



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUTO DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

## **CAMPUS MONTECILLO**

POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

**“EVALUACIÓN DE EFECTOS BIOLÓGICOS Y MECANISMOS DE  
ACCIÓN DE LA UREA PROTEGIDA PARA RUMIANTES”**

**JOSÉ ALFREDO SÁNCHEZ MERAZ**

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2010

La presente tesis titulada: “**Evaluación de efectos biológicos y mecanismos de acción de la urea protegida para rumiantes**” realizada por el alumno: **José Alfredo Sánchez Meraz**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

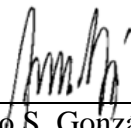
**DOCTOR EN CIENCIAS**

**RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD**

**GANADERÍA**

**CONSEJO PARTICULAR**

CONSEJERO



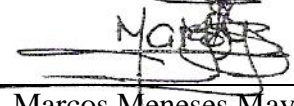
Dr. Sergio S. González Muñoz

Asesor



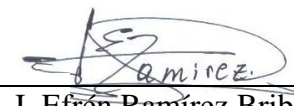
Dr. Juan M. Pinos Rodríguez

Asesor



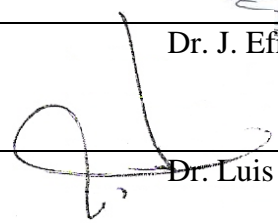
Dr. Marcos Meneses Mayo

Asesor



Dr. J. Efrén Ramírez Bribiesca

Asesor



Dr. Luis Alberto Miranda Romero

Montecillo, Texcoco, México, 27 de mayo de 2010

# EVALUACIÓN DE EFECTOS BIOLÓGICOS Y MECANISMOS DE ACCIÓN DE LA UREA PROTEGIDA PARA RUMIANTES

José Alfredo Sánchez Meraz, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2010

El efecto de urea (U) protegida con un polímero (UP) en variables microbiológicas y fermentativas se evaluó con raciones totalmente mezclada (RTM) para vacas lecheras, en tres experimentos. En el primero, mediante una fermentación *in vitro* de heno de alfalfa (HA), paja de avena (PA), ensilado de maíz (EM), rastrojo de maíz (RM) y sus FDN, se determinó cinética de liberación de U, concentración de N-NH<sub>3</sub>, desaparición de MS (DIVMS), volumen máximo (Vm) y tasa de producción de gas (R), y bacterias celulolíticas (BC). El diseño experimental fue completamente al azar y los datos se analizaron con REPEATED MEASURE y PROC MIXED. De 0 a 12 h la UP liberó paulatinamente la urea y disminuyó su hidrólisis a N-NH<sub>3</sub> (P≤0.01); y aumentó Vm, R, DIVMS del RM y del EM (P≤0.001), y BC (P≤0.05). En el experimento dos se evaluó *in vitro* Vm y R, y DIVMS de RTM, pH, AGV (mM), N-NH<sub>3</sub> (mM), y población de bacterias ruminales (BR; log<sub>10</sub> UFC). El diseño experimental fue similar al experimento uno, con 8 tratamientos y 3 repeticiones. La combinación de U y UP aumentó (P≤0.001) BR, Vm, R y DIVMS a las 24, 48 y 72 h; pero redujo la concentración de N-NH<sub>3</sub> y aumentó la de AGV (P≤0.001) a las 48 y 72 h. En el experimento tres se determinó el efecto de UP en variables ruminales. Se usaron cuatro novillos Holstein a los que se asignó los tratamientos (R): R1=RTM testigo, 2000 g pasta de soya (PS) animal<sup>-1</sup>; R2=120 g UP animal<sup>-1</sup> + 1210 g PS animal<sup>-1</sup>; R3=120 g U animal<sup>-1</sup> + 1210 g PS animal<sup>-1</sup>; R8=120 g UP animal<sup>-1</sup> +120 g U animal<sup>-1</sup> + energía balanceada + aminoácidos (AA) balanceados. El diseño experimental fue un cuadro latino 4x4 y los datos se analizaron con REPEATED MEASURE y la opción ante (1) (PROC MIXED). El tratamiento R8 disminuyó (P≤0.001) la concentración de N-NH<sub>3</sub>, cantidad total de sólidos, % de MS en rumen, el flujo a duodeno y excreción de MS y MO; e incrementó (P≤0.001) la concentración de AGV totales y la digestibilidad *in situ* de la MS.

Palabras clave: urea protegida, producción de gas, novillo y flujo duodenal.

# EVALUATION OF BIOLOGICAL EFFECTS AND MECHANISMS OF ACTION OF POLYMER-COATED UREA FOR RUMINANTS

José Alfredo Sánchez Meraz, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2010

Three experiments were performed to evaluate the effect of urea polymer-coated urea (PU) on microbiological and fermentative variables, in total mixed rations (TMR) for dairy cows. In experiment one, urea (U) kinetics release,  $\text{NH}_3\text{-N}$ , DM disappearance (IVDMD), gas maximum volume ( $V_m$ ) and production rate (R), and cellulolytic bacteria (CB), were determined by means of an *in vitro* fermentation of alfalfa hay (AH), oat straw (OS), corn silage (CS), corn stalk residues (CSR) and their NDF. Experimental design was completely randomized and data was analyzed with REPEATED MEASURE and PROC MIXED. From 0 to 12 h PU slowly released the urea and reduced hydrolysis to  $\text{NH}_3\text{-N}$  ( $P \leq 0.01$ ); besides, it increased  $V_m$ , R, IVDMD of CSR and CS ( $P \leq 0.01$ ), and CB ( $P \leq 0.05$ ). In experiment two an *in vitro* evaluation was performed for  $V_m$  and R; IVDMD for TMR; pH, VFA (mM),  $\text{NH}_3\text{-N}$  (mM) and ruminal bacteria (RB;  $\log_{10}$  CFU). The experimental design was similar to experiment one, with 8 treatments and 3 replications. The combination of U and PU increased RB,  $V_m$ , R and IVDMD at 24, 48 and 72 h by; but concentration of  $\text{NH}_3\text{-N}$  was reduced and that of VFA was increased ( $P \leq 0.01$ ), at 48 and 72 h. In experiment three, the effect of PU was determined on ruminal variables and the treatments (R) were assigned to four Holstein steers: R1 = control TMR, 2000 g soybean meal (SBM)  $\text{steer}^{-1}$ ; R2 = 120 g PU  $\text{steer}^{-1}$ +1210 g SBM  $\text{steer}^{-1}$ ; R3 = 120 g U  $\text{steer}^{-1}$ +1210 g SBM  $\text{steer}^{-1}$ ; R8 = 120 g PU  $\text{steer}^{-1}$ +120 g U  $\text{steer}^{-1}$  + balanced energy and amino acids. The experimental design was a 4 x 4 Latin square and data were analyzed with REPEATED MEASURE and PROC MIXED. Treatment R8 decreased ( $P \leq 0.01$ )  $\text{NH}_3\text{-N}$  concentration, total solids, ruminal DM, and DM and OM flow to duodenum, as well as increased ( $P \leq 0.01$ ) total VFA and *in situ* DM digestibility.

Key words: polymer-coated urea, Holstein steer, total mixed ration, flow to the duodenum

## AGRADECIMIENTOS

A יהוה (YHWH) por la vida que me ha brindado, así como la guía y dirección para caminar por las sendas de la vida, y por que es un Dios amoroso que me enseña y da sabiduría para mi propio beneficio (2 Timoteo 3:16, 17).

A CONACYT por el apoyo económico para realizar mis estudios de Doctorado.

Al Colegio de Postgraduados por la oportunidad brindada para realizar mis estudios de Doctorado.

A la empresa Alltech, S.A. de C.V. por donar el producto Optigen ® para desarrollar el presente proyecto intitulado: Evaluación de efectos biológicos y mecanismos de acción de la urea protegida para rumiantes.

Al Dr. Sergio S. González Muñoz por su apoyo, paciencia, amistad y sencillez con la que dirigió mi formación académica y por su calidad humana.

Al Dr. Juan Manuel Pinos Rodríguez por su amistad, apoyo y confianza que contribuyeron a mi formación académica y la realización del presente trabajo.

Al Dr. Luis Alberto Miranda Romero por su apoyo, disposición y facilidades otorgadas para realizar el trabajo de laboratorio en la Universidad Autónoma Chapingo.

A los Doctores Miguel Cervantes Ramírez, y Enrique G. Álvarez Almora por su apoyo, disposición y facilidades otorgadas para efectuar el trabajo de laboratorio en el Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California.

A los Doctores Efrén J. Ramírez Bribiesca, y Marcos Meneses Mayo, por su colaboración y apreciaciones críticas, serias y profesionales que contribuyeron a mejorar esta investigación.

A mis compañeros y amigos Oscar, Isaac, Martin, José Luis, por su apoyo y amistad.

## **DEDICATORIA**

A mis padres, con la mayor gratitud y amor por los esfuerzos realizados para que yo lograra terminar mis estudios de DOCTORADO, siendo para mi una de las mejores herencias.

A mi Sra. Madre Reina Meraz Balcazar un ser maravilloso que me ha dado su apoyo moral, cariño y comprensión y que ha guiado mi camino y estado junto a mí en los momentos más difíciles.

A mi Sr. Padre Serafin Sánchez Reyes que fue para mi un hombre grande y maravilloso y que siempre admire, por que guio mi vida con energía y basado en principios morales que han hecho que sea lo que soy.

A mis hermanos Edmundo, Mari y Miriam por su cariño y apoyo mostrado en todo momento.

A mi esposa Olga por su cariño, comprensión, y apoyo incondicional que me ha brindado en todo momento.

A mi hijo José Abiel por ser un motivo importante en mi vida.

A todos aquellos que han creído en mí.

## CONTENIDO

	Pag
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1. Planteamiento del problema	2
2. Objetivos	3
3. Hipótesis	4
4. Revisión de literatura	4
5. Literatura citada	13
<b>CAPÍTULO I. EFECTO DE UREA PROTEGIDA CON UN POLÍMERO EN VARIABLES DE CINÉTICA RUMINAL</b>	
1.1 Resumen	16
1.2 Abstract	17
1.3 Introducción	18
1.4 Materiales y métodos	19
1.4.1 Descripción de tratamientos	19
1.4.2 Procesamiento de muestras y análisis de laboratorio	20
1.4.3 Variables de respuesta, diseño experimental y modelo estadístico	22
1.5 Resultados y discusiones	23
1.5.1 Cinética de liberación de la urea y concentración de amonio	23
1.5.2 Digestibilidad y fermentación <i>in vitro</i> de MS y FDN en forrajes	25
1.6 Conclusiones	31
1.7 Literatura citada	32
<b>CAPÍTULO II. EFECTO DE UREA PROTEGIDA CON UN POLÍMERO EN LA DEGRADACIÓN Y VARIABLES DE LA FERMENTACIÓN <i>in vitro</i> DE DIETAS (RACIONES TOTALMENTE MEZCLADAS) PARA VACAS LECHERAS</b>	
2.1 Resumen	36
2.2 Abstract	37
2.3 Introducción	38
2.4 Materiales y métodos	38
2.4.1 Raciones totalmente mezcladas (RTM) y tratamientos	39

2.4.2	Obtención y almacenamiento de muestras	39
2.4.3	Procesamiento de muestras y análisis de laboratorio	42
2.4.4	Variables de respuesta, diseño experimental y modelo estadístico	43
2.5	Resultado y discusión	45
2.5.1	Ambiente ruminal	45
2.5.2	Digestibilidad y fermentación <i>in vitro</i> de MS de RTM para vacas lecheras	49
2.6	Conclusiones	52
2.7	Literatura citada	53

**CAPÍTULO III. EFECTO DE UREA PROTEGIDA CON UN POLIMERO EN DEGRADACION *in situ* e *in vivo*, TASA DE PASAJE Y VARIABLES RUMINALES DE DIETAS (RACIONES TOTALMENTE MEZCLADAS) PARA VACAS LECHERAS**

3.1	Resumen	58
3.2	Abstract	59
3.3	Introducción	60
3.4	Materiales y métodos	60
3.4.1	Animales, raciones totalmente mezcladas y alimentación	61
3.4.2	Recolección y almacenamiento de muestras	61
3.4.3	Procesamiento de muestras y análisis de laboratorio	62
	3.4.3.1 Alimento, quimo duodenal y heces	62
	3.4.3.2 Ambiente ruminal	65
	3.4.3.3 Vaciado del rumen	65
3.4.4	Variables de respuesta	65
3.4.5	Diseño experimental y modelo estadístico	66
3.5	Resultados y discusiones	67
3.5.1	Ambiente ruminal	67
3.5.2	Pruebas de digestibilidad	69
3.6	Conclusiones	75
3.7	Literatura citada	76



<b>CAPITULO IV. CONCLUSIONES GENERALES</b>	79
Anexo A	80
Anexo B	81

## ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

		Pag
Cuadro 1	Composición química de cuatro forrajes.	20
Cuadro 2	Composición del medio de cultivo para bacterias celulolíticas (BRC) por cada 100 mL.	21
Cuadro 3	Efecto de urea (U) y urea protegida con un polímero (UP) en los parámetros de cinética de producción de gas ( $V_m$ y R) por la fermentación <i>in vitro</i> de forrajes	25
Cuadro 4	Efecto de urea (U) y urea protegida con un polímero (UP), en los parámetros de cinética de producción de gas ( $V_m$ y R) por la fermentación <i>in vitro</i> de FDN de forrajes.	27
Cuadro 5	Población de bacterias celulolíticas en la fermentación <i>in vitro</i> de heno de alfalfa (HA) y ensilado de maíz (EM) con o sin la adición de urea (U) o urea protegida con un polímero (UP).	28
Cuadro 6	Desaparición <i>in vitro</i> de forrajes sin y con la adición de urea (U) o urea protegida con un polímero (UP) a 72 h de incubación.	29
Cuadro 7	Desaparición <i>in vitro</i> de la fibra detergente neutro (DFDN) de forrajes con la adición de urea (U) o urea protegida con un polímero (UP) a 72 h de incubación.	30
Cuadro 8	Ingredientes de las raciones totalmente mezcladas (RTM), como % de materia seca total y formulada para vacas lecheras de 685 kg PV y una producción de 50 kg de leche $d^{-1}$ .	40
Cuadro 9	Composición de nutrimentos (%) de la RTM en base seca.	41
Cuadro 10	Composición de medio de cultivo para el conteo de bacterias ruminales viables, por cada 100 mL de medio.	43
Cuadro 11	Efecto de urea y urea protegida con un polímero en el crecimiento de la	45

población de bacterias ruminales *in vitro* ( $\log_{10}$  UFC).

Cuadro 12	Efecto <i>in vitro</i> de urea y urea protegida con un polímero en la concentración de ácidos grasos volátiles total (mM) durante 72 h de incubación de RTM, formuladas para vacas lecheras.	46
Cuadro 13	Efecto <i>in vitro</i> de urea y urea protegida con un polímero en la concentración de ácidos grasos volátiles (mM) durante 72 h de incubación de RTM, formuladas para vacas lecheras.	47
Cuadro 14	Efecto <i>in vitro</i> de urea y urea protegida con un polímero en la concentración de N-NH <sub>3</sub> (mMol dL <sup>-1</sup> ) durante 72 h de incubación de RTM, formuladas para vacas lecheras.	48
Cuadro 15	Parámetros de cinética de producción de gas (Vm, y R) por la fermentación <i>in vitro</i> de ocho RTM, formuladas para vacas lecheras.	49
Cuadro 16	Energía metabolizable y masa microbiana en RTM, formuladas para vacas lecheras.	50
Cuadro 17	Efecto de urea protegida con un polímero en la desaparición <i>in vitro</i> de materia seca en RTM, formuladas para vacas lecheras.	51
Cuadro 18	Ingredientes de las RTM como % del total de MS correspondiente a vacas lecheras de 685 kg PV y una producción de 50 kg de leche d <sup>-1</sup> .	63
Cuadro 19	Composición de nutrimentos (%) de la RTM en base seca.	64
Cuadro 20	Efecto de la urea y urea protegida con un polímero en las características del ambiente ruminal en novillos Holstein.	68
Cuadro 21	Efecto de urea y urea protegida con un polímero en la ingesta, tamaño de rumen y tasa de pasaje de la FDN; determinadas por la evacuación del rumen en novillos Holstein.	69
Cuadro 22	Consumo de nutrientes en novillos Holstein antes y después de proporcionar	70

un suplemento de urea y urea protegida con un polímero.

Cuadro 23	Flujo de nutrientes a duodeno de novillos Holstein antes y después de proporcionar un suplemento de urea y urea protegida con un polímero.	71
Cuadro 24	Efecto de la urea (U o UP) en la desaparición (%) <i>in situ</i> de materia seca (DISMS), durante 48 h de incubación.	72
Cuadro 25	Digestión de nutrientes en rumen y en el tubo digestivo posterior en novillos Holstein antes y después de proporcionar un suplemento de urea y urea protegida con un polímero.	73
Cuadro 26	Digestión total (%) y excreción fecal ( $\text{g d}^{-1}$ ) de nutrientes en novillos Holstein antes y después de proporcionar un suplemento de urea y urea protegida con un polímero.	74
Figura 1	Concentración de urea y urea protegida con un polímero disuelta en agua, solución mineral reducida y líquido ruminal clarificado.	23
Figura 2	Concentración de $\text{N-NH}_3$ proveniente de la hidrólisis de urea y urea protegida con polímero, en líquido ruminal (LR) fresco y líquido ruminal clarificado (LRC) [Datos diferentes ( $P \leq 0.01$ ) entre LR vs. LRC].	24
Figura 3	Concentración de $\text{N-NH}_3$ en rumen: R1 = RTM testigo ( $2000 \text{ g soya animal}^{-1}$ ); R2 = $120 \text{ g UP animal}^{-1}$ (urea protegida con un polímero) + $1210 \text{ g soya animal}^{-1}$ ; R3 = $120 \text{ U animal}^{-1}$ (urea) + $1210 \text{ g soya animal}^{-1}$ y R8 = $120 \text{ g de UP animal}^{-1}$ + $120 \text{ g de U animal}^{-1}$ + energía balanceada + AA balanceados.	67

## INTRODUCCIÓN GENERAL

La producción de leche forma parte de las estrategias nacionales de seguridad alimentaria porque es un alimento completo e indispensable en la alimentación humana en especial para niños (Castro, 2003). En México la producción de leche se realiza en una amplia diversidad de condiciones ecológicas, en 2007 la producción nacional superó los 10 mil millones de L (SAGARPA-ASERCA, 2008). Dicha producción es insuficiente para cubrir las necesidades de la población y de la industria de lácteos (15.5 mil millones de L). En consecuencia, en el 2007 México importó el 34 % de su consumo aparente de leche en polvo (FAO, 2007).

La industria lechera busca alternativas nutricionales para vacas lecheras que aumenten la eficiencia productiva de los animales, sin que tengan efectos secundarios en la salud humana, animal, ambiente, o que incrementen los costos de producción (Guo, 2004). Uno de los puntos clave para las investigaciones en la nutrición de vacas lecheras es el tipo y proporción de proteína en la dieta, por ser éste un ingrediente caro (Melgoza *et al.*, 2007). El exceso o deficiencia de proteína en la dieta afecta el comportamiento productivo de las vacas lecheras, haciendo ineficientes los procesos digestivos, metabólicos y de síntesis de leche (Butler 1998; Galvis *et al.*, 2002; Guo, 2004).

Los microorganismos del rumen pueden asimilar para su crecimiento tanto nitrógeno (N) proteínico (NP) como N no proteínico (NNP), lo que resulta en la síntesis de proteína microbiana, la cual está disponible para el rumiante cuando pasa al intestino. En consecuencia, es factible adicionar fuentes de N económicas como la urea, pero su inclusión en la dieta está limitada (1 a 3 %, Chalupa, 1968) debido a su rápida hidrólisis a N-NH<sub>3</sub> en el rumen, el cual en exceso: reduce la eficiencia energética del animal a causa del gasto energético requerido para su excreción por orina en forma de urea, puede afectar la reproducción animal al disminuir el pH uterino, y en casos graves puede provocar la muerte del rumiante en menos de 4 h (Lobley *et al.*, 2000).

Por consiguiente, se han realizado investigaciones orientadas a inhibir la actividad ureásica de la población microbiana del rumen (Ludden *et al.*, 2000), sincronizar la disponibilidad de N-NH<sub>3</sub> con la degradación de los carbohidratos (Owens *et al.*, 1980; Currier *et al.*, 2004; Huntington *et al.*, 2006), y controlar la disponibilidad de la urea al medio ruminal (Oltjen *et al.*, 1968; Currier *et al.*, 2004; Huntington *et al.*, 2006), con resultados variables. La encapsulación o revestimiento de la urea con polímeros sintéticos biodegradables, resistentes a la temperatura, pH y acción de

los microorganismos ruminales (Garrett *et al.*, 2005; Galo *et al.*, 2003), puede ser una alternativa viable para este último objetivo. Este polímero permite la difusión paulatina al fluido ruminal del 93 % de su nitrógeno en forma de urea (Alltech, 2004)

En este contexto, se plantea la posibilidad de utilizar la urea protegida con un polímero en la alimentación de vacas lecheras. No obstante, se requiere un mayor conocimiento del efecto en variables del rumen, en la fermentación y la utilización de nutrientes en dietas formuladas para vacas lecheras. Por tanto, en el presente estudio se evaluó el efecto de la urea protegida con un polímero en tres experimentos. En el primero se evaluó la cinética de liberación del N-NH<sub>3</sub>, variables microbiológicas, degradación *in vitro* de FDN y fermentación *in vitro* de heno de alfalfa, paja de avena, ensilado de maíz y rastrojo de maíz. En el segundo experimento se determinó el efecto de sustituir parte del NP en dietas formuladas para vacas lecheras por urea protegida con un polímero en variables de fermentación y desaparición *in vitro* de MS, energía metabolizable y en variables de líquido ruminal (AGV, N-NH<sub>3</sub>, crecimiento de bacterias celulolíticas, masa microbiana). En el tercer experimento se evaluó el efecto de la urea protegida con un polímero sintético en variables del rumen, fermentación *in vitro*, y utilización de nutrientes en dietas formuladas para vacas lecheras.

## **1. Planteamiento del problema**

A partir de la década de 1950 se inició la utilización de urea en la alimentación de rumiantes (Reid, 1953), ya que para ese entonces se conocía la capacidad de los microorganismos ruminales para asimilar el NNP en la síntesis de proteína microbiana (Stem *et al.*, 1994) la cual representa la principal fuente de proteína para el rumiante. De esta manera, Virtaner (1966) pudo señalar que las vacas lecheras biotransforman NNP en proteína láctea y, por tal razón, es factible incluir fuentes de NNP más económicas en la dieta de vacas lecheras. No obstante, la urea es hidrolizada rápidamente (5 min) a N-NH<sub>3</sub> (Bartley *et al.*, 1981) por la acción de la ureasa microbiana del rumen, cuya disponibilidad excede a la de los carbohidratos solubles que provienen de la degradación de polisacáridos, para la síntesis de proteína microbiana. Además, un exceso de N-NH<sub>3</sub> puede saturar el ciclo de la urea provocando trastornos metabólicos, fisiológicos y en casos extremos la muerte del rumiante (Lobley *et al.*, 2000; Abduon *et al.*, 2007).

