld, S. M., Gerrits, W. J. J., Apajalahti, J. A., Newbold, J. R., Dijkstra, J., Leng, R. A., & Perdok, H. B. (2010). Nitrate and sulfate: Effective alternative hydrogen sinks for mitigation of ruminal methane production in sheep. *Journal of Dairy Science*, 93(12), 5856–5866. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3281>
- Van Zijderveld, S. M., Gerrits, W. J. J., Dijkstra, J., Newbold, J. R., Hulshof, R. B. A., & Perdok, H. B. (2011). Persistency of methane mitigation by dietary nitrate supplementation in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 94(8), 4028–4038. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4236>
- Velazco, J. I., Cottle, D. J., & Hegarty, R. S. (2014). Methane emissions and feeding behaviour of feedlot cattle supplemented with nitrate or urea. *Animal Production Science*. <https://doi.org/10.1071/AN14345>
- Winter, A.J.; Hokanson, J. F. (1964). Effects of long-term feeding of nitrate, nitrite, or hydroxylamine on pregnant dairy heifers. *Am. J. Vet. Res*, 25, 353–361.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES

- Los resultados indican que en una dieta con kikuyo, el uso de nitrato protegido en una inclusión de NO_3^- del 3% de la MS, puede llegar a reducir en 53% la producción de CH_4 durante 48 horas *in vitro*. Sin embargo, el uso del jabón de soya como método de protección de NO_3^- debe ser considerado con mas detalle, debido a que su naturaleza lipídica puede presentar un alto potencial tóxico sobre los microorganismos ruminales, disminuyendo la materia seca degradada. Por lo tanto, se recomienda el estudio alternativas diferentes al jabón para la protección de nitratos y su evaluación *in vitro*.
- Con el uso de un método de protección elaborado con celulosa microcristalina (CMC) y polivinilpirrolidona (PVP), en una inclusión del NO_3^- del 3% de la MS, se puede lograr un nitrato protegido (NP) con un potencial de mitigación de CH_4 del 46% con respecto al control solo durante las primeras 12 h de incubación, sin afectar la degradación de la materia seca. Además, no se encontró una relación entre la reducción de CH_4 y el número de copias del gen *mcrA*, lo que implica que la inhibición del CH_4 no se vió afectada por los cambios en la población total de metanógenos. En tal sentido, es importante el estudio del efecto del NO_3^- sobre el metabolismo de las *Archeas* metanogénicas y bacterias celulolíticas en rumen para entender con mejor precisión las rutas de obtención de energía en presencia de NO_3^- .
- El uso de NP a nivel *in vivo* presentó un comportamiento diferente que el observado *in vitro*; ya que, la suplementación con un 3% de NO_3^- protegido en la dieta de novillos Brangus, redujo la producción de CH_4 entérico en un 23% en comparación con la dieta control, mientras que *in vitro* la reducción fue del 46%

solo durante las primeras 12 horas de incubación sin afectar la degradación de la materia seca.

- El tiempo de adaptación al NO_3^- empleado en el presente estudio fue efectivo, ya que, no se presentaron niveles tóxicos de MetHb en los animales que consumieron dietas con NO_3^- .
- A nivel *in vivo*, el uso del NP afectó el consumo de materia seca, debido a posibles cambios en la palatabilidad del alimento. Además, el tipo de protección empleado afectó negativamente la retención de nitrógeno, digestibilidad y metabolibilidad de la dieta. Se hace necesario el estudio de diferentes tipos de protección que generen el menor impacto sobre el consumo de dietas con NO_3^- , al tiempo que cumpla con su propósito de disminuir las emisiones de CH_4 entéricas de forma significativa generando un impacto positivo sobre la reducción en el calentamiento global y las emisiones de gases de efecto invernadero generadas por el sector ganadero a nivel mundial.