Por tanto, es necesario desarrollar sistemas que lleven a disminuir la hidrólisis de la urea en el rumen y, al mismo tiempo, incrementar la síntesis de proteína microbiana mediante el N-NH<sub>3</sub> liberado; además, estos procesos no deben causar daño alguno a los rumiantes alimentados con dietas formuladas con ureas. En consecuencia, en diversos estudios se analizó la inhibición de la actividad de la ureasa microbiana (Ludden *et al.*, 2000), el control de la tasa de liberación de la urea al medio ruminal (Oltjen *et al.*, 1968; Currier *et al.*, 2004; Huntington *et al.*, 2006), así como la sincronización de la disponibilidad de N-NH<sub>3</sub> con la degradación de los carbohidratos (Owens *et al.*, 1980; Currier *et al.*, 2004; Huntington *et al.*, 2006). Hasta ahora los resultados de dichos experimentos son diversos y, a veces, contradictorios, debido principalmente a las diferencias de los métodos experimentales. En este sentido, la industria farmacéutica ha desarrollado revestimientos peliculares basados en petróleo (Garrett *et al.*, 2005) o polímeros (Tedeschi *et al.*, 2002; Galo *et al.*, 2003), que pueden resistir la degradación ruminal y que permiten la liberación lenta y controlada, en el tiempo, en el rumen de los bovinos (Alltech, 2004). Sin embargo la investigación realizada en relación a estas sustancias ha sido insuficiente en ganado lechero, lo que representa una importante área de estudios en el campo de los aditivos alimentarios en rumiantes con alto potencial productivo.

## **2. Objetivos**

1. Evaluar el efecto de un polímero de revestimiento en la liberación controlada de urea.
2. Evaluar el efecto de la liberación controlada de la urea en la cinética de liberación del N-NH<sub>3</sub>, variables microbiológicas y fermentativas del heno de alfalfa, paja de avena, ensilado de maíz y rastrojo de maíz; y de sus respectivas FDN.
3. Evaluar el efecto de sustituir en raciones totalmente mezcladas formuladas para vacas lecheras, parte del NP por urea protegida o no con un polímero en variables fermentativas, ruminales y microbiológicas.
4. Evaluar los cambios provocados en la población microbiana, productos de la fermentación ruminal, la desaparición de nutrientes a través del tubo digestivo a partir del flujo y excreción de nutrientes debido al efecto de sustituir parte del NP por urea protegida o no con un polímero, en raciones totalmente mezcladas formuladas para vacas lecheras en novillos Holstein.

### **3. Hipótesis**

- 1) La liberación controlada de urea, debido al efecto de un polímero de revestimiento, provoca cambios en la hidrólisis de la urea en  $N-NH_3$ , variables microbiológicas y fermentativas de heno de alfalfa, paja de avena, ensilado de maíz y rastrojo de maíz; y sus respectivas FDN.
- 2) La sustitución en raciones totalmente mezcladas formuladas para vacas lecheras del N proteínico por urea protegida o no con un polímero, no afecta negativamente las variables fermentativas, ruminales y microbiológicas *in vitro*.
- 3) La sustitución en raciones totalmente mezcladas formuladas para vacas lecheras del NP por urea protegida o no con un polímero provoca cambios en la población de microorganismos ruminales o en su metabolismo alterando la concentración de productos de fermentación y digestibilidad de nutrientes, lo cual puede cambiar la fuente nitrogenada en raciones para vacas lecheras.

### **4. Revisión de literatura**

#### **4.1 Producción de leche en México**

En México, la producción de leche bovina se realiza en una amplia diversidad de condiciones ecológicas y sistemas de producción que presentan marcados contrastes en infraestructura, tecnificación, potencial genético, sanidad y manejo de los animales. No obstante, las explotaciones de leche se han clasificado en sistemas de producción especializada, doble propósito y familiar (Mellado, 1994; SAGARPA-ASERCA, 2004).

De 1998 a 2007 la producción de leche bovina en México mostró una tasa de crecimiento anual de 2.8 %, impulsada por el incremento de los precios internacionales de la leche en polvo, el tipo de cambio peso-dólar, la política gubernamental, el precio de granos forrajeros, y la consolidación de productores y empresas lecheras. (Castro, 2003; SAGARPA-ASERCA, 2005).



Aun cuando México de 1998 a 2005 incrementó su aportación de leche mundial en 0.6 % (FAO, 2007) y la producción de leche bovina fue 10 mil 200 millones de L en el 2007 (SAGARPA-ASERCA, 2008), lo cual es un volumen insuficiente para cubrir las necesidades de la población y de la industria de lácteos. En consecuencia, en el 2007 México importó 150 mil t de leche en polvo, representando 34 % de su consumo aparente (FAO, 2007).

#### **4.2 Factores que afectan la producción de leche**

Los factores que afectan la producción de leche bovina se clasifican en dos grupos (Mellado, 1994): 1) fisiológicos (genética, edad, gestación, periodo seco, número de lactancias, entre otros); 2) ambientales (alimentación, época de parto, enfermedades, factores climáticos, y ordeño). Los resultados de las investigaciones en mejoramiento genético de vacas lecheras ha estimulado el incremento de la producción leche vaca<sup>-1</sup> lactancia<sup>-1</sup>, y con ello, sus requerimientos nutricionales (proteína, energía, vitaminas y minerales). Esto ha llevado al desarrollo de conceptos más precisos para enfrentar la nutrición de las vacas (Ferguson y Chalupa, 1989; Lawlor, 2007). Además, la nutrición se ha consolidado como un factor determinante en la eficiencia y rentabilidad de las empresas lecheras, debido a que condiciona la producción, reproducción y salud de las vacas lecheras (Galvis *et al.*, 2002; Guo, 2004).

Las recientes investigaciones en nutrición de vacas lecheras (Throne *et al.*, 2009; Weekes *et al.*, 2006, Korhonen *et al.*, 2002; Schingoethe, 1996; Boguhn *et al.*, 2006; Pettit *et al.*; 2004) se han enfocado en aspectos como: manipulación de dietas para aumentar la cantidad y calidad de proteína y energía que llega a intestino delgado (proteína o aminoácidos protegidos, NNP, aditivos, grasa protegida); y en la selección y modificación estructural de la fibra del forraje (mediante enzimas, tratamientos químicos, entre otros) para aumentar su digestibilidad e incrementar la síntesis de proteína microbiana. No obstante, su aplicación está siendo limitada por la composición financiera en la producción de un litro de leche, del cual 60 % corresponde alimentación y 40% son insumos (energía eléctrica, mano de obra, combustibles, medicamentos, e intereses financieros). Además, debe considerarse que la proteína es el ingrediente más costoso en la alimentación (Ipharraguerre y Clark, 2003), y tanto su exceso como su deficiencia en la dieta repercuten negativamente en el comportamiento productivo de las vacas lecheras, haciendo ineficientes los procesos digestivos, metabólicos y de síntesis de leche (Butler 1998; Galvis *et al.*, 2002; Guo, 2004).

### **4.3 Fuentes de nutrientes nitrogenados para vacas lecheras**

El nitrógeno forma parte de los aminoácidos (AA) que componen las proteínas y compuestos no proteínicos requeridos por los organismos. Las proteínas son macromoléculas que difieren en tamaño, estructura, solubilidad y contenido de AA (diferente número y combinación de 20 AA). Se encuentran presentes en todas las células (vegetal y animal) y en todos sus componentes; además exhiben una gran diversidad de funciones biológicas (Nelson y Cox 2000, NRC, 2001).

El nitrógeno requerido por vacas lecheras para cubrir sus necesidades nutricionales proviene de los compuestos nitrogenados de la dieta, la proteína microbiana (PM), y el N derivado de secreciones endógenas. El N de la dieta incluye componentes proteínicos (proteína, péptidos, y AA libres) y no proteínicos (NNP; ácidos nucleicos, aminos, nitratos, nitritos, urea, y AA no proteínicos). La proteína contenida en la dieta se clasifica de acuerdo a su degradación ruminal en: proteína degradable en rumen (PDR) y proteína no degradable en rumen (PNDR; NRC, 2001; Blethen, 1990). La degradación de PDR proporciona componentes esenciales como amoníaco, AA, péptidos, azufre y energía (proteólisis, desaminación y descarboxilación) para la síntesis de PM (Bergen y Owens 1985, Atasoglu, 1998, 2001). En cambio la PNDR, así como PM y secreciones endógenas, están disponibles para la vaca en su paso a través del abomaso e intestino delgado, lugar donde son degradados en AA libres, péptidos y dipéptidos, para después ser absorbidos y asimilados por los tejidos del animal para cubrir los requerimientos de proteína para las funciones de mantenimiento, reproducción y lactancia (Ipharraguerre y Clark, 2005; Wattiaux, 2003).

#### **Fraccionamiento de la proteína**

La proteína contenida en dietas balanceadas se evalúa cuantificando su contenido de N (proteínico y NNP) y el valor obtenido se multiplica por 6.25; sin embargo, esto puede conducir a errores en la formulación de las dietas porque el cálculo de la proteína total no indica su disponibilidad para el rumiante. En este contexto, en rumiantes se utiliza el valor nutritivo de la proteína de un ingrediente para conocer su cantidad y dinámica de degradación de las fracciones PDR (responsable de la síntesis de proteína y concentración de N-NH<sub>3</sub> en rumen) y PNDR (fuente de dipéptidos y AA libres en duodeno) en rumen (NRC, 2001; Schwab *et al.*, 2003).

Actualmente para calcular las fracciones PDR y PNDR se usa el métodos *in situ* (NRC, 2001) e *in vitro* (Russell *et al.*, 1992). Con el primer método se determina PDR y PNDR mediante la incubación de muestras de alimento contenidas en bolsas de nylon o dacrón en el rumen a diferentes intervalos de tiempo. Con el segundo método, propuesto por el sistema de predicción CNCPS (The Cornell Net Carbohydrate and Protein System) desarrollado por la Universidad de Cornell, se divide la proteína en tres fracciones: A<sub>1</sub>, B y C, y tres sub-fracciones de B (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>) descritas a continuación.

**Fracción A:** compuestos nitrogenados que se degradan rápidamente en el rumen e incluye NNP (urea), AA libres, amidas, aminas, nitratos, nitritos, bases nitrogenadas, péptidos pequeños que son convertidos rápidamente en N-NH<sub>3</sub>; su tasa de pasaje es diez veces mayor que la tasa de pasaje de los sólidos (NRC, 1985).

**Fracción B:** proteína verdadera con tasa de degradación similar a la tasa de pasaje (NRC, 1985) y esta dividida en tres sub-fracciones (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> y B<sub>3</sub>) de acuerdo con sus inherentes tasas de degradación ruminal (Van Soest *et al.*, 1981; Krishnamoorthy *et al.*, 1982).

1. Sub-fracción B<sub>1</sub>: proteína degradable en rumen, soluble en solución fosfato-borato y con concentraciones altas de Lis, Arg, Asp, y Gli (Krishnamoorthy *et al.*, 1982; Sniffen *et al.*, 1992).
2. Sub-fracción B<sub>2</sub>: proteína insoluble en detergente neutro, pero soluble en detergente ácido, con tasa intermedia de degradación ruminal, su destino final depende de la tasa de pasaje y digestión; la proteína (gluteína) se encuentra en granos pequeños (Van Soest *et al.*, 1981; Sniffen *et al.*, 1992).
3. Sub-fracción B<sub>3</sub>: proteína insoluble en detergente neutro pero soluble en detergente ácido, se degrada lentamente en rumen debido a su asociación con la pared celular que le permite escapar de la degradación (Krishnamoorthy *et al.*, 1982; Sniffen *et al.*, 1992).

**Fracción C:** proteína no disponible, insoluble en detergente ácido, su degradación en rumen es muy lenta debido a su fuerte asociación con lignina producto de la reacción Maillard o forma complejos de proteína-taninos que le confiere alta resistencia a la degradación microbiana o enzimática (Krishnamoorthy *et al.*, 1982; Sniffen *et al.*, 1992).

#### 4.4 Metabolismo de nutrientes nitrogenados en rumen

El metabolismo de nutrientes nitrogenados en rumen se divide en dos fases: 1) degradación de proteínas y NNP del alimento que proveen nitrógeno a bacterias ruminales; 2) síntesis de proteína microbiana que varía entre 400 y 1,500 g d<sup>-1</sup> de acuerdo con la digestibilidad de la dieta (Wattiux, 2003). La degradación ruminal de la proteína involucra varios procesos microbianos que incluyen hidrólisis de proteína, degradación de dipéptidos y péptidos, desaminación de AA y fermentación de hidratos carbonados (Cotta, 1986; Bach, 2005).

El proceso de degradación de la proteína inicia con la adherencia de bacterias ruminales en la partícula del alimento (Brock *et al.*, 1982), donde las bacterias ruminales con actividad proteolítica (*Prevotella ruminicola*, *Prevotella bryantii*, *Butyrivibrio fibrisolvens*) degradan la proteína en AA, péptidos y dipéptidos (Wallace *et al.*, 1997). La extensión y grado de degradación de la proteína dependerá de la actividad proteolítica de enzimas microbianas, tipo de proteína en la dieta (PDR y PNDR), y tasa de pasaje del alimento (NRC, 2001; Abdoun *et al.*, 2007).

Los AA, péptidos y dipéptidos derivados de la actividad proteolítica son transportados al citoplasma bacteriano, donde péptidos y dipéptidos pueden ser degradados por acción de peptidasas hasta AA, los cuales participarían en la síntesis de proteína microbiana o serían desaminados para formar AGV, CO<sub>2</sub> y N-NH<sub>3</sub> (Tamminga, 1979). La utilización de AA, péptidos y dipéptidos en el citoplasma bacteriano dependerá de la disponibilidad de energía (hidratos de carbonados). Si hay suficiente energía disponible los AA son transaminados para síntesis de proteína microbiana (20 g de proteína microbiana por 100 g de MOF en rumen; Wattiux, 2003). Sin embargo, con limitación de energía los AA son desaminados y su esqueleto carbonado es utilizado para la fermentación de AGV. Cuando las bacterias ruminales carecen de transportadores para trasladar AA desde su citoplasma hacia el medio extracelular, el exceso de AA absorbidos son excretados en forma de N-NH<sub>3</sub> el cual es aprovechado por otras bacterias ruminales (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*) para la síntesis de su proteína (Bryant, 1973; Atasoglu *et al.*, 2001).

Con respecto al proceso de hidrólisis del NNP presente en la dieta, las bacterias ruminales (*Prevotella ruminantium* y *Prevotella bryantii*) degradan el NNP para obtener el grupo amino

(NH) el cual es reducido a N-NH<sub>3</sub> y después aminado en amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) e incorporado a un cetoácido (Glu), el cual por transaminación es transformado en AA y después incorporado en la síntesis de proteína microbiana. El N-NH<sub>3</sub> que escapa de los microorganismos ruminales es absorbido a través de la pared ruminal (Antonelli *et al.*, 2007).

La proteína microbiana queda disponible para el rumiante en su paso a través del abomaso e intestino delgado, lugar donde son degradados en AA libres, péptidos y dipéptidos, y después absorbidos. De acuerdo con Wattiaux (2003), aproximadamente 60 % de los AA absorbidos en intestino delgado son derivados de la proteína bacteriana, y 40 % de proteína no degradada en rumen.

#### **4.5 Nitrógeno no proteínico**

El nitrógeno presente en tejidos de vegetales y animales se clasifica en dos grupos: 1) proteínico, debido a que forma parte de una gran variedad de proteínas; 2) no proteínico (NNP), el cual forma parte de pequeñas moléculas como ácidos nucleicos, amidas, aminoácidos libres, alcaloides, nitratos, nitritos, urea, sales de amonio (sulfatos, cloruros, fosfatos), glucósidos y grasas nitrogenadas (Pichard y van Soest; 1977; Ganesh y Grieve 1990). Además, por la estructura y función de estos compuestos no proteínicos es difícil poder clasificarlos de forma específica.

El NNP es soluble en agua y se encuentra en mayor concentración en hojas tiernas o zonas de crecimiento rápido de gramíneas y leguminosas, semillas en periodo de desarrollo y ensilados de forraje tierno (Nikokyris y Kandyliis, 1997). De acuerdo con NRC (2001), la concentración de NNP en pastos frescos es 10 a 15 %, en pajas 15 a 25 % y en ensilados 30 a 65 %. La alta concentración de NNP en ensilados es por la inmadurez del forraje cosechado y al proceso de fermentación donde la proteína es hidrolizada en aminoácidos por la acción enzimática de los microorganismos. Por ejemplo: el forraje de maíz fresco contiene 10 a 20 % de NNP y el ensilaje de maíz tiene hasta 65 %. Así mismo, Sniffer *et al.*, (1992) indican que el contenido de NNP en forrajes verdes varía de 2.3 a 4.8 % y aumenta a 96 % la proteína soluble cuando se encuentra en forma de heno. Las semillas tienen gran cantidad de NNP en el inicio de su desarrollo y al madurar decrece hasta 5 % (Osborne, 1924; Nikokyris y Kandyliis, 1997).

## 4.6 Urea

La urea es ácido carbónico de diamida, formado por dos átomos de nitrógeno ligado a un grupo carbomil y se caracteriza por ser un compuesto orgánico, higroscópico, soluble en agua y alcohol, cristalino e incoloro (Wade 2003). En mamíferos es el principal producto nitrogenado de excreción (sudor, orina) debido a su alta toxicidad. En 1828 Friedch Wöhlen sintetiza urea usando cianato de amonio ( $\text{NH}_4\text{OCN}^-$ ), y actualmente la síntesis de urea en la industria se realiza utilizando amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) líquido y anhídrido carbónico ( $\text{CO}_2$ ) gaseoso. Debido al alto contenido de nitrógeno (287.5 N) de la urea, y porque es considerado esencial en el metabolismo de las plantas por estar estrechamente relacionado con la cantidad de tallos y hojas, las cuales absorben la luz para la fotosíntesis, el 90 % de la producción comercial es utilizado para la fabricación de fertilizantes agrícolas. Sin embargo, desde la década de 1950 se propone usar la urea en la alimentación de rumiantes (Reid, 1953), dado que la urea constituye un fuente de N para la síntesis de proteína microbiana en rumen (Atasoglu *et al.*, 2001). Además, de acuerdo con Virtane (1966), las vacas lecheras pueden convertir el NNP en proteína de leche.

## 4.7 Limitaciones de la urea

Con frecuencia la urea sintética se utiliza como suplemento alimenticio en la formulación de dietas para rumiantes. En el rumen la urea es hidrolizada rápidamente por acción de enzimas ureasa producida por diversos microorganismos ruminales y proporciona una alta disponibilidad de N- $\text{NH}_3$  en menos de 5 min (Bartley *et al.*, 1981), lo cual puede exceder la disponibilidad de cadenas carbonadas provenientes de la degradación de carbohidratos para la síntesis de proteína microbiana.

El exceso de N- $\text{NH}_3$  es absorbido desde el rumen a la sangre y es transportado vía porta hasta el hígado, donde los hepatocitos lo transforman en urea, proceso en el cual se utiliza una alta cantidad de energía y, por tanto, afecta negativamente la producción de los rumiantes. De acuerdo con las necesidades del rumiante, la urea es reciclada por saliva y pared ruminal hacia el rumen o definitivamente eliminada por orina y leche (Lobley *et al.*, 2000); este proceso es conocido como ciclo de la urea. Aun cuando el hígado remueve y detoxifica el exceso de N- $\text{NH}_3$  absorbido desde el rumen, el ciclo de la urea es fácilmente saturada por lo cual la concentración de N- $\text{NH}_3$  y urea en sangre puede aumentar rápidamente causando trastornos metabólicos,

fisiológicos y, en casos extremos, envenenamiento (Lobley *et al.*, 2000; Abduon *et al.*, 2007). Debido a estas limitantes, la cantidad de urea que puede incluirse en la dieta es de 1 a 3 % (Rupel *et al.*, 1943; Chalupa, 1968).

#### **4.8 Urea de lenta liberación**

La urea se ha combinado con compuestos orgánicos (melaza, aceite de tung, almidón de cereales) e inorgánicos (fosfatos, isobutiraldheido, ácidos, cloruro de calcio, polímeros biodegradables) para disminuir su hidrólisis en rumen a través de su lenta liberación. Los productos más importantes derivados de la combinación con urea y que se han utilizado en la nutrición de rumiantes son:

- 1) Urea fosfato: producto cristalino que contiene 20 % de P y 17 % de N y se forma por la reacción de urea con ácido fosfórico. Oltejen *et al.*, (1967) y Perez *et al.*, (1967) concluyen que la urea fosfato disminuye el pH 0.5 unidades (6 h después de la alimentación) con respecto a urea,, y la concentración de N-NH<sub>3</sub> en sangre (efecto atribuido al ácido fosfórico).
- 2) Biuret: producto que resulta de la condensación entre urea y succinato. De acuerdo con Oltjen *et al.* (1967), Fannesbeck *et al.* (1975) y Currier *et al.*, (2004), el biuret es un producto de baja degradación en rumen y poca solubilidad en líquido ruminal, no afecta el consumo, pero incrementa el flujo de N microbiano hacia duodeno incrementa en comparación con la urea.
- 3) Sterea: mezcla de urea con almidón de cereal (trigo) y presenta una consistencia gelatinosa (Deyoe *et al.*, 1961). En estudios *in vivo* e *in vitro* la liberación de la urea es lenta presentando una menor concentración de N-NH<sub>3</sub> en rumen y en medios de fermentación (Helmer, 1970). Además, según Morrill y Dayton (1973), la sustitución de soya por sterea no modifica las ganancias de peso.
- 4) Urea cubierta con acetite de tung y linaza: de acuerdo con Owens *et al.* (1980), el aceite de tung y linaza disminuyen la hidrólisis de la urea en N-NH<sub>3</sub> en rumen dado que la concentración de N-NH<sub>3</sub> 1 h después de la alimentación, fue menor en novillos

alimentados con urea de lenta liberación en comparación con novillos que recibieron urea (32 vs. 53 mg dL<sup>-1</sup>; 1 % en la dieta).

- 5) Cloruro de calcio ligado a urea (CCU): es una solución acuosa de urea y CaCl<sub>2</sub> que, según Cass y Richardson (1994) y Golombeski *et al.* (2006), presenta una tasa de degradación intermedia entre la urea y la semilla de algodón lo cual provoca una lenta acumulación de N-NH<sub>3</sub> en rumen y en medios de fermentación. Además, Huntington *et al.* (2006), indican que la concentración de N ureico en sangre no se incrementa con CCU.
- 6) Optigen 1200®: urea recubierta con un polímero biodegradable que permite la lenta liberación del N al rumen a través de microporos. Esto permite que los microorganismos ruminales utilicen y conviertan eficientemente la urea en proteína microbiana, resultando en un mejor aprovechamiento de nutrientes como las fracciones de la fibra. Además, por ser una fuente concentrada de N permite crear un espacio en la dieta sin disminuir el contenido total de N para la inclusión de fibra digestible o energía, disminuir el gasto de energía asociado con la excreción del exceso de N de la dieta y reducir los costos de alimentación (Tikofsky y Harrison, 2006; King, 2005; Akay *et al.*, 2004).

#### **4.9 Optigen II®**

La encapsulación o revestimiento es un proceso mediante el cual sustancias con actividad biológica son introducidas en una matriz o sistema pared, con el objetivo de impedir su pérdida y protegerlo de la reacción con otros compuestos. En la industria farmacéutica se han desarrollado revestimientos basados en petróleo (Garrett *et al.*, 2005) o polímeros (Tedeschi *et al.*, 2002; Galo *et al.*, 2003), sensibles al pH y temperatura para liberar el ingrediente activo selectivamente en diferentes partes del tubo digestivo. El recubrimiento pelicular de Optigen II ® se creó mediante una serie de reacciones que incluyen a la urea, trómero diisocianato de hexametileno, resinas alquídicas, aceite de tung y otros catalizadores y productos químicos. El producto resultante fue un polímero de recubrimiento de poliuretano de poliéster que es resistente a la degradación de la flora microbiana del rumen, temperatura, pH y además es biodegradable en suelo. El polímero o recubrimiento pelicular con microporos permite la lenta difusión de la urea en el rumen de los bovinos eliminando del Optigen II® el 93 % de su nitrógeno (Alltech, 2004).



## 5. Literatura citada

- Akay, V., J. Tikofsky, C. Holtz, and K. A. Dawson. 2004. Optigen ® 1200. Controlled release of non-protein nitrogen in the rumen. *In*: Lyons, T. P., and K.A. Jacques (eds). Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries. Proceedings of Alltech's Twentieth Annual Symposium. Nottingham University Press England. pp: 176 – 185.
- Alltech, Inc. 2004. USA. Optigen residues in the environmental. pp: 1 – 19.
- Atasoglu, C., C. J. Newbold, and R. J. Wallace. 2001. Incorporation of [<sup>15</sup>N] ammonia by the cellulolytic ruminal bacteria *Fibrobacter succinogenes* BL2, *Ruminococcus albus* SY3, and *Ruminococcus flavefaciens* 17. *Applied Environmental Microbiology* 67: 2819 – 2822.
- Atasoglu, C., C. Valdés, N. D. Walker, C. J. Newbold, and R. J. Wallace. 1998. De novo synthesis of amino acids by the ruminal bacteria *Prevotella bryantii* B14, *Selenomonas ruminantium* HD4, and *Streptococcus bovis* ES1. *Applied Environmental Microbiology* 64: 2836 – 2843.
- Boguhn, J., H. Kluth, and M. Rodehutsord. 2006. Effect of total mixed ration composition on amino acid profiles of different fractions of ruminal microbes *in vitro*. *Journal of Dairy Science* 89: 1592-1603.
- Bryant, M. P. 1973. Nutritional requirements of the predominant rumen cellulolytic bacteria. *Federation Proceedings* 32: 1809 – 1813.
- Butler, W. R. 1998. Review: effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 81: 2533 – 2539.
- FAO. 2007. Perspectivas alimentarias. Análisis del mercado mundial pp: 39 – 44.
- Ferguson, J. D., and W. Chalupa. 1989. Impact of protein nutrition on reproduction in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 72: 746 – 766.
- Funk, D. 1997. Selecting sires other than for milk production. Western Dairy Management Conference. Las Vegas, Nevada. pp: 1 – 9.
- Gómez, C. H., A. Tewolde, y J. T. Nahed. 2002. Análisis de los sistemas ganaderos de doble propósito en el centro de Chiapas, México. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal* 10: 175 – 183.
- Helmer, L. G., and E. E. Bartley. 1971. Progress in the utilization of urea as a protein replace for ruminants. A review. *Journal of Dairy Science* 54: 25 – 51.
- Ipharraguerre, R., and J. H. Clark. 2003. Soyhulls as an alternative feed for lactating Dairy Cows: A review. *Journal of Dairy Science* 86:1052-1073

- Ipharraguerre, R., and J. H. Clark. 2005. Impacts of the source and amount of crude protein on the intestinal supply of nitrogen fractions and performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science* 88 (E. Suppl.): E22–E37.
- King, D. 2005. Optigen: la tecnología del nitrógeno. Una herramienta en la formulación de la dieta para optimizar la salud ruminal y el desempeño del ganado. *In: Memoria del 5<sup>a</sup> Ronda de Biotecnología en Ganado Lechero*. Alltech de México S.A. de C.V. Querétaro, México. pp: 37 – 40.
- Korhonen, M., A. Vanhatalo, and P. Huhtanen. 2002. Effect of protein source on amino acid supply, milk production, and metabolism of plasma nutrients in dairy cows fed grass silage. *Journal of Dairy Science* 85: 3336-3351.
- Krishnamoorthy, U. U., T. V. Muscato, C. J. Sniffer, and P. J. Van Soest. 1982. Nitrogen fractions in selected feedstuff. *Journal of Animal Science* 65: 217 – 225.
- Lawlor, T. 2007. Holstein: La Raza del Futuro ¿Hacia donde nos dirigimos?. Boletín No. 15. CIGAL. Conferencia Internacional sobre ganado Lechero. CIGAL. Boletín No. 15. pp: 1 – 20.
- Nelson, D., and M. Cox. 2000. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3rd edition. Worth Publishers. New York, U.S.A. pp: 1152 – 1161.
- NRC. 1985. *Ruminant Nitrogen Usage*. National Academy Press, Washington, D.C. pp. 4 – 37.
- NRC. 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. (7 th rev ed). National Academy Press, Washington, D.C. pp: 43 – 104.
- OECD-FAO. 2007. *Perspectivas Agrícolas OECD-FAO 2007-2016*. pp.117 – 129.
- Petit, H. V., C. Germiquet, and D. Lebel. 2004. Effect of feeding whole, unprocessed sunflower seeds and flaxseed on milk production, milk composition, and prostaglandin secretion in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 87: 3889-3898.
- Pichard, D. G., and P. J. Van Soest. 1977. Protein solubility of ruminant feeds. *Proc. Cornell Nutr. Conf. Ithaca. NY*. pp: 91 – 98.
- Russell, B. J. 2002. *Rumen Microbiology and its Role in Ruminant Nutrition*. Cornell University. Ithaca N.Y. U.S.A. pp: 121 – 125.
- Russell, J. B., J. D. O'Connor, D. G. Fox, P. J. Van Soest, and C. J. Sneffier. 1992. A net carbohydrates and protein system for evaluating cattle diets. I. Ruminant fermentation. *Journal of Animal Science* 70: 3551 – 3561.

- SAGARPA-ASERCA. 2005. Dinámica de la producción de leche de bovino en México 2005. Claridades Agropecuarias. pp: 148:3 – 30.
- Schingoethe, J. D. 1996. Dietary influence on protein level in milk and milk yield in dairy cows. *Animal Feed Science and Technology* (60) 3-4: 181-190.
- Schwab, C. G., T. P. Tylutki, R. S. Ordway, C. Sheaffer, and M. D. Stern. 2003. Characterization of proteins in feeds. *Journal of Dairy Science* 86: E88 - 103E.
- Sniffer, C. J., J. D. O'Connor, P. J. Van Soest, D. G. Fox, and J. B. Russell. 1992. A net carbohydrates and protein system for evaluating cattle diets. II. Carbohydrate and protein availability. *Journal of Animal Science* 70: 3562 – 3577.
- Throne, M., A. Bach, M. Ruiz-Moreno, M. D. Stern, J. G. Linn. 2009. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* on ruminal pH and microbial fermentation in dairy cows: Yeast supplementation on rumen fermentation. *Livestock Science* (124) 1-3: 261-265.
- Tikofsky, J., and G. A. Harrison. 2006. Optigen II: Improving the efficiency of nitrogen utilization in the dairy cow. *In: Nutritional biotechnology in the feed and food industries. Proceedings of Alltech's Twenty two first Annual Symposium.* Lyons, T. P. and K. A. Jacques (eds). Nottingham University Press England. pp: 373 – 380.
- Van Soest, P. J., C. J. Sniffer, D. R. Mertens, D. G. Fox, P. H. Robinson, and U. U. Krishnamoorthy. 1981. A net protein system for cattle: The rumen submodel for nitrogen. *In: Owens, F. N. (ed). Protein Requirement for Cattle: Proceedings of an International Symposium.* MP-109, Oklahoma State University. Stillwater. pp: 265 – 280.
- Wade, L. G. 2003. *Organic Chemistry.* (5 th Ed). Person Education, Inc. Upper Saddle River, New Jersey. pp: 990 – 991.
- Weekes, T. L., P. H. Luimes, and J. P. Cant. 2006. Responses to amino acid imbalances and deficiencies in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 89: 2177-2187.

# CAPÍTULO I. EFECTO DE UREA PROTEGIDA CON UN POLÍMERO EN VARIABLES DE CINÉTICA RUMINAL

## 1.1 Resumen

Para evaluar los cambios en la cinética de liberación de la urea (U) y N-NH<sub>3</sub>, así como en variables microbiológicas y de degradación *in vitro* (DIV) de la MS (DIVMS) y FDN (DIVFDN), debido al efecto de la U protegida con un polímero (UP), se realizaron dos experimentos. En el primero, la UP fue disuelta en agua (A), solución mineral reducida (SMR), líquido ruminal clarificado (LRc) y líquido ruminal fresco (LR). Los tratamientos (T) fueron: T1 = A + U; T2 = A + UP; T3 = SMR + U; T4 = SMR + UP; T5 = LRc + U; T6 = LRc + UP; T7 = LR + U; T8 = LR + UP. El diseño experimental fue completamente al azar con medidas repetidas a través del tiempo; los datos fueron analizados con REPEATED MEASURE y PROC MIXED de SAS. La UP se solubilizó paulatinamente durante 12 h ( $P \leq 0.001$ ), alcanzando su máxima concentración entre 10 a 11 h en el LRc ( $P \leq 0.001$ ). La concentración de N-NH<sub>3</sub> en el tratamiento LR + UP aumentó ( $P \leq 0.01$ ) entre 4 a 12 h de incubación. En el segundo experimento se evaluó la concentración de bacterias celulolíticas (BC) y la degradación *in vitro* de la MS (DIVMS) y de la FDN (DIVFDN) en heno de alfalfa (HA), paja de avena (PA), ensilado de maíz (EM) y rastrojo de maíz (RM). Los tratamientos (T) fueron: T1 = SU (sin U); T2 = U1+UP1 (4 g U kg<sup>-1</sup> MS + 4 g UP kg<sup>-1</sup> MS); T3 = UP2 (8 g UP kg<sup>-1</sup> MS); T4 = UP3 (12 g UP kg<sup>-1</sup> MS); T5 = U2 (8 g U kg<sup>-1</sup> MS). El diseño experimental y el análisis de los datos fueron similares a los de la primera fase. El tratamiento U1 + UP1 (T2) mejoró Vm ( $P \leq 0.001$ ), R ( $P \leq 0.001$ ) y DIVMS ( $P \leq 0.001$ ) del EM y RM, así como la concentración de las BC ( $P \leq 0.05$ ). Se concluye que el polímero de revestimiento favorece una liberación lenta de la urea y disminuye su hidrólisis en N-NH<sub>3</sub>. Además, la combinación UP con urea (muy soluble e hidrólisis completa) mejora el crecimiento microbiano, así como la DIVMS y la DIVFDN de forrajes con bajo contenido de nitrógeno.

Palabra claves: urea, polímero, degradación *in vitro*, bacterias celulolítica, líquido ruminal.

## 1.2 Abstract

### EFFECT OF UREA PROTECTED WITH A POLYMER ON RUMINAL KINETICS VARIABLES

In order to evaluate changes in kinetics of urea (U) and  $\text{NH}_3\text{-N}$  release, as well as on microbiological and *in vitro* degradation (IVD) of DM (DMIVD) and NDF (NDFIVD) variables, due to the effect of a polymer coated urea (PU), two experiments were carried out. In the first one, the PU was dissolved in water (w), reduced mineral solution (RMS), clarified ruminal fluid (cRF) and fresh ruminal fluid (RF). Treatments (T) were T1= W+U; T2 = W+PU; T3 = RMS + U; T4 = RMS + PU; T5 = cRF + U; T6 = cRF + PU; T7 = RF + U; T8 = RF+PU. The experimental design was completely randomized with repeated measured trough the time; data were analyzed with REPEATED MEASURE and PROC MIXED (SAS). The PU dissolved slowly during 12 h ( $P\leq 0.001$ ), reaching the maximum concentration between 10 and 11 h in cRF ( $P\leq 0.001$ ). The concentration of  $\text{NH}_3\text{-N}$  in the treatment RF +PU increased ( $P\leq 0.001$ ) between 4 to 12 h. The second experiment was performed to evaluate the cellulolytic bacteria (CB) concentration and *in vitro* degradation (IVD) of DM (DMIVD) and NDF (NDFIVD) for alfalfa hay (AH), oat straw (OS, corn silage (CS) and corn stalk residue (CSR). The treatments (T) were T1 = NU (no U); T2 = U1 + PU1 (4g U  $\text{kg}^{-1}$  DM + 4g PU  $\text{kg}^{-1}$  DM); T3 = PU2 (8 g PU  $\text{kg}^{-1}$  DM); T4 = PU3 (12 g PU  $\text{kg}^{-1}$  DM); T5=U2 (8 g U  $\text{kg}^{-1}$  DM). The experimental design and data analysis were the same as in the first experiment. The treatment U1 + UP1 (T2) improved  $V_m$  ( $P\leq 0.001$ ), R ( $P\leq 0.001$ ), DIVMS ( $P\leq 0.001$ ) of CS and CSR, as well as concentration of BC ( $P\leq 0.05$ ). It may be concluded that the coating polymer coated favors a slow release of urea and decreases its hydrolysis to  $\text{NH}_3\text{-N}$ . Besides, the combination UP plus urea (highly soluble and complete hydrolysis) improved microbial growth, as well as DMIVD and NDFIVD of forages with low content of nitrogen.

Key words: urea, polymer, *in vitro* fermentation, cellulolytic bacteria, ruminal liquid.

### 1.3 Introducción

La degradación microbiana de la fibra en rumen y los compuestos nitrogenados de la dieta permite la síntesis de proteína microbiana (Atasoglu *et al.*, 1998, 2001), la cual representa de 40 a 100 % de los AA que llegan al intestino delgado del rumiante (Stem *et al.*, 1994). La eficiencia de estos procesos puede mejorarse si existe una cantidad adecuada de N disponible en el rumen (10 a 16 g N d<sup>-1</sup>; Pisulewski *et al.*, 1981). Las fuentes nitrogenadas usadas por los microorganismos ruminales provienen de la dieta como N proteínico o N no proteínico (NNP) y de la urea salival reciclada al rumen. La urea (U) usada en dietas para rumiantes, se hidrolizada rápidamente en rumen a N-NH<sub>3</sub> (Bartley *et al.*, 1981) con lo cual, en ciertas condiciones, puede exceder la energía disponible requerida para sintetizar la proteína microbiana. El exceso de N-NH<sub>3</sub> es absorbido y se sintetiza U en hígado; una alta concentración de urea sanguínea afecta la eficiencia productiva y, en casos extremos, causa la muerte del rumiante (Lobley *et al.*, 2000; Abduon *et al.*, 2007). Por tanto, la cantidad de U en la dieta debe ser 1 a 3 % (Chalupa, 1968), Con el fin de que la disolución e hidrólisis de la urea sea paulatina y con ello incrementar la cantidad que puede usarse en dietas, se investiga el uso compuestos de lenta liberación como biuret, isobutilidene diurea, almidón de cereales con urea (sterea), urea cubierta con aceite de tung y linaza, y cloruro de Ca<sup>+</sup> unido a urea (Owens *et al.*, 1980; Currier *et al.*, 2004; Huntington *et al.*, 2006). Estos compuestos no han dado los resultados esperados porque la liberación del NNP es todavía rápida o los componentes que protegen la U disminuyen su hidrólisis o son fácilmente dañados en rumen causando un incremento súbito de N-NH<sub>3</sub> (Oltjen *et al.*, 1967; Galo *et al.*, 2003; Golombeski *et al.*, 2006). En consecuencia, se requiere una forma efectiva de protección de la urea que permita dosificar su hidrólisis ruminal con el fin de evitar efectos negativos e incrementar la cantidad sugerida en la formulación de dietas. Por tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de urea protegida con un polímero en la cinética de liberación de urea e hidrólisis a N-NH<sub>3</sub>, en el crecimiento microbiano, degradación de FDN y fermentación *in vitro* de heno de alfalfa, paja de avena, ensilado de maíz y rastrojo de maíz.

## 1.4 Materiales y métodos

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Microbiología Pecuaria del Departamento de Zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, México. Así mismo, se realizó con la aprobación del Comité Académico del Programa de Ganadería del Colegio de Postgraduados y de acuerdo con las normas de protección ambiental dictadas por el Gobierno del Estado de México.

### 1.4.1 Descripción de tratamientos

**Cinética de liberación de urea y concentración de amonio:** En este experimento los tratamientos resultaron de la combinación de dos fuentes de nitrógeno: urea (U) y urea protegida con un polímero (UP), y cuatro solventes: agua (A), solución mineral reducida<sup>1</sup> (SMR), líquido ruminal clarificado<sup>2</sup> (LRc) y líquido ruminal fresco<sup>3</sup> (LR). En cada solvente (50 mL) se adicionó  $1.05 \pm 0.003$  g U o UP y fueron incubados a 39 °C. Los tratamientos (T) fueron: T1 = A + U; T2 = A + UP; T3 = SMR + U; T4 = SMR + UP; T5 = LRc + U; T6 = LRc + UP; T7 = LR + U y T8 = LR + UP.

**Desaparición y fermentación *in vitro* de MS y FDN en forrajes:** En este experimento se determinó la degradación y fermentación *in vitro* por la técnica de producción de gas, de heno de alfalfa (HA), paja de avena (PA), ensilado de maíz (EM), rastrojo de maíz (RM), y sus respectivas FDN. Se colocó 0.5 g MS de substrato con 90 mL de inóculo ruminal estandarizado (Theodorou *et al.*, 1994) y fueron incubados por 72 h a 38 °C. Los tratamientos (T) fueron: T1 = SU (sin U); T2 = U1+UP1 (4 g U<sup>-1</sup> kg<sup>-1</sup> MS + 4 g UP<sup>-1</sup> kg<sup>-1</sup> MS); T3 = UP2 (8 g UP<sup>-1</sup> kg<sup>-1</sup> MS); T4 = UP3 (12 g UP<sup>-1</sup> kg<sup>-1</sup> MS); T5 = U2 (8 g U<sup>-1</sup> kg<sup>-1</sup> MS).

---

<sup>1</sup> La SMR se preparó de acuerdo con Bryant y Robinson (1962), Anexo A.

<sup>2</sup> El LR se extrajo de una vaca Holstein (650 kg PV) con cánula en rumen y alimentada con una dieta integral (concentrado y forraje; 60:40).

<sup>3</sup> Para obtener el LRc, una muestra de LR fue filtrada con gasa triple, centrifugada 15 min a 12857 g y tres veces esterilizada 15 min en autoclave a 121 °C (López *et al.*, 1999).

Cuadro 1. Composición química de cuatro forrajes

Forraje	MS (%)	PC (%)	FDN (%)	EM (Mcal kg <sup>-1</sup> )*
Heno de alfalfa	90.30	19.20	69.5	2.60
Rastrojo de maíz	92.66	6.17	43.5	1.80
Ensilado de maíz	35.10	8.10	47.9	2.33
Paja de avena	93.12	9.63	49.9	1.70

\*Determinado con la producción de gas del forraje en 24 h.

#### 1.4.2 Procesamiento de muestras y análisis de laboratorio

**Determinación de urea:** De cada tratamiento se mezclaron 200 µL con 1.8 mL de ácido tricloroacético (3 %) y se centrifugó 10 min a 11454 g; en 100 µL del sobrenadante se adicionó 2 mL de diacetil monoxima (30 g L<sup>-1</sup> agua), y 3 mL de solución A<sup>4</sup>. La solución se colocó 20 min en baño maría a ebullición, se dejó enfriar y se le determino la absorbancia a 475 nm en un espectrofotómetro<sup>5</sup> (Ormsby, 1942). La concentración de urea se calculó con la ecuación: Urea (%) = (absorbancia + 0.0565) (10 mL) (100 mL) / (7700) (1 mL).

**Determinación de N-NH<sub>3</sub>:** Dos mL de cada tratamiento fue mezclado con 0.5 mL de ácido metafosfórico (25 %), y se refrigeró por 3 h a 4°C. Luego se centrifugó 10 min a 25199 g; en 20 µL del sobrenadante se adicionó 1 mL de fenol (10 %), 1 mL hipoclorito de sodio basificado con NaOH<sup>6</sup> y 5 mL agua destilada. Esta mezcla se incubó 30 min a 38 °C; y, después se midió la absorbancia a 630 nm en un espectrofotómetro<sup>7</sup> (McCullough, 1967).

**Producción de gas:** se tomaron lecturas de presión de gas<sup>8</sup> (kg cm<sup>-2</sup>) a 0, 2, 4, 6, 8, 10, 16, 22, 28, 34, 42, 50, 58, 68, 72 h de incubación, los valores se transformaron a volumen de gas con la ecuación de regresión lineal  $V = (P + 0.0186) (0.0237)^{-1}$ . Con los resultados obtenidos, el modelo

<sup>4</sup> 375 mL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 85 %, 125 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 98.2 % y 6 g de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O en 550 mL de agua destilada.

<sup>5</sup> Espectrofotómetro UV-visible Marca VARIAN, Modelo CARY 1E.

<sup>6</sup> 5 g NOH y 10 mL de hipoclorito de sodio

<sup>7</sup> Espectrofotómetro UV-visible Marca VARIAN, Modelo CARY 1E.

<sup>8</sup> La presión se tomó con un manómetro con escala de 0 a 1 kg cm<sup>-2</sup>



logístico  $VA = Vm / (1 + \exp(2.4 * s * (t-L)))$ , y el procedimiento NLIN de SAS (1999), se calcularon los parámetros de cinética de producción de gas: volumen máximo de gas producido ( $Vm$ ) y tasa de producción de gas ( $R$ ) de MS y FDN (Schofield y Pell, 1995).

**Desaparición *in vitro* de MS y FDN:** se determinó recuperando el residuo de los frascos por filtración a través de papel Whatman No. 541; el residuo recuperado se secó 24 h a 60°C, se pesó y calculó el porcentaje de material degradado (AOAC, 2003).

**Población de bacterias celulolíticas:** la concentración de bacterias celulolíticas (BC) se determinó en los tratamientos SU y U1 + UP1 de HA y EM. Se usó el método del número más probable (NMP; Harrigan y McCance, 1979), con diluciones  $10^{-1}$  a  $10^{-10}$  en un medio GCA-FR (Cuadro 2; Cobos y Yokoyama, 1995) y se agregó una tira (0.5X2.0 cm) de papel Whatman No 541; el conteo se realizó a 10 d de incubación.

Cuadro 2. Composición del medio de cultivo para bacterias celulolíticas (BRC) por cada 100 mL

Reactivos	Cantidad para BRC
Agua destilada	52.6
Líquido ruminal clarificado (LRc) <sup>1</sup>	30.0
Solución mineral I <sup>2</sup>	5.0
Solución mineral II <sup>2</sup>	5.0
Resarzurina solución al 0.1% <sup>2</sup>	0.1
Carbonato de sodio solución al 8 % <sup>2</sup>	5.0
Solución de sulfito - cisteína <sup>2</sup>	2.0
Tripticasa – peptona (g)	0.2
Extracto de levadura (g)	0.1
Papel Whatman No.1 (tiras)	10 (1 tira/tubo)

<sup>1</sup> LRc filtrado con gasa triple, centrifugado 15 min a 12857 g y esterilizado 15 min en autoclave a 121 °C.

<sup>2</sup> Descritos en la solución mineral reducida Anexo A.

### 1.4.3 Variables de respuesta, diseño experimental y modelo estadístico

Para la cinética de liberación de la urea se midió su concentración ( $\text{mg } 100 \text{ mL}^{-1}$ ) y de amonio ( $\text{mMol dL}^{-1}$ ). Para la desaparición y fermentación en forrajes se determinó: desaparición *in vitro* de la MS (%), FDN (%), los parámetros de cinética de producción de gas ( $V_m$  y  $R$ ). También se evaluó la población de bacterias celulolíticas (Número de bacterias  $\text{mL}^{-1}$ ;  $\times 10^5$ ).

El diseño experimental fue completamente al azar con medidas repetidas a través del tiempo (REPEATED MEASURES), con tres repeticiones por tratamiento. El efecto tiempo se evaluó con el procedimiento MIXED (SAS, 1999) de acuerdo con Wang y Goonwardese (2004). La comparación de medias para la variable urea se hizo por los siguientes contrastes ortogonales (PROC MIXED; SAS, 1999):  $C1 = A + U, \text{SMR} + U, \text{LRc} + U \text{ vs } A + \text{UP}, \text{SMR} + \text{UP}, \text{LRc} + \text{UP}$ ;  $C2 = A + \text{UP}, \text{SMR} + \text{UP} \text{ vs } \text{LRc} + \text{UP}$ ;  $C3 = A + U, \text{SMR} + U, \text{LRc} + U \text{ vs } \text{LRc} + \text{UP}$  (10 a 11 h). Para la variable BC se calculó el intervalo de confianza (95 %) para la técnica del NMP, con la fórmula: Número de bacterias =  $\text{NMP}/4.68$  a  $\text{NMP} \times 4.68$  (Harrigan y McCance, 1979).

El análisis de varianza fue realizado con el procedimiento MIXED de SAS (SAS, 2000), usando el siguiente modelo estadístico.

$$Y_{ijk} = \mu + \delta_i + \tau_j + (\delta\tau)_{ij} + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

$Y_{ij}$  = variable de respuesta

$\mu$  = media general

$\delta_i$  = efecto fijo del  $i$ -ésimo tratamiento

$\tau_j$  = efecto del  $j$ -ésimo factor (periodo, tiempo)

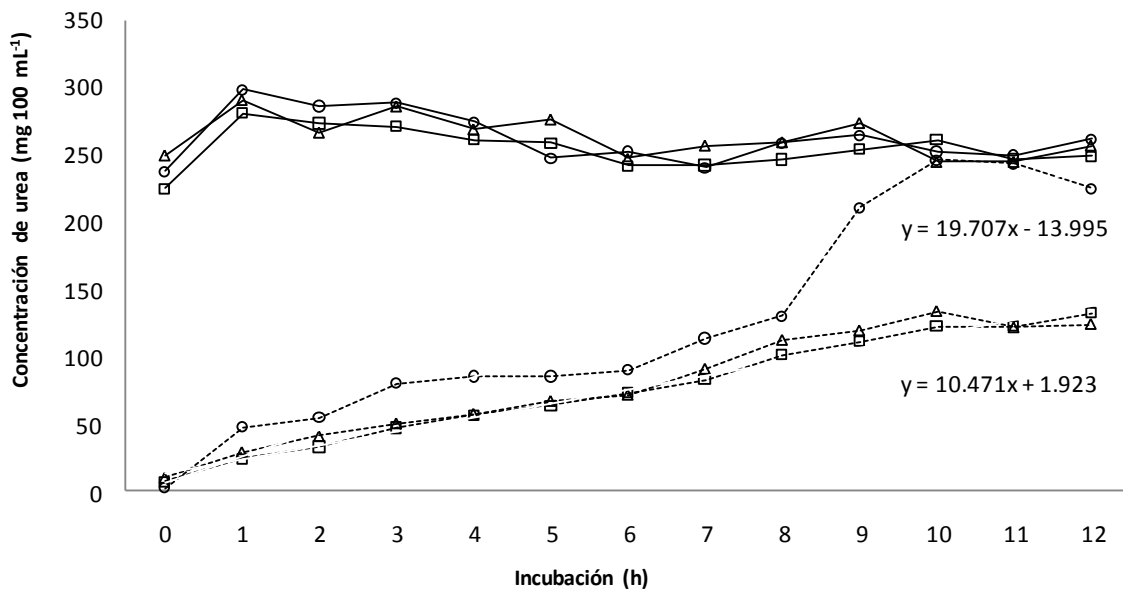
$(\delta\tau)_{ij}$  = efecto fijo de la interacción del  $i$ -ésimo tratamiento con el  $j$ -ésimo periodo

$\varepsilon_{ij}$  = error experimental

## 1.5 Resultados y discusión

### 1.5.1 Cinética de liberación de la urea y concentración de amonio

**Concentración de urea:** En la Figura 1 se muestra la concentración de urea para los diferentes solventes y fuentes de nitrógeno, a distintos tiempos de incubación. La urea simple (U) alcanza su máxima concentración al inicio de la incubación mientras que la UP se solubilizó paulatinamente durante 12 h de incubación a 39 °C, existiendo diferencia ( $P \leq 0.001$ ) entre la fuente de nitrógeno independientemente del solvente. La disolución de UP fue mayor ( $P \leq 0.001$ ) en LRC ( $19 \text{ mg h}^{-1}$ ) con respecto a A y SMR ( $10.3 \text{ mg h}^{-1}$ ). La concentración de urea disuelta en LRC + UP presentó dos fases una de incrementó paulatino entre 0 y 7 h de incubación, y otra de incremento rápido de 8 a 10 h de incubación, alcanzando concentraciones similares ( $P > 0.1$ ) a las de los tratamientos que contenían urea (U) simple (A + U, SMR + U y LRC + U) entre 10 a 11 h de incubación. Esto sugiere que los componentes, en particular AGV, o el pH ligeramente ácido (6.54; Van Gylswyk *et al.*, 1992) del LRC favorecen la liberación de la U en comparación a A y SMR.



U vs. UP =  $P \leq 0.0001$  A+UP y SMR+UP vs. LRC+UP =  $P \leq 0.0001$  LRC+UP vs. U =  $P \leq 0.516$  (entre 10 a 11 h)

Figura 1. Concentración de urea (---U---) y urea protegida con un polímero (—UP—) disuelta en agua (□), solución mineral reducida (Δ) y líquido ruminal clarificado (○). La concentración de U en LR no se graficaron debido a que su valor fue cero.

**Concentración de N-NH<sub>3</sub>:** No se detectó N-NH<sub>3</sub> en LRc, A y SMR. Por el contrario, la concentración de N-NH<sub>3</sub> fue 2.3 mM dL<sup>-1</sup> en LR completo, independientemente de la fuente de urea (U o UP). En la 1, 2 y 3 h de incubación la concentración de N-NH<sub>3</sub> para LR + U fue mayor ( $P \leq 0.01$ ) respecto a LR + UP, y este aumento se atribuyó a la rápida hidrólisis de la urea en N-NH<sub>3</sub> llevada a cabo por los microorganismos ruminales. La concentración de N-NH<sub>3</sub> en el mismo tratamiento (LR + UP) disminuyó drásticamente entre la 4 y 5 h de incubación, lo que probablemente se relaciona con la utilización del N-NH<sub>3</sub> por bacterias del rumen para sintetizar proteína microbiana (Abdoun *et al.*, 2007; Antonelli 2007). Además, la concentración de N-NH<sub>3</sub> en el tratamiento LR + UP se mantuvo menor a 0.1 mMol dL<sup>-1</sup> durante la primera hora de incubación y después hubo un aumento paulatino hasta alcanzar la máxima concentración a las 4 h de incubación ( $P \leq 0.01$ ), permaneciendo esta concentración hasta las 12 h de incubación. El análisis de los resultados indica una disolución lenta de la urea protegida con un polímero en el LR retardando su hidrólisis a N-NH<sub>3</sub> por los microorganismos ruminales.

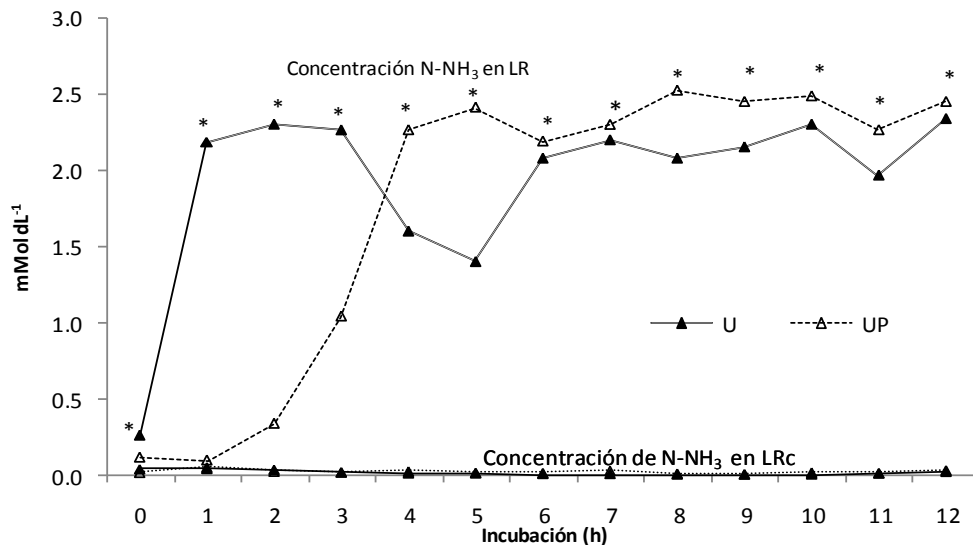


Figura 2. Concentración de N-NH<sub>3</sub> proveniente de la hidrólisis de urea (U, ▲) y urea protegida con un polímero (UP, Δ), en líquido ruminal (LR) fresco y líquido ruminal clarificado (LRc) [Datos diferentes ( $P \leq 0.01$ ) entre LR vs. LRc].

### 1.5.2 Digestibilidad y fermentación *in vitro* de MS y FDN en forrajes

**Producción de gas:** El Vm y R fue menor ( $P \leq 0.001$ ) en HA y PA con la mayor cantidad de UP (12 g kg<sup>-1</sup> MS) y U (8 g kg<sup>-1</sup> MS) en comparación con RM y EM. Se ha considerado que la cantidad de gas producido *in vitro* con sustratos de alto contenido de N es menor (Fondevila *et al.*, 2002), probablemente por el incremento de la masa microbiana que está inversamente correlacionado con la producción de gas (Blümen *et al.*, 2003), o por la reacción del N-NH<sub>3</sub> liberado con CO<sub>2</sub> (Menke y Steingass, 1988) lo cual explica la reducción de Vm en HA y PA adicionadas con urea.

Cuadro 3. Efecto de urea (U) y urea protegida con un polímero (UP) en los parámetros de cinética de producción de gas (Vm y R) por la fermentación *in vitro* de forrajes.

Forraje	Parámetro	Tratamientos (T)					EE
		SU	U1+UP1	UP2	UP3	U2	
HA	Vm (mL g <sup>-1</sup> )	242.1 <sup>a</sup>	240.7 <sup>ac</sup>	227.4 <sup>acef</sup>	222.8 <sup>bdef</sup>	231.1 <sup>ace</sup>	6.7
	R (h <sup>-1</sup> )	0.040 <sup>ac</sup>	0.041 <sup>a</sup>	0.039 <sup>ace</sup>	0.038 <sup>bdef</sup>	0.039 <sup>acef</sup>	0.0008
PA	Vm (mL g <sup>-1</sup> )	246.6 <sup>ace</sup>	257.0 <sup>a</sup>	235.0 <sup>bceg</sup>	249.1 <sup>ac</sup>	223.1 <sup>bdfg</sup>	6.7
	R (h <sup>-1</sup> )	0.023 <sup>a</sup>	0.024 <sup>a</sup>	0.024 <sup>a</sup>	0.024 <sup>a</sup>	0.023 <sup>a</sup>	0.0008
RM	Vm (mL g <sup>-1</sup> )	265.8 <sup>bdfg</sup>	287.7 <sup>ac</sup>	281.2 <sup>ace</sup>	289.1 <sup>a</sup>	249.5 <sup>bdfg</sup>	6.7
	R (h <sup>-1</sup> )	0.026 <sup>bde</sup>	0.027 <sup>a</sup>	0.025 <sup>bdef</sup>	0.027 <sup>ac</sup>	0.026 <sup>bdef</sup>	0.0008
EM	Vm (mL g <sup>-1</sup> )	240.5 <sup>bde</sup>	268.9 <sup>a</sup>	230.2 <sup>bdef</sup>	258.1 <sup>ac</sup>	238.7 <sup>bdef</sup>	6.7
	R (h <sup>-1</sup> )	0.026 <sup>bde</sup>	0.027 <sup>ac</sup>	0.025 <sup>bdef</sup>	0.028 <sup>a</sup>	0.025 <sup>bdef</sup>	0.0008

<sup>a, b</sup> = medias con diferente literal en una hilera son diferentes ( $P \leq 0.01$ ); HA = heno de alfalfa, PA = paja de avena, RM = rastrojo de maíz, EM = ensilado de maíz; SU = sin urea; U1+UP1 = 0.002 g U+0.002 g UP; UP2 = 0.004 g UP; UP3 = 0.006 g UP; U2 = 0.004 U; EE = error estándar.

En forma general el Vm y R en RM y EM aumentó (Cuadro 3) con la adición de urea, siendo mayor ( $P \leq 0.01$ ) con 12 g de UP  $\text{kg}^{-1}$  MS. El análisis de los resultados indica que la liberación paulatina de la UP se sincroniza con la disponibilidad de  $\text{N-NH}_3$  y la utilización de fibra lo que favorece su asimilación por las bacterias ruminales y mejora la fermentación y degradación de los forrajes (Tedeschi *et al.*, 2000).

La mayor Vm se produjo con la fermentación del RM, independientemente de la adición o no de urea y de su fuente ( $P \leq 0.001$ ), con respecto a HA, PA y EM, lo cual se atribuyó a su mayor contenido de carbohidratos fermentables, sean o no estructurales, que comúnmente poseen las gramíneas en comparación con leguminosas (Ramírez *et al.*, 2002). La mayor R con o sin la adición de urea ( $P \leq 0.001$ ) para PA, RM y EM, la presentó el HA, parámetro que se relaciona directamente con la proporción de contenido celular y el cual es mayor en HA (Blümmel *et al.*, 1997).

Respecto a las fibras, la urea redujo ( $P \leq 0.01$ ) el Vm en la fermentación de FDN-PA; dicha reducción mostró una tendencia lineal conforme se incrementó la UP (U+UP, 2UP, 3UP; Cuadro 4) y, por el contrario, en la fermentación de la FDN-EM y FDN-RM, la UP aumentó ( $P \leq 0.001$ ) el Vm producido Cone y van Gelder (1999) y González *et al.*, (1998) encontraron que la cantidad acumulada de gas producido por la fermentación es inversamente proporcional a la concentración de nitrógeno, debido a la formación de bicarbonato de amonio y a la estructura química de la fibra (Zerbini *et al.*, 2002). En la fermentación de la FDN de EM y RM, la UP incrementó ( $P \leq 0.001$ ) el Vm producido. En particular la FDN de RM no mejoró ( $P > 0.01$ ) con la adición de urea (U2). El análisis de los resultados probablemente indica que la FDN-RM y FDN-EM debieron contener una mayor concentración de carbohidratos estructurales de rápida fermentación (Hans-Joachim, 1997) y la disponibilidad paulatina de  $\text{N-NH}_3$  favorece la actividad de bacterias celulolíticas (Atasoglu *et al.*, 2001) lo cual se refleja en un mayor Vm (FDN-RM y FDN-EM; Nagadi *et al.*, 2000).

La R de la FND de HA y PA fueron menores ( $P \leq 0.01$ ) a las de RM y EM. Los valores de Vm y R en el presente estudio son similares con los reportados por Carro *et al.* (1999), quienes indican que la adición de una fuente nitrogenada (caseína vs urea) a sustratos deficientes en PDR, incrementa la tasa de fermentación y desaparición de los componentes del sustrato.

Cuadro 4. Efecto de urea (U) y urea protegida con un polímero (UP), en los parámetros de cinética de producción de gas (Vm y R) por la fermentación *in vitro* de FDN de forrajes.

Forraje	Parámetro	Tratamientos (T)					
		SU	U1+UP1	UP2	UP3	U2	EE
FDN-HA	Vm	204.2 <sup>a</sup>	216.9 <sup>a</sup>	214.5 <sup>a</sup>	211.5 <sup>a</sup>	209.3 <sup>a</sup>	7.37
	R	0.027 <sup>a</sup>	0.025 <sup>a</sup>	0.026 <sup>a</sup>	0.026 <sup>a</sup>	0.026 <sup>a</sup>	0.0008
FDN-PA	Vm	261.4 <sup>a</sup>	239.2 <sup>bc</sup>	195.1 <sup>bdfg</sup>	176.9 <sup>bdfg</sup>	230.6 <sup>bce</sup>	7.37
	R	0.026 <sup>a</sup>	0.028 <sup>a</sup>	0.028 <sup>a</sup>	0.028 <sup>a</sup>	0.029 <sup>a</sup>	0.0008
FDN-RM	Vm	259.6 <sup>bdfg</sup>	286.1 <sup>ac</sup>	302.4 <sup>a</sup>	284.8 <sup>ace</sup>	267.2 <sup>bdfg</sup>	7.37
	R	0.031 <sup>a</sup>	0.032 <sup>a</sup>	0.030 <sup>a</sup>	0.032 <sup>a</sup>	0.032 <sup>a</sup>	0.0008
FDN-EM	Vm	207.8 <sup>bdfh</sup>	235.5 <sup>bdfg</sup>	259.2 <sup>ac</sup>	266.5 <sup>a</sup>	258.5 <sup>ace</sup>	7.37
	R	0.030 <sup>a</sup>	0.029 <sup>a</sup>	0.030 <sup>a</sup>	0.029 <sup>a</sup>	0.030 <sup>a</sup>	0.0008

<sup>a, b</sup> =medias con diferente literal en una columna son diferentes ( $P \leq 0.0001$ ); FDN = fibra detergente neutro; HA = heno de alfalfa, PA = paja de avena, RM = rastrojo de maíz, EM = ensilado de maíz; SU = substrato sin urea; U1+UP1 = SU + 0.002 g de UP + 0.002 g de U; UP2 = SU + 0.004 g de UP; UP3 = SU + 0.006 g de UP; U2 = SU + 0.004 U; EE = error estándar.

En la concentración de BC el EM adicionado con U + UP causó una mayor población ( $P \leq 0.05$ ) de BC respecto a HA sin U o con U + UP (Cuadro 5), por lo que es posible que exista interacción entre el tipo de forraje y la urea. No se observó efecto ( $P > 0.1$ ) de la U + UP en la población de BC con HA. Aun cuando la cantidad de BC fue baja en los tratamientos, se considera que está dentro del intervalo normal (Yokoyama y Johnson, 1988). Las bajas concentraciones de BC en el presente estudio pueden estar influenciadas por el cambio de su entorno (condiciones *in vivo* a *in vitro*) y al tipo de sustrato que se esté fermentando, lo cual impone un periodo de transición en la población microbiana donde la proporción entre las distintas especies microbianas ruminales

cambiará hacia un nuevo equilibrio para adaptarse mejor al cambio de sustrato (Makie y Gilchrist, 1979; Church, 1993).

Cuadro 5. Población de bacterias celulolíticas en la fermentación *in vitro* de heno de alfalfa (HA) y ensilado de maíz (EM) con o sin la adición de urea (U) o urea protegida con un polímero (UP) a 10 d de incubación.

Forraje	Fuente de urea	Número de bacterias mL <sup>-1</sup> (x 10 <sup>5</sup> )	Intervalo <sup>++</sup>
HA	SU	0.5 <sup>a</sup>	0.1 a 2.3
HA	U+UP	0.5 <sup>a</sup>	0.1 a 2.3
EM	SU	1.1 <sup>ab</sup>	0.2 a 5.1
EM	U+UP	3.3 <sup>b</sup>	0.7 a 15.4

<sup>a, b</sup> = medias con diferente literal en una columna son diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

<sup>++</sup>Intervalo con 95 % de confianza.

HA = heno de alfalfa; EM = ensilado de maíz; SU = sin urea; U+UP= 0.002 g UP+0.002 g U.

**Desaparición *in vitro* de la materia seca (DMS) y FDN:** la DMS *in vitro* de PA, EM y RM se incrementó ( $P \leq 0.001$ ) por efecto de adicionar la mezcla (1:1) de U y UP. Por el contrario, una concentración mayor de urea (U2) o de urea protegida con un polímero (UP2) no afectó ( $P > 0.01$ ) la digestibilidad de estos forrajes, sólo hasta que la cantidad adicionada fue tres veces mayor (UP3; Cuadro 6). El análisis de los datos indica que una parte de la urea debe ser de rápida solubilidad e hidrólisis, pero una proporción similar debe solubilizarse paulatinamente para mejorar la digestibilidad de forrajes con bajo contenido de nitrógeno (PC) o fibrosos. Entonces, una porción de la U debe mostrar una disolución y una hidrólisis elevadas, mientras que la otra fracción debe tener solubilidad paulatina, para así sincronizarse con los carbohidratos de fácil y lenta fermentación contenidos en el forraje; en consecuencia se estimuló del crecimiento microbiano. Esto ha sido observado en otros experimentos (Molina-Alcaide *et al.*, 1996; Carro y Miller, 1999), pero no para forrajes como las leguminosas (HA).



Cuadro 6. Desaparición *in vitro* de forrajes sin y con la adición de urea (U) o urea protegida con un polímero (UP) a 72 h de incubación.

Forraje	Tratamiento				
	SU	U1+UP1	UP2	UP3	U2
HA	67.13 <sup>bdfg</sup>	69.04 <sup>ace</sup>	69.73 <sup>ac</sup>	57.79 <sup>bdfh</sup>	70.28 <sup>a</sup>
PA	55.23 <sup>bdfg</sup>	70.66 <sup>a</sup>	58.84 <sup>bde</sup>	54.69 <sup>bdfg</sup>	63.42 <sup>bc</sup>
EM	64.92 <sup>bde</sup>	71.90 <sup>ac</sup>	64.91 <sup>bdeg</sup>	73.41 <sup>a</sup>	62.14 <sup>bdfg</sup>
RM	69.77 <sup>bde</sup>	79.50 <sup>ac</sup>	68.08 <sup>bdef</sup>	82.02 <sup>a</sup>	67.92 <sup>bdef</sup>
Error estándar	0.7903				

<sup>a, b</sup> = medias con diferente literal en una hilera son diferentes ( $P \leq 0.0001$ ).

HA = heno de alfalfa, PA = paja de avena, RM = rastrojo de maíz, EM = ensilado de maíz  
 SU = sin urea; U1 + UP1 = 0.002 g UP + 0.002 g U; UP2 = 0.004 g UP; UP3 = 0.006 g UP; U2 = 0.004 U.

El comportamiento descrito para la DIVMS por efecto de la adición de urea, en la desaparición *in vitro* de la FDN (DIVFDN) es similar sólo para la FDN del RM. La mezcla de urea y urea protegida con un polímero (U + UP) y de una alta concentración de urea protegida con un polímero (UP3) incrementaron ( $P \leq 0.05$ ) la DIVFDN del RM (Cuadros 6 y 7). Pero con HA el comportamiento fue distinto y la DIVFDN de este forraje se incrementó ( $P \leq 0.05$ ) con la adición del doble y triple de urea protegida con un polímero (UP2, UP3) y la urea sin revestimiento (U2) deprimió la digestibilidad ( $P \leq 0.05$ ), contrariamente a lo ocurrido con el HA completo (Cuadro 6). La adición de urea, protegida o no, no tuvo efecto ( $P > 0.1$ ) en la DIVFDN de la PA ni EM (Cuadro 7). Esta diferencia en el comportamiento de la DIVFDN probablemente es causado por las características intrínsecas de la FDN de cada forraje (Nagadi *et al.*, 2000; Sveinbjörnsson *et al.*, 2006).

Cuadro 7. Desaparición *in vitro* de la fibra detergente neutro (DFDN) de forrajes con la adición de urea (U) o urea protegida con un polímero (UP) a 72 h de incubación.

Forraje	Tratamiento				
	SU	U1+UP1	UP2	UP3	U2
FDN-HA	36.54 <sup>bdf</sup>	35.33 <sup>bdh</sup>	40.73 <sup>a</sup>	40.72 <sup>ac</sup>	32.01 <sup>bdgi</sup>
FDN-PA	43.83 <sup>a</sup>	42.11 <sup>a</sup>	41.00 <sup>a</sup>	38.56 <sup>a</sup>	40.33 <sup>a</sup>
FDN-RM	39.65 <sup>bdef</sup>	54.15 <sup>ac</sup>	41.47 <sup>bdef</sup>	54.56 <sup>a</sup>	46.78 <sup>bde</sup>
FDN-EM	40.58 <sup>a</sup>	39.98 <sup>a</sup>	39.98 <sup>a</sup>	42.34 <sup>a</sup>	42.47 <sup>a</sup>
Error Estándar	3.2515				

<sup>a, b</sup> =medias con diferente literal en una hilera son diferentes ( $P \leq 0.05$ ); FDN = fibra detergente neutro; HA = heno de alfalfa, PA = paja de avena, RM = rastrojo de maíz, EM = ensilado de maíz; SU = sin urea; U1 + UP1 = 0.002 g UP + 0.002 g de U; UP2 = 0.004 g UP; UP3 = 0.006 g UP; U2 = SU + 0.004 U.

## 1.6 Conclusiones

Se concluye que el polímero sintético de revestimiento de la urea, favorece la lenta liberación de la urea en solventes como agua, solución mineral reducida, y líquido ruminal clarificado, pero en este último súbitamente la urea se solubiliza después de 7 h de incubación de manera que en el líquido ruminal completo disminuye la hidrólisis de la urea en amonio. Además, la combinación de urea de rápida solubilidad e hidrólisis y urea protegida con un polímero con solubilidad paulatina (1:1), mejora la fermentación *in vitro* de forrajes y sus FDN con bajo contenido de N y favorece el crecimiento de bacterias celulolíticas.

## 1.7 Literatura citada

- Abdoun, K., F. Stumpff, and H. Martens. 2007. Ammonia and urea transport across the rumen epithelium: a review. *Animal Health Research Reviews* 7: 43-59.
- Antonelli, A. C., Torres G. A. S., Soares P. C., Mori C. S., Sucupira M. C. A., and E. L. Ortonali. 2007. Ammonia poisoning causes muscular but not liver damager in cattle. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 59: 8-13.
- AOAC, 2003. *Official Methods of Analysis*, 17<sup>th</sup> edition. Association of Official Analytical Chemist. Washington, D.C.
- Atasoglu, C., C. J. Newbold, and R. J. Wallace. 2001. Incorporation of [<sup>15</sup>N] ammonia by the cellulolytic ruminal bacteria *Fibrobacter succinogenes* BL2, *Ruminococcus albus* SY3, and *Ruminococcus flavefaciens* 17. *Applied Environmental Microbiology* 67: 2819-2822.
- Atasoglu, C., C. Valde's, N. D. Walker, C. J. Newbold, and R. J. Wallace. 1998. De novo synthesis of amino acids by the ruminal bacteria *Prevotella bryantii* B14, *Selenomonas ruminantium* HD4, and *Streptococcus bovis* ES1. *Applied Environmental Microbiology* 64:2836-2843.
- Bartley, E. E., T. B. Avery, T. G. Nagaraja, B. R. Watt, A. Davidovich, S. Galitzer, and B. Lassman. 1981. Ammonia toxicity in cattle. V. Ammonia concentration of lymph and portal, carotid and jugular blood after the ingestion of urea. *Journal of Animal Science* 53: 494-498.
- Blümmel, M., A. Karsli, and J. R. Russel 2003. Influence of diet on growth yields of rumen microorganisms *in vitro* and *in vivo*: influence on growth yields of variable carbon fluxes to fermentation products. *British Journal of Nutrition* 90: 1-11.
- Blümmel, M., H. Steingab, and K. Becker. 1997. The relationship between *in vitro* gas production, *in vitro* microbial biomass yield and <sup>15</sup>N incorporation and its implications for the predictions of voluntary feed intake of roughages. *British Journal of Nutrition* 77:911-921.
- Bryant, M. P., and I. M. Robinson. 1962. Some nutritional characteristics of predominant culturable runial. *Journal of Bacteriology* 64:605-613.
- Carro, M. D., S. López, C. Valdés, and M. J. Ranilla. 1999. Effect of nitrogen supplementation on the *in vitro* rumen fermentation of nitrogen deficient forages. *Archivos de Zootecnia* 48:295-306.
- Chalupa, W. 1968. Problems in feeding urea to ruminants. *Journal of Animal Science* 27:207-219.

- Church, D. C. 1993. El rumiante. Fisiología Digestiva y Nutrición. Ed. Acriba España. pp: 137-142.
- Cobos, M. A., and M. T. Yokohama. 1995. *Clostridium paratrificum* var. *ruminantium*: colonization and degradation of shrimp carapaces *in vitro* observed by scanning electron microscopy. *In: Rumen Ecology Research Planning*. Wallace R.J. and Lahlou-Kassi (eds). Proceedings of a workshop held at the International Livestock Research Institute (ILRI), Addis Ababa, Ethiopia. pp: 151-161.
- Cone, J. W., and H. A. van Gelder. 1999. Influence of protein fermentation on gas production profiles. *Animal Feed Science and Technology* 76:251-264.
- Currier, T. A., D. W. Bohnert, S. J. Falck, C. S. Schauer, and S. J. Bartle. 2004. Daily and alternate-day supplementation of urea or biuret to ruminants consuming low-quality forage: II. Effects on site of digestion and microbial efficiency in steers. *Journal of Animal Science* 82:1518-1527.
- Fondevila, M., J. C. M. Nogueira-Filho, and A. Barrios-Urdaneta. 2002. *In vitro* microbial fermentation and protein utilisation of tropical forage legumes grown during the dry season. *Animal Feed Science and Technology* 96: 1-14.
- Galo, E., S. M. Emanuele, C. J. Sniffen, J. H. White, and J. R. Knapp. 2003. Effects of a polymer-coated urea product on nitrogen metabolism in lactating Holstein dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 86:2154–2162.
- Golombeski, G. L., K. F. Kalscheur, A. R. Hippen, and D. J. Schingoeth. 2006. Slow-release urea and highly fermentable sugars in diets fed to lactating dairy cows<sup>1</sup>. *Journal of Dairy Science* 89:4395–4403.
- González, R. M., M. Fondevila, A. Barrios-Urdaneta, and Y. Newman. 1998. *In vitro* gas production from buffel grass (*Cenchrus ciliaris*L.) fermentation in relation to the cutting interval, the level of nitrogen fertilisation and the season of grown. *Animal Feed Science and Technology* 72: 19-32.
- Hans-Joachim, G. J. 1997. Analysis of forage fiber and cell walls in ruminant nutrition. *Journal of Nutrition* 127:810-813.
- Harrigan, W. F., y M. E. McCance. 1979. Métodos de Laboratorio en Microbiología de Alimentos y Productos Lácteos. Ed Academia, León España. pp: 361-366.
- Huntington, G. B., D. L. Harmon, N. B. Kristensen, K. C. Hanson, and J. W. Spears. 2006. Effects of a slow-release urea source on absorption of ammonia and endogenous production of urea by cattle. *Animal Feed Science and Technology* 130: 225 – 241.

- Lobley, G. E., D. M. Bremner, and G. Zuur. 2000. Effects of diet quality on urea fates in sheep as assessed by refined, non-invasive [ $^{15}\text{N}$   $^{15}\text{N}$ ] urea kinetics. *British Journal of Nutrition* 84:459-468.
- López, S., M. D. Carro, J. S. González, and F. J. Ovejero. 1999. Comparison of different *in vitro* and *in situ* methods to estimate the extent and rate of degradation of hays in the rumen. *Animal Feed Science and Technology* 73: 99-113.
- Mackie, R. I., and F. M Gilchrist. 1979. Changes in lactate producing and lactate – utilizing bacteria in relation to pH in the rumen of sheep during stepwise adaptation to high – concentrate diet. *Applied Environmental Microbiology* 38:422-430.
- McCullough, H. 1967. The determination of ammonia in whole blood by direct colorimetric method. *Clinical Chemistry* 17: 297-304.
- Menke, K. H., and H. Steingass. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research Development* 28:7-55.
- Nagadi, S., M. Herrero, and N. S. Jessop. 2000. The effect of fermentable nitrogen availability on *in vitro* gas production and degradability of NDF. *Animal Feed Science and Technology* 87: 241-251.
- Oltjen, R. R., L. L. Slyter, A. S. Kozak, and E. E. Williams. 1967. Evaluation of urea, biuret, urea phosphate and uric acid as NPN sources for cattle. *Journal of Nutrition* 94: pp: 68 – 70.
- Ormsby, A. A. 1942. A direct colorimetric method for the determination of urea in blood and urine. *Journal of Biology Chemistry* 146:595-604.
- Owens, F. N., K. S. Lusby, K. Mizwicki, and O. Forero. 1980. Studies slow ammonia release from urea: Rumen and metabolism. *Journal of Animal Science* 50:527-531.
- Pisulewski, P. M., A. U. Okorie, P. J. Buttery, W. Haresign, and D. Lewis. 1981. Ammonia concentration and protein synthesis in the rumen. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 32: 759-766.
- Ramírez, R., R. L. Gonzalo, y F. G. López. 2002. Factores estructurales de la pared celular del forraje que afectan su digestibilidad. *Ciencia UANL* 2:180-189.
- SAS. Institute Inc. 1999. SAS User's Guide Statistics. Version 8.0. Cary North Carolina, USA. pp: 956 - 960.

- Schofield, P., and A. N. Pell. 1995. Measurement and kinetic analysis of the of the neutral detergent-soluble carbohydrate fraction of legumes y grasses. *Journal of Animal Science* 73:3455-3463.
- Schofield, P., and A. N. Pell. 1995. Measurement and kinetic analysis of the neutral detergent-soluble carbohydrate fraction of legumes and grasses. *Journal of Animal Science* 73:3455 – 3463.
- Stern, M. D., G.A. Vargas, J. H. Clark, J. L. Firkins, J. T. Huber, and D. L. Palmquist. 1994. Evaluation of chemical and physical properties of feeds that affect protein metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science* 77:2762-2786.
- Sveinbjörnsson, J., M. Murphy, and P. Udén. 2006. Effect of the proportions of neutral detergent fibre and starch, and their degradation rates on *in vitro* ruminal fermentation. *Animal Feed Science and Technology* 130:172-190.
- Tedeschi, L. O., D. G. Fox, and J. B. Russell. 2000. Accounting for the effects of a ruminal nitrogen deficiency within the structure of the Cornell net carbohydrate and protein system. *Journal of Animal Science* 78:1648-1658.
- Theodorou, M. K., B. A. Williams, M. S. Dhanoa, A. D. B. Mcallan, and J. France. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology* 48: 185 – 197.
- Van Gylswyk, N. O., K. Wejdemar, and K. Kulander. 1992. Comparative growth rates of various rumen bacterias in clarified rumen fluid from cows and sheep fed different diets. *Applied and Environmental Microbiology* pp: 99-105.
- Wang, Z., and L. A. Goonewrdene. 2004. The use of mixed in the analysis of animal experiments with repeated measures data. *Canadian Journal of Animal Science* 84: 1-11.
- Yokoyama, M. T., y K. A. Johnson. 1988. Microbiología del rumen e intestino delgado. *In: El Rumiante, Fisiología Digestiva y Nutrición*. Church, D. C. (ed). Acribia, Zaragoza, España. pp: 137-157.
- Zerbini, E., C. T. Krishan, X.V.A. Victor, and A. Sharma. 2002. Composition and *in vitro* gas production of whole stems and cell walls of different genotypes of pearl millet and sorghum. *Animal Feed Science and Technology* 98: 73-85.

## CAPÍTULO II. EFECTO DE UREA PROTEGIDA CON UN POLÍMERO EN LA DEGRADACIÓN Y VARIABLES DE LA FERMENTACIÓN *in vitro* DE DIETAS (RACIONES TOTALMENTE MEZCLADAS) PARA VACAS LECHERAS

### 2.1 Resumen

En este estudio se evaluó el efecto de la urea (U) protegida con un polímero (UP) en la fermentación (Vm y R), desaparición *in vitro* de MS (DIVMS) y en variables de líquido ruminal (AGV, N-NH<sub>3</sub>, crecimiento de bacterias ruminales, masa microbiana). Los tratamientos (R; tres repeticiones por tratamiento) correspondieron a las dietas formuladas como raciones totalmente mezcladas (RTM): R1 = RTM testigo (2000 g soya animal<sup>-1</sup>); R2 = 120 g UP animal<sup>-1</sup> + 1210 g soya animal<sup>-1</sup>; R3 = 120 g U animal<sup>-1</sup> + 1210 g soya animal<sup>-1</sup>; R4 = 60 g UP animal<sup>-1</sup> + 60 g U animal<sup>-1</sup> + 1210 g soya animal<sup>-1</sup>; R5 = 180 g UP animal<sup>-1</sup> + 610 g soya animal<sup>-1</sup>; R6 = 120 g UP animal<sup>-1</sup> + 120 g U animal<sup>-1</sup> + energía balanceada; R7 = 120 g UP animal<sup>-1</sup> + 120 g U animal<sup>-1</sup> + aminoácidos balanceados; R8 = 120 g UP animal<sup>-1</sup> + 120 g U animal<sup>-1</sup> + energía balanceada + aminoácidos balanceados. El diseño experimental fue completamente al azar con medidas repetidas a través del tiempo; los datos se analizaron con REPEATED MEASURE y el efecto tiempo con PROC MIXED de SAS. La combinación de U y UP con un adecuado balance de aminoácidos y energía (R8) aumentó ( $P \leq 0.001$ ): 1) la UFC de bacterias ruminales, Vm, R y DIVMS a las 24, 48 y 72 h; 2) la concentración de AGV a las 48 y 72 h; 3) el ácido propiónico a las 24 h; pero la concentración de N-NH<sub>3</sub> se redujo a las 24 y 72 h ( $P \leq 0.001$ ). Se puede concluir que la sustitución de parte del N proteínico (soya) por la combinación de U + UP más un adecuado balance de aminoácidos y energía causó un efecto positivo en las variables de degradación y fermentación *in vitro* para raciones totalmente mezcladas formuladas para vacas lecheras.

Palabra claves: urea, ración totalmente mezclada, líquido ruminal, masa microbiana, fermentación *in vitro*.



## 2.2 Abstract

### EFFECT OF UREA PROTECTED WITH A POLYMER ON *IN VITRO* DEGRADATION AND FERMENTATION VARIABLES IN DIETS (TOTAL MIXED RATIONS) FOR DAIRY COWS

The effect of a polymer-coated urea (PU) on the *in vitro* fermentation (Vm and R) and DM disappearance (DIVMS), as well as on ruminal fluid variables (AGV, NH<sub>3</sub>-N, ruminal bacteria growth, microbial mass), was evaluated in this study. Treatments (R; three replications per treatment) were diets formulated as total mixed rations (TMR): R1 = RTM<sub>control</sub> (2000 g soybean animal<sup>-1</sup>); R2 = 120g PU animal<sup>-1</sup> + 1210 g soybean animal<sup>-1</sup>; R3 = 120g U animal<sup>-1</sup> + 1210 g soybean animal<sup>-1</sup>; R4 = 60 g PU animal<sup>-1</sup> + 60 g U animal<sup>-1</sup> + 1210 g soybean animal<sup>-1</sup>; R5 = 180 g PU animal<sup>-1</sup> + 610 g PU animal<sup>-1</sup>; R6 = 120 g PU animal<sup>-1</sup> + 120 g U animal<sup>-1</sup> + balanced energy; R7 = 120 g PU animal<sup>-1</sup> + 120 g PU animal<sup>-1</sup> + balanced amino acids; R8 = 120 g PU animal<sup>-1</sup> + 120g U animal<sup>-1</sup> + balanced energy + balanced amino acids. The experimental design was completely randomized with repeated measured trough time; data were analyzed with REPEATED MEASURE and the time effect was evaluated with PROC MIXED (SAS). The combination of U and PU with an adequate balance of amino acids and energy (R8) increased ( $P \leq 0.001$ ): 1) UFC ruminal bacterial, Vm, R y DIVMS at 24, 48 and 72 h; 2) VFA concentration at 48 y 72 h; 3) propionic acid at 24 h; but NH<sub>3</sub>-N concentration was decreased at 24 and 72 h ( $P \leq 0.001$ ). It may be concluded that substitution of protein N (soybean) by the combination of U + UP plus an adequate balance of amino acid and energy showed a positive effect on *in vitro* degradation and fermentation variables of total mixed rations formulated for dairy cows.

Key words: polymer-coated urea, ruminal fluid, microbial mass, *in vitro* degradation.

### 2.3 Introducción

La soya es la fuente de proteína más utilizada en la alimentación de vacas productoras de leche por su palatabilidad, patrón de AA y alto aprovechamiento, similar a la proteína microbiana ruminal. Sin embargo, entre 25 y 34 % de la proteína de la soya es degradada a N-NH<sub>3</sub> y ácidos orgánicos en el rumen (NRC 2001), limitando su valor nutricional para las vacas altas productoras de leche; además, el alto precio de la soya incrementa los costos de producción. En este contexto, se ha propuesto sustituir parte del N proteínico por urea sintética (Helmer y Bartley, 1971; Russell, 2002; Akay *et al.*, 2004). Sin embargo, la urea es hidrolizada rápidamente en rumen ocasionando que en menos de 5 min haya una elevada concentración de N-NH<sub>3</sub>, exponiendo al rumiante a efectos tóxicos y causando, en casos extremos, la muerte (Abduon *et al.*, 2007). Para reducir la tasa de hidrólisis de la urea en rumen y aumentar la utilización del N-NH<sub>3</sub> en la síntesis de proteína microbiana, la urea se ha combinado o unido a fosfatos, almidón de cereales, aceites, cloruro de Ca<sup>+</sup> y polímeros sintéticos (Owens *et al.*, 1980; Galo *et al.*, 2003; Currier *et al.*, 2004; Huntington *et al.*, 2006). También se ha pretendido sincronizar la tasa de hidrólisis de urea con la disponibilidad de carbohidratos de fácil fermentación para incrementar la síntesis de proteína microbiana (Valkeners *et al.*, 2004; Hristov *et al.*, 2005). Estas propuestas no han dado los resultados esperados debido a que: la sustitución parcial o total de N proteínico por urea disminuye el crecimiento de poblaciones microbianas (amilolíticas) que requieren de AA y péptidos (Atasoglu *et al.*, 2001), los carbohidratos están parcialmente disponibles para las bacterias ruminales (Henning *et al.*, 1993) y la liberación de la urea sigue siendo rápida o no es utilizada por las bacterias ruminales (Golombeski *et al.*, 2006). Por tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de sustituir parte del N proteínico en dietas formuladas para vacas lecheras por urea protegida con un polímero en la fermentación y desaparición *in vitro* de MS, energía metabolizable y en variables de líquido ruminal (AGV, N-NH<sub>3</sub>, crecimiento de bacterias celulolíticas, masa microbiana).

### 2.4 Materiales y métodos

Las pruebas de digestibilidad y fermentación *in vitro* y la determinación de variables en líquido ruminal se realizaron en el laboratorio de Microbiología Pecuaria del Departamento de Zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo, Texcoco, Estado de México. Así mismo, el presente estudio se realizó con la aprobación del Comité Académico del Programa de Ganadería

del Colegio de Postgraduados y de acuerdo con las normas de protección ambiental dictadas por el Gobierno del Estado de México.

#### 2.4.1 Raciones totalmente mezcladas (RTM) y tratamientos

Los tratamientos (T) fueron ocho raciones (R) totalmente mezcladas (RTM) formuladas con el programa de predicción CNCPS V6.1.12 (The Cornell Net Carbohydrate and Protein System, desarrollado por la Universidad de Cornell Ithaca, N.Y., USA), de acuerdo con los requerimientos nutricionales de vacas lecheras con tres lactancias, 685 kg PV<sup>75</sup> y producción de 50 kg leche d<sup>-1</sup> (NRC, 2001). La cantidad de urea protegida con un polímero adicionado en las raciones fue 120 g<sup>-1</sup> vaca<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, que es la dosis recomendada por Alltech de México de S.A de C.V. Los tratamientos (raciones, R) fueron: R1 = RTM testigo (2000 g soya animal<sup>-1</sup>); R2 = 120 g UP (urea protegida con un polímero) animal<sup>-1</sup> + 1210 g soya animal<sup>-1</sup>; R3 = 120 g U (urea) animal<sup>-1</sup> + 1210 g soya animal<sup>-1</sup>; R4 = 60 g UP animal<sup>-1</sup> + 60 g U animal<sup>-1</sup> + 1210 g soya animal<sup>-1</sup>; R5 = 180 g UP animal<sup>-1</sup> + 610 g soya animal<sup>-1</sup>; R6 = 120 g UP animal<sup>-1</sup> + 120 g U animal<sup>-1</sup> + energía balanceada; R7 = 120 g UP animal<sup>-1</sup> + 120 g U animal<sup>-1</sup> + aminoácidos balanceados; R8 = 120 g UP animal<sup>-1</sup> + 120 g de U animal<sup>-1</sup> + energía balanceada + aminoácidos balanceados (Cuadro 8 y 9).

#### 2.4.2 Obtención y almacenamiento de muestras

**Desaparición y fermentación *in vitro* de la MS:** se colocó 0.5 g MS de substrato (molida con criba de 2 mm) con 90 mL de inóculo ruminal estandarizado<sup>9</sup> (Theodorou *et al.*, 1994), e incubados por 72 h a 38 °C.

**Desaparición *in vitro* de la MS:** se colocó 0.5 g de muestra (molida con criba de 2 mm) con 90 mL de inóculo ruminal estandarizado<sup>9</sup> (Theodorou *et al.*, 1994; López *et al.*, 1999), e incubados por 0, 12, 24, 48 y 72 h a 38 °C. La digestibilidad *in vitro* de MS sólo se realizó en las tratamientos que presentaron diferencias significativas ( $P \leq 0.01$ ) en el volumen máximo de producción de gas.

---

<sup>9</sup> Líquido ruminal completo diluido (1:10 v/v) con solución mineral reducida la cual se preparó de acuerdo con Bryant y Robinson (1962), Anexo A.

Cuadro 8. Ingredientes de las raciones totalmente mezcladas (RTM) como % de la materia seca total y formuladas para vacas lecheras de 685 kg PV y una producción de 50 kg de leche d<sup>-1</sup> \*.

Ingredientes	Ración (R)							
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
Ensilado maíz	29.08	29.79	29.79	29.79	30.21	29.89	30.65	29.58
Heno de alfalfa	20.51	21.02	21.02	21.02	21.32	21.09	21.62	20.87
Pasta de soya 44%	6.85	4.25	4.25	4.25	2.17	--	--	--
Melaza de caña	2.12	2.18	2.18	2.18	2.21	2.18	2.24	2.16
Pasta de semilla de algodón	10.62	10.88	10.88	10.88	11.03	10.92	11.19	10.80
Paja de avena	1.78	1.82	1.82	1.82	1.78	1.83	1.88	1.81
Pasta de gluten de maíz	2.26	2.28	2.28	2.28	2.31	2.29	2.35	2.26
Megalac	0.92	0.95	0.95	0.95	0.96	0.00	0.97	1.05
Maíz en hojuelas	23.46	24.04	24.04	24.04	24.56	27.25	24.73	26.97
Carbonato de Ca	0.24	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.24
Sal común (NaCl)	0.03	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.03
Harina de pescado	2.02	2.04	2.04	2.04	2.06	2.04	2.09	2.02
Vitasal lechero <sup>1</sup>	0.17	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18	0.17
Urea protegida 1200	--	0.42	--	0.21	0.64	0.42	0.43	0.42
Urea	--	--	0.42	0.21	--	0.42	0.43	0.42
DL- Metionina	--	--	--	--	--	--	0.11	0.10
L-lisina HCL	--	--	--	--	--	--	0.90	0.91

<sup>1</sup>Vitasal lechero®: Ca 17 %, P 12 %, Mg 5%, Na 7%, Cl 10.5%, K 0.04 %, S 504 ppm, Mn 400 ppm, Fe 2939 ppm, Zn 6000 ppm, Cu 1000 ppm, I 500 ppm, Se 40 ppm, Co 60 ppm, Vit. A 35000 UI, Vit. D 150 000 UI y Vit. E 150 ppm. Dosis recomendada 15 kg t<sup>-1</sup> de alimento o 20 kg t<sup>-1</sup> de concentrado; Distribuidora Veterinaria de Texcoco, S.A. de C.V.

<sup>2</sup>Se usó como referencia la dosis de 120 g<sup>-1</sup> vaca<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> recomendada por Alltech de México S.A de C.V.

\*NRC 2001.

**Energía metabolizable y masa microbiana:** se colocó 0.5 g de muestra (molida con criba de 2 mm) con 90 mL de inoculo ruminal estandarizado<sup>9</sup> (Theodorou *et al.*, 1994), e incubados por 25 h a 38 °C.

Cuadro 9. Composición de nutrimentos (%) de la RTM en base seca

Nutriente	Ración							
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8
Energía metabolizable (Mcal kg <sup>-1</sup> MS)	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8
Energía neta lactancia (Mcal kg <sup>-1</sup> MS)*	1.80	1.80	1.80	1.80	1.80	1.81	1.71	1.81
Proteína (% MS)	18.1	18.2	18.0	18.3	18.0	18.1	18.0	18.0
Proteína soluble (% PC)*	29.0	33.0	34.0	34.0	33.0	31.0	29.0	27.0
Consumo de proteína degradable (%)*	59.0	59.0	61.0	61.0	60.0	59.0	60.0	57.0
Fibra detergente neutra (% MS)	32.1	32.1	32.0	32.4	31.7	32.1	32.3	31.8
Fibra detergente neutra efectiva (kg d <sup>-1</sup> )*	0.7	0.7	0.7	0.8	0.7	0.7	0.8	0.5
Forraje en la ración (% MS)	53.0	53.0	53.0	54.0	52.0	53.0	53.0	51.0
Ca (%)	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	78.0	0.8	0.8
P (%)	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Metionina*	2.1	2.2	2.1	2.4	2.4	2.4	2.2	2.1
Lisina*	6.1	6.1	6.1	7.2	7.2	6.1	6.1	6.1

\*Valores calculados por el programa de predicción CNCPS V6.1.12.

### 2.4.3 Procesamiento de muestras y análisis de laboratorio

**Producción de gas:** se tomaron lecturas de presión de gas<sup>10</sup> (kg cm<sup>-2</sup>) a 0, 2, 4, 6, 8, 10, 16, 22, 28, 34, 42, 50, 58, 68 y 72 h de incubación, los valores se transformaron a volumen de gas con la ecuación de regresión lineal  $V = (P + 0.0186) (0.0237)^{-1}$ . Con los resultados obtenidos, el modelo logístico  $VA = Vm / (1 + \exp(2-4 * s * (t-L)))$ , y el procedimiento NLIN de SAS (1999), se calcularon los parámetros de cinética de producción de gas: volumen máximo de gas producido (Vm) y tasa de producción de gas (R) de MS (Schofield y Pell, 1995).

**Desaparición *in vitro* de la MS:** se determinó recuperando el residuo de los frascos por filtración a través de papel Whatman No. 541, el residuo recuperado se secó por 24 h a 60°C, después se pesó y calculó el porcentaje de material degradado (Cobos & Yokohama, 1995).

**Energía metabolizable y masa microbiana:** los valores de producción de gas se sustituyeron en la formula EM (Mjoules kg<sup>-1</sup> MS) = 2.20 + 0.136 producción de gas<sub>24h</sub> + 0.057 proteína (Blümmel et al., 1997). La masa microbiana se calculó con la formula: Masa microbiana (mg) = mg de sustrato degradado verdadero – (mL de gas x 2.2); (Makkar, 2001).

**Concentración de AGV y N-NH<sub>3</sub>:** se determinó en cada tratamiento a 0, 12, 24, 48 y 72 h de incubación. Se centrifugó 15 min a 9469 g, 4 mL de medio incubado con 1mL de ácido metafosfórico (25 %). Del sobrenadante 1 mL fue usado para determinar la concentración de AGV por cromatografía de gases<sup>11</sup> (Hess *et al.*; 2003) y 20 µL con 1 mL de fenol (10 %), y 1 mL hipoclorito de sodio basificado con NaOH (5 g NOH y 10 mL hipoclorito de sodio) para determinar N-NH<sub>3</sub> mediante espectrofotometría de luz visible<sup>12</sup> (630 nm; AOAC, 2003).

**Población total de bacterias viables:** se tomó una muestra de cada tratamiento a 0, 24, 48 y 72 h de incubación. Un mL de muestra se mezcló con 9 mL de solución mineral reducida estéril<sup>13</sup> (SMRE) y se realizaron diluciones 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-10</sup>. Un mL de cada dilución se sembró en medios de cultivo con agar (Cuadro 10) y se mantuvo de 42 a 45 °C en baño María (Mann, 1968). Para

---

<sup>10</sup> La presión se tomó con un manómetro con escala de 0 a 1 kg cm<sup>-2</sup>

<sup>11</sup> Cromatografo de gases XL, Perkin Elmer Instruments; Shelton, CT, equipado con un detector de ionización por flama y columna capilar, Maca, Elite-FFAP, Perkin Elmer Instruments, 30 cm largo x 0.32 diámetro interior x 0.25 µm grosor de cobertura.

<sup>12</sup> Espectrofotómetro UV-visible Marca VARIAN, Modelo CARY 1E;

<sup>13</sup> La SMRE se preparo de acuerdo a Bryant y Robinson (1962), Anexo A.

solidificar, el medio fue rodado en agua fría. Se incubaron a 39 °C por 48 h (Hungate, 1969). Después se realizó el conteo de las colonias formadas (UFC).

Cuadro 10. Composición del medio de cultivo para conteo de bacterias ruminales viables, por cada 100 mL de medio de cultivo.

Reactivos	Cantidad de reactivo
Agua destilada	52.6
Líquido ruminal clarificado (LRc) <sup>1</sup>	30.0
Solución mineral I <sup>2</sup>	7.5
Solución mineral II <sup>2</sup>	7.5
Resarzurina solución al 0.1% <sup>2</sup>	0.1
Carbonato de sodio solución al 8 % <sup>2</sup>	5.0
Solución de sulfito - cisteína <sup>2</sup>	2.0
Tripticasa – Peptona (g)	0.3
Extracto de levadura (g)	0.3
Glucosa (g)	0.2
Celobiosa (g)	0.2
Agar (g)	1.8

<sup>1</sup> LR filtrado con gasa triple, fue centrifugado 15 min a 12857 g y esterilizado 15 min a 121 °C.

<sup>2</sup> Descritos en la solución mineral reducida del Anexo A.

#### 2.4.4 Variables de respuesta, diseño experimental y modelo estadístico

Las variables de respuesta del ambiente ruminal fueron: concentración (mMol dL<sup>-1</sup>) y proporción molar (%) de AGV, concentración de N-NH<sub>3</sub> (mMol dL<sup>-1</sup>) y población de bacterias ruminales viables (log<sub>10</sub> UFC). Otras variables de respuesta fueron desaparición (%) y fermentación *in vitro* (Vm y R) de la MS por la técnica de producción de gas, energía metabolizable (MJ kg<sup>-1</sup> MS), y masa microbiana (mg g<sup>-1</sup> MS).

El diseño experimental fue completamente al azar con medidas repetidas a través del tiempo (REPEATED MEASURES), donde las unidades experimentales (frascos) se distribuyeron en forma aleatoria en ocho tratamientos, con tres repeticiones por tratamiento. Para evaluar el efecto

tiempo se utilizó el procedimiento MIXED (SAS, 1999) de acuerdo con lo propuesto por Littell *et al.* (1998) y Wang y Goonwardese (2004).

El análisis de varianza fue realizado con el procedimiento MIXED de SAS (SAS, 2000), usando el siguiente modelo estadístico.

$$Y_{ijk} = \mu + \delta_i + \tau_j + (\delta\tau)_{ij} + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

$Y_{ij}$  = variable de respuesta

$\mu$  = media general

$\delta_i$  = efecto fijo del  $i$ -ésimo tratamiento

$\tau_j$  = efecto del  $j$ -ésimo factor (periodo, tiempo)

$(\delta\tau)_{ij}$  = efecto fijo de la interacción del  $i$ -ésimo tratamiento con el  $j$ -ésimo periodo

$\varepsilon_{ij}$  = error experimental.



## 2.5 Resultados y discusión

### 2.5.1 Ambiente ruminal

**Población de bacterias ruminales viables:** La concentración de UFC (Cuadro 11) de bacterias ruminales se incrementó significativamente después de 24 ( $P \leq 0.05$ ), 48 ( $P \leq 0.05$ ) y 72 ( $P \leq 0.05$ ) h de incubación por efecto de sustituir 2000 g de pasta de soya en la RTM por 240 g de urea (U + UP) con un adecuado balance de energía y AA. El incremento en la UFC puede ser atribuido a la disponibilidad de carbohidratos (France *et al.*, 2005; Hristov *et al.*, 2005), AA (Russell *et al.*, 1992; Atasoglu *et al.*, 2006) y N-NH<sub>3</sub> para la síntesis de proteína microbiana (Huntington *et al.*, 2006). En la hora 0 de incubación no se observaron cambios en la concentración de UFC entre los diferentes tratamientos, probablemente porque las bacterias ruminales requieren de un periodo normal (fase lag) para su proceso de selección y adaptación a un nuevo ambiente.

Cuadro 11. Efecto de urea y urea protegida con un polímero en el crecimiento de la población de bacterias ruminales *in vitro* ( $\log_{10}$  UFC).

Tratamientos	Tiempo de incubación (h)			
	0	24	48	72
R1	8.02 <sup>a</sup>	11.05 <sup>b</sup>	9.24 <sup>b</sup>	5.18 <sup>b</sup>
R2	8.34 <sup>a</sup>	11.03 <sup>b</sup>	9.08 <sup>b</sup>	5.20 <sup>b</sup>
R3	8.45 <sup>a</sup>	10.78 <sup>b</sup>	9.09 <sup>b</sup>	5.78 <sup>b</sup>
R8	7.91 <sup>a</sup>	11.75 <sup>a</sup>	10.84 <sup>a</sup>	6.49 <sup>a</sup>
Error estándar	0.3440	0.3440	0.3440	0.3440

<sup>a, b</sup> = medias con diferente literal en una columna son diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

R1 = RTM testigo (2000 g soya animal<sup>-1</sup>); R2 = 120 g UP (urea protegida con un polímero) animal<sup>-1</sup> + 1210 g de soya animal<sup>-1</sup>; R3 = 120 U (urea) animal<sup>-1</sup> + 1210 g soya animal<sup>-1</sup>; y R8 = 120 g de UP animal<sup>-1</sup> + 120 g de U animal<sup>-1</sup> + energía balanceada. + AA balanceados.

UFC = unidades formadoras de colonias.

**Concentración de ácidos grasos volátiles:** La concentración total de AGV (acético, propiónico y butírico) se muestra en el Cuadro 12. En la hora 24 de incubación la concentración total de AGV fue menor en la RTM testigo ( $P \leq 0.001$ ) con respecto a las dietas con urea (U o UP). En contraste, se incrementó la concentración total de AGV en la hora 48 ( $P \leq 0.001$ ) y 72 ( $P \leq 0.001$ ) de incubación por efecto de la combinación de U + UP con un adecuado balance de energía y AA en la RTM, con respecto a la RTM testigo.

Cuadro 12. Efecto *in vitro* de urea y urea protegida con un polímero en la concentración de ácidos grasos volátiles total (mM) durante 72 h de incubación de RTM, formuladas para vacas lecheras.

Tratamientos	Tiempo de incubación			
	0	24	48	72
R1	8.6 <sup>a</sup>	11.8 <sup>bdf</sup>	21.4 <sup>bc</sup>	36.6 <sup>bc</sup>
R2	8.9 <sup>a</sup>	13.9 <sup>ace</sup>	21.2 <sup>bce</sup>	35.4 <sup>bce</sup>
R3	8.5 <sup>a</sup>	14.2 <sup>ac</sup>	20.2 <sup>bce</sup>	35.9 <sup>bce</sup>
R8	8.4 <sup>a</sup>	14.6 <sup>a</sup>	23.0 <sup>a</sup>	44.2 <sup>a</sup>
Error estándar	0.3851	0.5446	0.3851	0.5446

<sup>a, b, d</sup> = medias con diferente literal en una columna son diferentes ( $P \leq 0.001$ ).

R1 = RTM testigo (2000 g soya animal<sup>-1</sup>); R2 = 120 g UP (urea protegida con un polímero) animal<sup>-1</sup> + 1210 g soya animal<sup>-1</sup>; R3 = 120 U (urea) animal<sup>-1</sup> + 1210 g soya animal<sup>-1</sup> y R8 = 120 g de UP animal<sup>-1</sup> + 120 g de U animal<sup>-1</sup> + energía balanceada + AA balanceados.

Los resultados en la proporción de ácido acético, propiónico, y butírico y la relación acético:propiónico del presente estudio se muestran en el Cuadro 13. En la hora 24 disminuyó la proporción de ácido acético ( $P \leq 0.001$ ) y la relación acético:propiónico ( $P \leq 0.001$ ), y aumentó ( $P \leq 0.001$ ) la proporción de ácido propiónico por efecto de la combinación de U + UP con un adecuado balance de energía y AA, con respecto a la RTM testigo. Los resultados pueden explicarse por la cantidad de concentrado en las RTM (53:47; forraje:concentrado) usadas en el experimento y, en parte, al proceso de selección biológica de bacterias que metabolizan ácido propiónico y succinato, y menos acético, butírico, formato y metano. La concentración de AGV en este estudio se encuentra dentro del intervalo considerado normal (Owens y Goetsch, 1993; Church, 1993).

Cuadro 13. Efecto *in vitro* de urea y urea protegida con un polímero en la concentración de ácidos grasos volátiles (mM) durante 72 h de incubación de RTM, formuladas para vacas lecheras.

Tratamiento	Tiempo de incubación				Error estándar
	0	24	48	72	
Acético					
R1	63.2 <sup>a</sup>	66.7 <sup>ace</sup>	72.1 <sup>a</sup>	70.0 <sup>a</sup>	1.067
R2	64.6 <sup>a</sup>	67.0 <sup>a</sup>	71.0 <sup>a</sup>	69.0 <sup>a</sup>	
R3	64.2 <sup>a</sup>	66.9 <sup>ace</sup>	71.1 <sup>a</sup>	71.2 <sup>a</sup>	
R8	62.7 <sup>a</sup>	63.7 <sup>bdf</sup>	70.5 <sup>a</sup>	69.0 <sup>a</sup>	
Propiónico					
R1	27.0 <sup>a</sup>	22.0 <sup>bcd</sup>	17.3 <sup>a</sup>	18.2 <sup>a</sup>	0.954
R2	27.2 <sup>a</sup>	22.2 <sup>bcd</sup>	17.3 <sup>a</sup>	19.7 <sup>a</sup>	
R3	25.7 <sup>a</sup>	23.0 <sup>bc</sup>	17.4 <sup>a</sup>	18.4 <sup>a</sup>	
R8	26.7 <sup>a</sup>	24.8 <sup>a</sup>	18.3 <sup>a</sup>	20.2 <sup>a</sup>	
Butírico					
R1	9.8 <sup>a</sup>	11.2 <sup>a</sup>	10.6 <sup>a</sup>	11.8 <sup>a</sup>	0.943
R2	8.3 <sup>a</sup>	10.9 <sup>a</sup>	11.6 <sup>a</sup>	11.3 <sup>a</sup>	
R3	10.2 <sup>a</sup>	10.1 <sup>a</sup>	11.5 <sup>a</sup>	10.3 <sup>a</sup>	
R8	10.6 <sup>a</sup>	11.5 <sup>a</sup>	11.2 <sup>a</sup>	10.8 <sup>a</sup>	
Acético:propiónico					
R1	2.3 <sup>a</sup>	3.0 <sup>a</sup>	4.3 <sup>a</sup>	3.9 <sup>a</sup>	0.215
R2	2.4 <sup>a</sup>	3.0 <sup>ac</sup>	4.1 <sup>a</sup>	3.5 <sup>a</sup>	
R3	2.5 <sup>a</sup>	2.9 <sup>ace</sup>	4.1 <sup>a</sup>	3.9 <sup>a</sup>	
R8	2.4 <sup>a</sup>	2.6 <sup>bdf</sup>	3.8 <sup>a</sup>	3.4 <sup>a</sup>	

<sup>a, b, d</sup> = medias con diferente literal en una columna son diferentes ( $P \leq 0.001$ ).

R1 = RTM testigo (2000 g soya animal<sup>-1</sup>); R2 = 120 g UP (urea protegida con un polímero) animal<sup>-1</sup> + 1210 g soya animal<sup>-1</sup>; R3 = 120 U (urea) animal<sup>-1</sup> + 1210 g soya animal<sup>-1</sup> y R8 = 120 g de UP animal<sup>-1</sup> + 120 g de U animal<sup>-1</sup> + energía balanceada + AA balanceados.

**Concentración de nitrógeno amoniacal (N-NH<sub>3</sub>):** Se incrementó la concentración de N-NH<sub>3</sub> en la hora 24 y 48 ( $P \leq 0.01$ ) de incubación debido al efecto de sustituir 40% de pasta de soya por U en la ración. No obstante, la concentración de N-NH<sub>3</sub> disminuyó en la hora 48 ( $P \leq 0.01$ ) y 72 ( $P \leq 0.01$ ) de incubación por efecto de la combinación de U + UP con un adecuado balance de energía y aminoácidos en la RTM, con respecto a la RTM testigo. Los resultados podrían atribuirse a la lenta liberación de la urea en el medio, favoreciendo la sincronización de energía con la disponibilidad de N-NH<sub>3</sub> para la síntesis de proteína (France *et al.*, 2005; Huntington *et al.*, 2006; Russell *et al.*, 1992; Atasoglu *et al.*, 1998, 2006).

Cuadro 14. Efecto *in vitro* de urea y urea protegida con un polímero en la concentración de N-NH<sub>3</sub> (mMol dL<sup>-1</sup>) durante 72 h de incubación de RTM formuladas para vacas lecheras.

Tratamientos	Tiempo de incubación			
	0	24	48	72
R1	10.0 <sup>a</sup>	24.7 <sup>bce</sup>	31.2 <sup>bc</sup>	37.8 <sup>ac</sup>
R2	11.8 <sup>a</sup>	24.8 <sup>bc</sup>	30.6 <sup>bce</sup>	37.4 <sup>ace</sup>
R3	11.4 <sup>a</sup>	32.3 <sup>a</sup>	37.6 <sup>a</sup>	39.8 <sup>a</sup>
R8	11.2 <sup>a</sup>	23.8 <sup>bce</sup>	28.1 <sup>bdf</sup>	30.9 <sup>bdf</sup>
Error estándar	1.12			

<sup>a, b, d</sup> = medias con diferente literal en una columna son diferentes ( $P \leq 0.001$ ).

R1 = RTM testigo (2000 g soya animal<sup>-1</sup>); R2 = 120 g UP (urea protegida con un polímero) animal<sup>-1</sup> + 1210 g soya animal<sup>-1</sup>; R3 = 120 U animal<sup>-1</sup> + 1210 g soya animal<sup>-1</sup> y R8 = 120 g de UP animal<sup>-1</sup> + 120 g de U animal<sup>-1</sup> + energía balanceada + AA balanceados.

Aun cuando la concentración de N-NH<sub>3</sub> puede variar de 8.8 a 56.1 mMol dL<sup>-1</sup> de fluido ruminal (Rogers *et al.*, 1986), Mehrez y Orskov (1977) observaron que la concentración *in vitro* de N-NH<sub>3</sub> requerida para una máxima síntesis de proteína microbiana por unidad de substrato fermentado varía de 5 a 6 mMol dL<sup>-1</sup> en liquido ruminal. Por tanto, la sustitución de la pasta de soya en la RTM por U o UP mantiene la concentración de N-NH<sub>3</sub> del presente experimento en el intervalo normal reportado en la literatura.

## 2.5.2 Desaparición y fermentación *in vitro* de la MS de RTM para vacas lecheras

**Parámetros de cinética de producción de gas:** La sustitución en la RTM de 39.5 o 100 % de la pasta de soya por urea (U o UP) disminuyó ( $P \leq 0.001$ ) la Vm. En cambio Vm se incrementó ( $P \leq 0.001$ ) cuando en la RTM se sustituyeron los 2000 g de pasta de soya por 240 g de urea (U + UP) y con un adecuado balance de energía y AA. Además, el efecto de la combinación de U + UP en la ración con un adecuado balance de energía y sin importar el contenido de aminoácidos, disminuyó ( $P \leq 0.001$ ) la tasa de producción de gas (R). Sin embargo, R aumentó ( $P \leq 0.001$ ) cuando en la ración se sustituye 39.5 % de la pasta de soya por urea (Cuadro 15).

Cuadro 15. Parámetros de cinética de producción de gas (Vm, y R) por la fermentación *in vitro* de ocho RTM formuladas para vacas lecheras.

Tratamientos	Variables	
	V (mL g <sup>-1</sup> )	R (h <sup>-1</sup> )
R1	371 <sup>b</sup>	2.83 <sup>bc</sup>
R2	314 <sup>c</sup>	2.79 <sup>c</sup>
R3	318 <sup>c</sup>	2.90 <sup>a</sup>
R4	330 <sup>c</sup>	2.82 <sup>bc</sup>
R5	353 <sup>b</sup>	2.80 <sup>c</sup>
R6	364 <sup>b</sup>	2.70 <sup>d</sup>
R7	367 <sup>b</sup>	2.86 <sup>ab</sup>
R8	394 <sup>a</sup>	2.71 <sup>d</sup>
Error estándar	56.16	0.0001

<sup>a, b</sup> = medias con diferente literal en una columna son diferentes ( $P \leq 0.001$ ).

<sup>1</sup> Valores multiplicados x 10<sup>-2</sup>.

R1 = RTM testigo (2000 g soya animal<sup>-1</sup>); R2 = 120 g UP (urea protegida con un polímero) animal<sup>-1</sup> + 1210 g soya animal<sup>-1</sup>; R3 = 120 U (urea) animal<sup>-1</sup> + 1210 g soya animal<sup>-1</sup>; R4 = 60 g UP animal<sup>-1</sup> + 60 g U animal<sup>-1</sup> + 1210 g soya animal<sup>-1</sup>; R5 = 180 g UP animal<sup>-1</sup> + 610 g soya; R6 = 120 g UP animal<sup>-1</sup> + 120 g U animal<sup>-1</sup> + energía balanceada; R7 = 120 g UP animal<sup>-1</sup> + 120 g U animal<sup>-1</sup> + AA balanceados; R8 = 120 g UP animal<sup>-1</sup> + 120 g de U animal<sup>-1</sup> + energía balanceada + AA balanceados.

El análisis de los resultados probablemente indica que un adecuado balance de energía en la ración puede estar involucrado en una rápida degradación del concentrado contenido en la ración, lo que concuerda con lo reportado por Opatpatanakit *et al.* (1994) quienes indican que existe una alta correlación entre la producción de gas *in vitro* y la disponibilidad del almidón en los granos de los cereales. Además, Akay *et al.* (2004), Atasoglu *et al.* (2006) y Hristov *et al.* (2005) señalan que la fermentación de los sustratos depende de los componentes celulares que fermentan rápidamente (carbohidratos no estructurales) y de la fibra lentamente degradable (carbohidratos estructurales), así mismo por la disponibilidad de N y AA para el crecimiento óptimo de los microorganismos ruminales.

Cuadro 16. Energía metabolizable y masa microbiana en RTM, formuladas para vacas lecheras.

Tratamientos	Variables	
	EM (Mcal kg <sup>-1</sup> MS)	Masa microbiana (mg g <sup>-1</sup> MS)
R1	2.80 <sup>a</sup>	194.25 <sup>bc</sup>
R2	2.74 <sup>a</sup>	182.59 <sup>bd</sup>
R3	2.76 <sup>a</sup>	175.62 <sup>bd</sup>
R4	2.76 <sup>a</sup>	176.68 <sup>bd</sup>
R5	2.76 <sup>a</sup>	176.87 <sup>bd</sup>
R6	2.79 <sup>a</sup>	181.77 <sup>bd</sup>
R7	2.73 <sup>a</sup>	170.08 <sup>bd</sup>
R8	2.79 <sup>a</sup>	197.08 <sup>a</sup>
Error estándar	0.03128	5.3884

<sup>a, b</sup> = medias con diferente literal en una columna son diferentes ( $P \leq 0.001$ ).

R1 = RTM testigo (2000 g soya animal<sup>-1</sup>); R2 = 120 g UP (urea protegida con un polímero) animal<sup>-1</sup> + 1210 g soya animal<sup>-1</sup>; R3 = 120 U (urea) animal<sup>-1</sup> + 1210 g soya animal<sup>-1</sup>; R4 = 60 g UP animal<sup>-1</sup> + 60 g U animal<sup>-1</sup> + 1210 g soya animal<sup>-1</sup>; R5 = 180 g UP animal<sup>-1</sup> + 610 g soya; R6 = 120 g UP animal<sup>-1</sup> + 120 g U animal<sup>-1</sup> + energía balanceada; R7 = 120 g UP animal<sup>-1</sup> + 120 g U animal<sup>-1</sup> + AA balanceados; R8 = 120 g UP animal<sup>-1</sup> + 120 g de U animal<sup>-1</sup> + energía balanceada + AA balanceados.

**Energía metabolizable y masa microbiana:** La cantidad de Mcal kg<sup>-1</sup> MS no fue diferente estadísticamente ( $P > 0.1$ ) entre los tratamientos del presente experimento (Cuadro 16). Con respecto a la masa microbiana sólo la sustitución de los 2000 g de la pasta soya en la RTM por

240 g de urea (U + UP) con un adecuado balance de energía y aminoácidos incrementó significativamente ( $P \leq 0.001$ ) los mg de masa microbiana (Cuadro 16), lo que probablemente indica que la sincronización de energía con la disponibilidad de N-NH<sub>3</sub> y aminoácidos favorece la síntesis de proteína microbiana (Russell *et al.*, 2002; Hristov *et al.*, 2005; Atasoglu *et al.*, 2006).

Cuadro 17. Efecto de urea protegida con un polímero en la desaparición *in vitro* de materia seca en RTM, formuladas para vacas lecheras.

Tratamientos	Tiempo de incubación			
	0	24	48	72
R1	16.39 <sup>a</sup>	49.33 <sup>b</sup>	51.56 <sup>b</sup>	67.17 <sup>b</sup>
R2	11.28 <sup>a</sup>	50.22 <sup>b</sup>	55.11 <sup>b</sup>	66.83 <sup>b</sup>
R3	10.61 <sup>a</sup>	51.78 <sup>b</sup>	54.33 <sup>b</sup>	62.61 <sup>b</sup>
R8	14.39 <sup>a</sup>	58.56 <sup>a</sup>	65.78 <sup>a</sup>	71.61 <sup>a</sup>
Error estándar	3.37	3.37	3.37	3.37

<sup>a, b</sup> = medias con diferente literal en una columnas son diferentes ( $P \leq 0.01$ ).

R1 = RTM testigo (2000 g soya animal<sup>-1</sup>); R2 = 120 g UP (urea protegida con un polímero) animal<sup>-1</sup> + 1210 g soya animal<sup>-1</sup>; R3 = 120 U (urea) animal<sup>-1</sup> + 1210 g soya animal<sup>-1</sup> y R8 = 120 g de UP animal<sup>-1</sup> + 120 g de U animal<sup>-1</sup> + energía balanceada + AA balanceados.

**Desaparición *in vitro* de la materia seca (DIVMS) de RTM:** La DIVMS de las RTM, formuladas para vacas lecheras (Cuadro 17) se incrementó significativamente después de 24 ( $P \leq 0.01$ ), 48 ( $P \leq 0.01$ ) y 72 ( $P \leq 0.01$ ) h de incubación por efecto de la combinación de U + UP con un adecuado balance de energía y AA en la RTM. Los resultados concuerdan con estudios realizados por Hume (1970) y Redman *et al.* (1980) quienes sugieren que sustituir N proteínico por urea con un adecuado balance de AA favorece la digestión e incrementa la biomasa microbiana. Por su parte, Ruíz *et al.* (2002) reportan que adicionar urea en dietas para vacas lecheras (7 y 18 g urea kg<sup>-1</sup> MS) incrementa la desaparición de MS. No obstante, Owens y Zinn (1988) indican que los compuestos NNP de lenta liberación no afectan la desaparición de los nutrientes de las dietas, pero que ello dependerá de las características de las dietas.

## 2.6 Conclusiones

Se concluye que sustituir pasta de soya por la combinación de urea de rápida solubilidad e hidrólisis y de urea protegida con un polímero con solubilidad paulatina (1:1), pero con adecuado balance de energía y aminoácidos en dietas para vacas lecheras, se incrementa la masa microbiana y en 24, 48 y 72 horas de incubación el crecimiento de unidades formadoras de colonia de bacterias ruminales, la concentración total de ácidos grasos volátiles y la desaparición *in vitro* de la materia seca. Mientras tanto, en 48 y 72 horas de incubación se reduce la concentración de amonio.



## 2.7 Literatura citada

- Abdoun, K., F. Stumpff, and H. Martens. 2007. Ammonia and urea transport across the rumen epithelium: a review. *Animal Health Research Reviews* 7: 43-59.
- Akay, V., J. Tikofsky, C. Holtz, and K. A. Dawson. 2004. Optigen ® 1200. Controlled release of non-protein nitrogen in the rumen. *In: Lyons, T. P., and K.A. Jacques (eds). Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries. Proceedings of Alltech's Twentieth Annual Symposium. Nottingham University Press Englad. pp: 176-185.*
- Atasoglu, C., C. J. Newbold, and R. J. Wallace. 2001. Incorporation of [<sup>15</sup>N] ammonia by the cellulolytic ruminal bacteria *Fibrobacter succinogenes* BL2, *Ruminococcus albus* SY3, and *Ruminococcus flavefaciens* 17. *Applied Environmental Microbiology* 67: 2819-2822.
- Atasoglu, C., C. Valdés, N. D. Walker, C. J. Newbold, and R. J. Wallace. 1998. De novo synthesis of amino acids by the ruminal bacteria *Prevotella bryantii* B14, *Selenomonas ruminantium* HD4, and *Streptococcus bovis* ES1. *Applied Environmental Microbiology* 64: 8:2836-2843.
- Cobos, M. A., and M. T. Yokohama. 1995. *Clostridium paratrificum* var. *ruminantium*: colonization and degradation of shrimp carapaces *in vitro* observed by scanning electron microscopy. *In: Rumen Ecology Research Planning. Wallace R.J. and Lahlou-Kassi (eds). Proceedings of a workshop held at the International Livestock Research Institute (ILRI), Addis Ababa, Ethiopia. pp: 151-161.*
- Currier, T. A., D. W. Bohnert, S. J. Falck, C. S. Schauer, and S. J. Bartle. 2004. Daily and alternate-day supplementation of urea or biuret to ruminants consuming low-quality forage: II. Effects on site of digestion and microbial efficiency in steers. *Journal of Animal Science* 82:1518-1527.
- Edwin, E. S., G. J. Marco, and E. Emery. 1961. Volatile fatty acid analysis of blood and rumen fluid by gas chromatography. *Journal of Dairy Science* 44:1768-1771.
- Ferguson, J. D., and W. Chalupa. 1989. Impact of protein nutrition on reproduction in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 72: 746 – 766.

- France, J., S. Lopez, E. Kebreaba, A. Bannink, M. S. Dhanoa, and J. Dijkstra. 2005. A general compartmental model for interpreting gas production profiles. *Animal Feed Science and Technology* 123–124: 473–485.
- Freetly, H. C., and J. A. Nienaber. 1998. Efficiency of energy and nitrogen loss and gain in mature cows. *Journal of Animal Science* 76: 896 - 905.
- Galo, E., S. M. Emanuele, C. J. Sniffen, J. H. White, and J. R. Knapp. . 2003. Effects of a polymer-coated urea product on nitrogen metabolism in lactating Holstein dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 86: 2154 – 2162.
- Golombeski, G. L., K. F. Kalscheur, A. R. Hippen, and D. J. Schingoeth. 2006. Slow-release urea and highly fermentable sugars in diets fed to lactating dairy cows<sup>1</sup>. *Journal of Dairy Science* 89: 4395 – 4403.
- Görsch, R., H. Bergner, O. Simon, R. Münchmeyer, and C. Kijora. 1976. Isobutylene diurea as a new source of NPN for ruminants. 1. Nitrogen balance and plasma amino acid composition after feeding of isobutylene diurea to sheep. *Archiv für Tierernährung* 11: 747 - 56.
- Helmer, L. G., and E. E. Bartley. 1971. Progress in the utilization of urea as a protein replace for ruminants. A review. *Journal of Dairy Scieene*. 54: 25 - 51.
- Henning, P. H., D. G. Steyn, and H. H. Meissner. 1993. Effect of synchronization of energy and nitrogen supply on ruminal characteristics and microbial growth. *Journal of Animal Science* 71: 2516 – 2528.
- Hristov, A. N., J. K. Ropp, K. L. Grandeen, S. Abedi, R. P. Etter, A. Melgar, and A. E. Foley. 2005. Effect of carbohydrate source on ammonia utilization in lactating dairy cows. *Journal of Animal Science* 83: 408 – 421.
- Huntington, G. B., D. L. Harmon, N. B. Kristensen, K. C. Hanson, and J. W. Spears. 2006. Effects of a slow-release urea source on absorption of ammonia and endogenous production of urea by cattle. *Animal Feed Science and Technology* 130: 225 – 241.

- Kearl L. C. 1982. Nutrient requirements of ruminants in developing countries. International feedstuffs institute, Utah. Agric Exp Station. Utah State University, Logan, Utah, USA.
- Kung, L., and A. O. Hession. 1995. Preventing *in vitro* lactate accumulation in ruminal fermentation by inoculation with *Megasphaera elsdenii*. Journal of Animal Science 73: 250 – 256.
- Lawlor, T. 2007. Holstein: La raza del futuro ¿Hacia donde nos dirigimos?. Boletín No. 15. CIGAL. Conferencia Internacional sobre ganado Lechero. CIGAL. Boletín No. 15. pp: 1 – 20.
- Littell, R. C., P. C. Henry, and C. B. Ammerman. 1998. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. Journal of Animal Science 76: 1216 – 1231.
- Lobley, G. E., D. M. Bremner, and G. Zuur. 2000. Effects of diet quality on urea fates in sheep as assessed by refined, non-invasive [ $^{15}\text{N}$   $^{15}\text{N}$ ] urea kinetics. British Journal of Nutrition 84: 459 – 468.
- Mackie, R. I., and B. J. White. 1990. Recent advances in rumen microbial ecology and metabolism: potential impact on nutrient output. *In*: Symposium, Rumen microbial ecology and nutrition, Journal of Animal Science 73: 2871-2995.
- McCullough, H. 1967. The determination of ammonia in whole blood by direct colorimetric method. Clinical Chemistry 17: 297 – 304.
- Mehrez, A. Z., and E. R. Orskov. 1977. A study of artificial bag technical for determination the digestibility of feed in the rumen. Journal of Agricultural Science (Cambridge) 88: 645-650.
- Menke, K. H., and H. Steingass. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. Animal Research Development 28: 7 – 55.
- Mould, F. L., R. Morgan, K.E. Kliem, and E. Krysstallidou. 2005. A review and simplification of the *in vitro* incubation medium. Animal Feed Science and Technology 123-124: 155 – 172.

- NRC. 2001. Nutrient requirements of dairy cattle. (7 th rev ed). National Academy Press, Washington, D.C. pp: 43 – 104.
- Owens, F. N. K. S. Lusby, K. Mizwicki, and O. Forero. 1980. Studies slow ammonia release from urea: Rumen and metabolism. *Journal of Animal Science* 50: 527 – 531.
- Rogers, J. A., H. R. Conrad, B. A. Dehority, and J. A. Grup. 1986. Microbial numbers, rumen fermentation and nitrogen utilization or steers wet and dried brewers grains. *Journal of Dairy Science* 59: 745-753.
- Ruiz, R., L. O. Tedeschi, J. C. Marini, D. G. Fox, A. N. Pell, G. Jarvis, and J. B Russell. 2002. The effect of a ruminal nitrogen (N) deficiency in dairy cows: Evaluation of the Cornell Net Carbohydrate and Protein System Ruminal N deficiency adjustment. *Journal of Dairy Science* 85: 2986 – 2999.
- Russell, B. J. 2002. Rumen microbiology and its role en ruminant nutrition. Cornell University. Ithaca N.Y. U.S.A. pp: 121 – 128.
- Russell, J. B., J. D. O'Connor, D. G. Fox, P. J. Van Soest, and C. J. Sniffen. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. *Journal of Animal Science* 70: 3551 – 3561.
- SAS. Institute Inc. 1999. SAS User's Guide Statistics. Version 8.0. Cary North Carolina, USA. pp: 956 – 971.
- Schofield, P., and A. N. Pell. 1995. Measurement and kinetic analysis of the of the neutral detergent-soluble carbohydrate fraction of legumes y grasses. *Journal of Animal Science* 73: 3455 – 3463.
- Setter, L. D., and R. E. Roffler. 1997. Influence of nitrogen and carbohydrates inputs on rumen fermentation. *In: Recent Advances in Animal Nutrition*. Williams H., and L. Dfed (eds). Butterworths. London-Boston. pp: 25-49.
- Theodorou, M. K., B. A. Williams, M. S. Dhanoa, A. D. B. Mcallan, and J. France. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology* 48: 185 – 197.

- Valkeners, D., A. Théwis, F. Piron, and Y. Beckers. 2004. Effect of imbalance between energy and nitrogen supplies on microbial protein synthesis and nitrogen metabolism in growing double-muscled Belgian Blue bulls. *Journal of Animal Science*. 82: 1818 – 1825.
- Wallace, R. J., and L.M. Brammall. 1985. The role of different species of bacteria in the hydrolysis of protein in the rumen. *Journal of General Microbiology* 131: 821-832.
- Wang, Z., and L. A. Goonewrdene. 2004. The use of mixed in the analysis of animal experiments with repeated measures data. *Canadian Journal of Animal Science* 84: 1 – 11.

# CAPITULO III. EFECTO DE LA UREA PROTEGIDA CON UN POLIMERO EN LA DEGRADACION *in situ* e *in vivo*, TASA DE PASAJE Y VARIABLES RUMINALES DE DIETAS (RACIONES TOTALMENTE MEZCLADAS) PARA VACAS LECHERAS

## 3.1 Resumen

En este estudio se evaluó el efecto de la urea (U) protegida con un polímero (UP) en variables del rumen y utilización de nutrientes. Los tratamientos (R, tres repeticiones por tratamiento) correspondieron a las dietas formuladas para vacas lecheras como raciones totalmente mezcladas (RTM): R1 = RTM testigo, 2000 g pasta de soya (PS) animal<sup>-1</sup>; R2 = 120 g UP animal<sup>-1</sup> + 1210 g PS animal<sup>-1</sup>; R3 = 120 g U animal<sup>-1</sup> + 1210 g PS animal<sup>-1</sup>; R8 = 120 g UP animal<sup>-1</sup> + 120 g de U animal<sup>-1</sup> + energía balanceada + aminoácidos balanceados. Se usaron cuatro novillos Holstein (328 kg peso vivo) alimentados a las 08:00 y 20:00 en cuatro periodos (21 d cada uno). El diseño experimental fue un cuadro latino 4 x 4 con medidas repetidas a través del tiempo y los datos se analizaron con REPEATED MEASURES y la opción ANTE (1) de PROC MIXED (SAS). La combinación de U + UP con un adecuado balance de energía y aminoácidos (R8) disminuyó la concentración de N-NH<sub>3</sub> ( $P \leq 0.02$ ) a las 2.5 h; así como la concentración de sólidos, contenido total de MS y líquidos en el rumen, el flujo a duodeno de MS, MO y FDN, la eficiencia de nutrientes N y del N microbiano ( $P \leq 0.01$ ) a las 4 h. En contraste, se incrementó ( $P \leq 0.01$ ) la concentración total de AGV, la digestión ruminal de FDN y nutrientes N, la digestión total de MS y MO, y la tasa de pasaje de la FDN a las 4 h; así como la digestibilidad *in situ* de la MS a las 9 y 12 h. Por tanto, se puede concluir que la sustitución de parte del nitrógeno proteínico (pasta de soya) por la combinación de U + UP más un adecuado balance de aminoácidos y energía, en raciones totalmente mezcladas para vacas lecheras, causó un efecto positivo en las variables de fermentación y digestibilidad de la MS en el rumen.

Palabra claves: urea protegida con un polímero, novillos, raciones totalmente mezcladas, flujo duodenal

### 3.2 Abstract

#### EFFECT OF UREA PROTECTED WITH A POLYMER ON *in situ* AND *in vivo* DEGRADATION, RATE OF PASSAGE AND RUMINAL VARIABLES IN DIETS (TOTAL MIXED RATIONS) FOR DAIRY COWS

The effect of a polymer-coated urea (PU) on ruminal variables and nutrients utilization was evaluated in this study. The treatments (R; three replications per treatment) were diets formulated for dairy cows as total mixed rations (TMR): R1= control TMR, 2000 g soybean meal (SBM) animal<sup>-1</sup>; R2 = 120 g PU animal<sup>-1</sup> + 1210 g SBM animal<sup>-1</sup>; R3 = 120 g U (urea) animal<sup>-1</sup> + 1210 g SBM animal<sup>-1</sup>; R8=120g PU animal<sup>-1</sup> + 120 g U animal<sup>-1</sup> + balanced energy + balanced amino acid. Four steer (328 kg weight) were fed at 08:00 and 20:00 in four periods (21 d each). The experimental design was a 4 x 4 Latin square with repeated measures through time; data were analyzed with REPEATED MEASURE and ANTE (1) option of PROC MIXED (SAS). The combination U + PU with an adequate amino acid and energy balance (R8) decreased NH<sub>3</sub>-N concentration ( $P \leq 0.02$ ) at 2.5 h; as well as solids concentration, total content of DM and fluids in the rumen fluid, flow to the duodenum of DM, OM and FDN; N nutrients efficiency and microbial N ( $P \leq 0.01$ ) at 4 h. In contrast, there was an increase ( $P \leq 0.01$ ) in total VFA concentration, ruminal digestion of FDN and N nutrients, total tract digestion of DM and OM, and FDN rate of passage at 4 h; as well as on *in situ* DM digestibility at 9 and 12 h. Therefore, it may be concluded that substitution of protein N (soybean meal) by the combination of U + UP plus an adequate balance of amino acids and energy, in total mixed rations for dairy cows, showed a positive effect on fermentation variables and DM digestibility in the rumen.

Key words: polymer-coated urea, steer, total mixed ration, flow to the duodenum

### 3.3 Introducción

Los ingredientes proteínicos representan un rubro importante en la formulación de dietas para vacas lecheras, pero su inclusión tiene un alto costo (Ipharraguerre y Clark, 2003). Al respecto, los microorganismos ruminales pueden utilizar tanto N proteínico como NNP en la síntesis de proteína microbiana la cual está disponible para el rumiante cuando pasa al intestino, por lo cual es factible incluir fuentes de N más económicas en la dieta de vacas lecheras. Desde la década de 1950 la urea se ha usado como una fuente barata de N (Reid, 1953) y, según Virtane (1966), las vacas lecheras pueden convertir el NNP en proteína de leche. Sin embargo la inclusión de urea en la dieta está limitada por su rápida hidrólisis a N-NH<sub>3</sub>, alcanzando su máxima concentración en menos de 5 min (Abduon *et al.*, 2007). El exceso de N-NH<sub>3</sub> que se absorbe por la pared ruminal y llega al hígado, tiende a saturar el ciclo de la urea provocando efectos tóxicos y, en casos extremos, la muerte del rumiante en 2 a 4 h (Lobley *et al.*, 2000). En este sentido se ha estudiado la inhibición de la actividad de la ureasa microbiana, pero los microorganismos muestran una adaptación a los inhibidores (Whitelaw *et al.*, 1991; Ludden *et al.*, 2000). Además, se ha usado varios compuestos para modificar la urea y controlar su tasa de liberación y sincronizar la disponibilidad de N-NH<sub>3</sub> con la degradación de los carbohidratos, pero los resultados varían (Oltjen *et al.*, 1968; Owens *et al.*, 1980; Currier *et al.*, 2004; Huntington *et al.*, 2006). Recientemente, mediante el uso de revestimientos basados en petróleo (Garrett *et al.*, 2005) o polímeros (Tedeschi *et al.*, 2002; Galo *et al.*, 2003) se ha logrado controlar la rápida hidrólisis de la urea en rumen, permitiendo que los microorganismos ruminales tengan una cantidad constante de N-NH<sub>3</sub> que es convertido eficientemente en proteína microbiana. En este contexto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la urea protegida con un polímero sintético en variables del rumen, fermentación ruminal, y utilización de nutrientes usando dietas formuladas para vacas lecheras.

### 3.4 Materiales y métodos

El experimento se realizó en el área metabólica del Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California, Campus Mexicali. Las muestras fueron procesadas y analizadas en el laboratorio de Nutrición Animal del Colegio de Postgraduados, ubicado en Montecillo, Estado de México, México. Hubo cuatro periodos de 21 d cada uno: 7 de adaptación



a la dieta; 7 d para recolección de heces, orina y quimo de duodeno y 7 d para pruebas de digestibilidad *in situ*, y de contenido total de líquidos y sólidos en rumen por evacuación total.

### 3.4.1 Animales, raciones totalmente mezcladas y alimentación

Se usaron cuatro novillos (Holstein;  $328.5 \pm 12.5$  kg peso vivo) con cánula en rumen y duodeno. 21 d antes de iniciar el experimento fueron alojados en jaulas metabólicas individuales y tratados con vitaminas (Vigantol ADE Fuerte ®) y antiparasitarios (Ivermectina ®).

Las cuatro dietas se formularon con el programa de predicción CNCPS V6.1.12 (The Cornell Net Carbohydrate and Protein System, desarrollado por la Universidad de Cornell Ithaca, N.Y., U.S.A.), de acuerdo con los requerimientos nutricionales para vacas lecheras con tres lactancias, 685 kg PV<sup>.75</sup> y una producción de 50 kg leche d<sup>-1</sup> (NRC, 2001). Para adicionar la cantidad de urea y urea protegida con un polímero en la dieta, se usó como referencia la dosis 120 g<sup>-1</sup> vaca<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> recomendada por Alltech de México de S.A de C.V.

Los tratamientos (T) fueron raciones (R) totalmente mezcladas (RTM) correspondientes a dietas formuladas para vacas lecheras (Cuadro 18): R1 = RTM testigo (2000 g soya animal<sup>-1</sup>); R2 = 120 g UP (urea protegida con un polímero) animal<sup>-1</sup> + 1210 g soya animal<sup>-1</sup>; R3 = 120 g U (urea) animal<sup>-1</sup> + 1210 g soya animal<sup>-1</sup>; R8 = 120 g UP animal<sup>-1</sup> + 120 g de U animal<sup>-1</sup> + energía balanceada + AA balanceados. Como marcador de fase sólida para calcular el flujo y digestibilidad de nutrientes, se incluyó 0.03 % de O<sub>3</sub>Cr<sub>2</sub> en la ración. El consumo diario de los novillos se ajustó a 2.1 % del PV<sup>.75</sup> en base seca, ofreciendo cantidades iguales por la mañana (08:00) y tarde (20:00). El consumo de agua fue *ad libitum*.

### 3.4.2 Recolección y almacenamiento de muestras

**Alimento:** se recolectó aproximadamente 500 g de cada dieta, las cuales fueron molidas (criba 1 mm de diámetro) y almacenadas en bolsas de plástico, para ser analizadas en laboratorio.

**Fluido duodenal, materia fecal y orina:** durante los últimos 4 d de cada periodo se obtuvieron muestras diarias de: fluido duodenal, 500 mL (mediante cánula duodenal); materia fecal, 50 g, desde el recto; orina, 50 mL, con garrafones de plástico de 20 L ubicadas a un lado de la jaula metabólica y conectadas a uriniales colocados debajo del prepucio del novillo.

**Líquido ruminal:** el último día de recolección de cada periodo, 4 h después de la alimentación, se tomó una muestra de líquido ruminal (100 mL) y se filtró en cuatro capas de gasa quirúrgica midiéndose inmediatamente el pH (ORION modelo 250A). Una alícuota de 80 mL de líquido ruminal se mezcló en una proporción 4:1 con una solución 25 % de ácido meta-fosfórico (peso/volumen) y se almacenó a -20 °C para determinar la concentración de AGV y N amoniacal.

**Digestibilidad *in situ* de la MS:** se insertó dentro del rumen en cada periodo y animal, 16 bolsas de poliéster libre de N (Ankon Corp., Fairport, N.Y.; 10x20 cm poro de  $50 \pm 15 \mu\text{m}$ ) con 5 g de muestras de alimento (molido con criba 1 mm de diámetro, molino Wiley) del tratamiento que recibió el novillo (Vanzant *et. al.* 1998). Las bolsas por duplicado fueron selladas y agrupadas para retirarse del rumen a las 3, 6, 9, 12, 24, 48 y 72 h.

**Vaciado del rumen:** cuatro horas después de ofrecer el alimento a las 08:00 en el último muestreo de cada período se aspiró el rumen (aspiradora convencional seco-líquido de 50.0 L) de cada novillo. Se obtuvo una alícuota del contenido ruminal extraído (900 g) e inmediatamente se regresó el contenido a la cavidad ruminal. En 20 min se realizó el procedimiento completo (Khalili y Huhtanen, 2002).

### 3.4.3 Procesamiento de muestras y análisis de laboratorio

#### 3.4.3.1 Alimento, quimo duodenal y heces

**Materia seca (MS) y ceniza:** la MS se determinó mediante calor (70 °C) por 12 h, y para medir el contenido de ceniza las muestras se incineraron a 600 °C por 12 h (AOAC, 2003).

**N total:** por micro-Kjeldahl digiriendo las muestras con ácido sulfúrico concentrado, destilando en ácido bórico al 4 % y titulando con ácido clorhídrico 0.1 N (AOAC, 2003).

**N amoniacal:** en un Tecator<sup>14</sup> digiriendo la muestra de quimo duodenal con 100 mL de ácido bórico al 2.9 %, 1 mL de CaCl<sub>2</sub> y 10 g de óxido de Mg (Adams, 1991).

---

<sup>14</sup> Tecator DISTILLATION UNIT® 1200

Cuadro 18. Ingredientes de las RTM como % del total de MS correspondientes a vacas lecheras de 685 kg PV y una producción de 50 kg de leche d<sup>-1</sup> \*.

Ingredientes	Ración (R)			
	R1	R2	R3	R8
Ensilado maíz	29.08	29.79	29.79	29.58
Heno de alfalfa	20.51	21.02	21.02	20.87
Pasta de soya 44%	6.85	4.25	4.25	--
Melaza de caña	2.12	2.18	2.18	2.16
Pasta de semilla de algodón	10.62	10.88	10.88	10.80
Paja de avena	1.78	1.82	1.82	1.81
Pasta de gluten de maíz	2.26	2.28	2.28	2.26
Megalac	0.92	0.95	0.95	1.05
Maíz en hojuelas	23.46	24.04	24.04	26.97
Carbonato de Ca	0.24	0.25	0.25	0.24
Sal común	0.03	0.04	0.04	0.03
Harina de pescado	2.02	2.04	2.04	2.02
Vitalal lechero <sup>1</sup>	0.17	0.18	0.18	0.17
Urea protegida 1200	--	0.42	--	0.42
Urea	--	--	0.42	0.42
DL- Metionina	--	--	--	0.10
L-lisina HCL	--	--	--	0.91

<sup>1</sup>Vitalal lechero®: Ca 17 %, P 12 %, Mg 5%, Na 7%, Cl 10.5 %, K 0.04 %, S 504 ppm, Mn 400 ppm, Fe 2939 ppm, Zn 6000 ppm, Cu 1000 ppm, I 500 ppm, Se 40 ppm, Co 60 ppm, Vit. A 35000 UI, Vit. D 150 000 UI y Vit. E 150 ppm. Dosis recomendada 15 kg t<sup>-1</sup> de alimento o 20 kg t<sup>-1</sup> de concentrado; Distribuidora Veterinaria de Texcoco S.A. de C.V.

\*NRC 2001

**Purinas:** se digirieron las muestras de quimo duodenal con ácido perclórico al 60 % calentando a 100°C por 1 h. Se usó nitrato 0.4 M de plata para precipitar purinas y la lectura se realizó por espectrofotometría (260 nm; Zinn y Owens, 1986).

Cuadro 19. Composición de nutrimentos (%) de la RTM en base seca

Nutriente	Ración			
	R1	R2	R3	R8
Materia seca (%)	59.0	59.0	59.0	60.0
Energía metabolizable (Mcal kg <sup>-1</sup> MS)	2.8	2.8	2.8	2.8
Energía neta lactancia (Mcal kg <sup>-1</sup> MS)*	1.80	1.80	1.80	1.81
Proteína (% MS)	18.1	18.2	18.0	18.0
Proteína soluble (% PC)*	29.0	33.0	34.0	27.0
Consumo de proteína degradable (%)*	59.0	59.0	61.0	57.0
Fibra detergente neutra (% MS)	32.1	32.1	32.0	31.8
Fibra detergente neutra efectiva (kg d <sup>-1</sup> )*	0.7	0.7	0.7	0.5
Forraje en la ración (% MS)	53.0	53.0	53.0	51.0
Ca (%)	0.8	0.8	0.8	0.8
P (%)	0.4	0.4	0.4	0.4
Metionina *	2.1	2.2	2.1	2.1
Lisina *	6.1	6.1	6.1	6.1

\*Valores calculados usando el programa de predicción CNCPS V6.1.12.

**FDN:** Se colocó 0.5 g de muestras en bolsas filtrantes (ANKOM<sup>2000</sup> F57) las cuales se hirvieron con una solución de lauril sulfato de Na y alfa-amilasa<sup>15</sup> por 1 h y se secaron a 70 °C (ANKOM, 2000).

**Cromo:** las muestras se incineraron a 600 °C por 12 h y las cenizas fueron solubilizadas con 4 mL de bromato de potasio al 4.5 % y 3 mL de una solución de ácido fosfórico y sulfato de manganeso (970 mL de ácido fosfórico concentrado más 30 mL de una solución de sulfato de Mn<sup>16</sup>). La lectura se hizo por espectrofotometría de absorción atómica<sup>17</sup> (Hill y Anderson, 1958).

<sup>15</sup> Actividad =17,400 unidades Liquefon; ANKOM®, FFA

<sup>16</sup> 7.58 g de sulfato de Mn aforado a 100 mL.

<sup>17</sup> Espectrómetro de absorción atómica Marca VARIAN, Modelo SPECTRA 10 PLUS;

### 3.4.3.2 Ambiente ruminal

**Concentración de AGV y N-NH<sub>3</sub> en líquido ruminal:** se centrifugó 15 min a 9469 g 1 mL de la muestra de líquido ruminal con ácido metafosfórico y el sobrenadante se usó para determinar la concentración de AGV por cromatografía de gases<sup>18</sup> (Hess *et. al.*; 2003) y N-NH<sub>3</sub> mediante espectrofotometría de luz visible<sup>19</sup> (630 nm; AOAC, 2003).

**Digestibilidad *in situ* de la MS:** terminado el período de incubación, las bolsas se retiraron simultáneamente, se lavaron con agua por 5 min, se secaron 48 h a temperatura ambiente (35°C) y se deshidrataron a 55 °C en una estufa. En el material residual se determinó la digestibilidad *in situ* (DIS), de materia seca (DISMS) y la tasa de digestión mediante la cinética de primer orden (Nocek, 1986).

### 3.4.3.3 Vaciado del rumen

**Materia seca y ceniza:** la MS se determinó mediante calor (70 °C) por 12 h, y el contenido de ceniza incinerando las muestras a 600 °C por 12 h (AOAC, 2003).

**FDN:** se colocó 0.5 g de muestras en bolsas filtrantes (ANKOM<sup>2000</sup> F57), se hirvieron con una solución de lauril sulfato de Na y alfa-amilasa<sup>20</sup> por 1 h y se secaron a 70 °C (ANKOM, 2000).

### 3.4.4 Variables de respuesta

Las variables de respuesta del ambiente ruminal fueron: 1) pH; 2) concentración (mMol L<sup>-1</sup>) y proporción molar (%) de AGV; 3) concentración de N-NH<sub>3</sub> (mg dL<sup>-1</sup>); 4) producción de metano (moles de metano producido por mol de glucosa fermentada; Wolin, 1960); 5) tasa de pasaje y contenido total de líquidos, sólidos y FDN en rumen. Los cálculos se presentan en el Anexo B1.

Las variables de respuesta digestiva fueron: 1) flujo a duodeno y excreción fecal de MS, MO, FDN y nutrientes N; 2) digestibilidad ruminal, en el tubo digestivo posterior y total de MS, MO, FDN, así como la desaparición ruminal, tubo digestivo posterior y total de nutrientes N; 3)

---

<sup>18</sup> Cromatografo de gases XL, Perkin Elmer Instruments; Shelton, CT, equipado con un detector de ionización por flama y columna capilar, Maca, Elite-FFAP, Perkin Elmer Instruments, 30 cm largo x 0.32 diámetro interior x 0.25 µm grosor de cobertura.

<sup>19</sup> Espectrofotómetro UV-visible Marca VARIAN, Modelo CARY 1E;

<sup>20</sup> Actividad =17,400 unidades Liquefon; ANKOM<sup>®</sup>, FFA

eficiencia de utilización de N consumido y eficiencia de pasaje del N bacteriano; 4) tasa de pasaje (kp) y de digestión (kd) de la FDN (Mertens y Ely, 1979). La digestibilidad o desaparición ruminal, en el tubo digestivo posterior y total, así como la eficiencia del N se calcularon como lo hicieron Ramírez *et al.* (1998) (Anexo B2)

### 3.4.5 Diseño experimental y modelo estadístico

El diseño fue un cuadro latino 4 x 4 con medidas repetidas a través del tiempo (REPEATED MEASURES); los resultados fueron analizados usando PROC MIXED (SAS 2000) de acuerdo con lo propuesto por Littell *et al.*, (1998) y Wang y Goonwardese (2004). Cada variable se ajustó por su covariable al inicio del experimento (consumo de MS, MO, FDN, y N inicial), y para el análisis se tomó en cuenta la opción ANTE (1) correspondiente a la estructura de la covarianza.

El análisis de varianza fue realizado con el procedimiento MIXED de SAS (SAS, 2000), usando el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ijkl} = \mu + \delta_i + C(A_l)_j + \tau_k + A_l + \varepsilon_{ijkl}$$

Donde:

$Y_{ijkl}$  = variable de respuesta

$\mu$  = media general

$\delta_i$  = efecto del i-ésimo periodo (hilera)

$C(A_l)_j$  = efecto del l-ésimo cuadro (repetición) en el j-ésimo animal (columna)

$\tau_k$  = efecto del k-ésimo tratamiento (dieta)

$A_l$  = efecto del l-ésimo cuadro (repetición)

$\varepsilon_{ijkl}$  = error experimental.

### 3.5 Resultados y discusiones

#### 3.5.1 Ambiente ruminal

**Concentración de N-NH<sub>3</sub>:** en la mañana, 30 min antes de ofrecer el alimento, la concentración de N-NH<sub>3</sub> ruminal fue mayor en los novillos que consumieron la RTM testigo ( $P \leq 0.02$ ), con respecto a las RTM con urea (Figura 3). En cambio durante las primeras 2.5 h después de la alimentación la concentración de N-NH<sub>3</sub> fue menor debido al efecto de la combinación de U + UP con un adecuado balance de energía y aminoácidos ( $P \leq 0.02$ ) en la RTM, con respecto a RTM testigo. Esta menor concentración de N-NH<sub>3</sub> en tiempos cortos puede atribuirse a una disolución lenta de UP, retardando su hidrólisis a N-NH<sub>3</sub> por los microorganismos ruminales, así como a su utilización en conjunto con la energía y aminoácidos en la síntesis de proteína microbiana (France *et al.*, 2005; Antonelli 2007). En contraste, de 2.5 a 4.5 h después de la alimentación, la concentración de N-NH<sub>3</sub> aumentó en la RTM con U ( $P \leq 0.03$ ) en comparación con la RTM testigo, efecto que probablemente se debe a la rápida hidrólisis de la urea en N-NH<sub>3</sub> por los microorganismos ruminales (Lobley *et al.*, 2000; Abduon *et al.*, 2007).

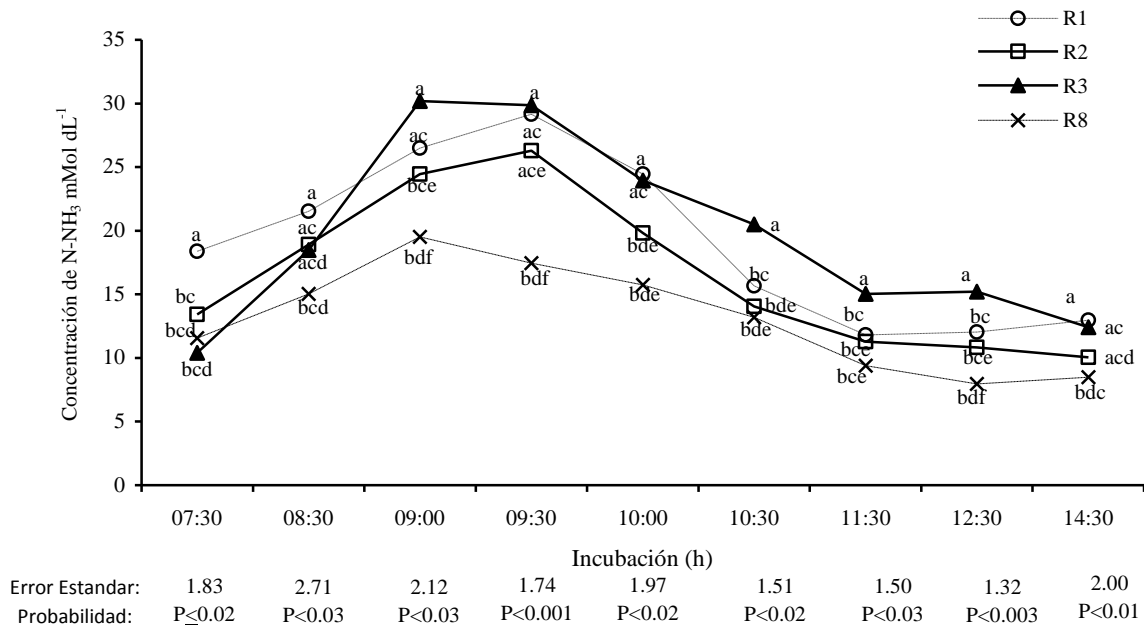


Figura 3. Concentración de N-NH<sub>3</sub> en rumen: R1 = RTM testigo (2000 g soya animal<sup>-1</sup>); R2 = 120 g UP (urea protegida con un polímero) animal<sup>-1</sup> + 1210 g soya animal<sup>-1</sup>; R3 = 120 U (urea) animal<sup>-1</sup> + 1210 g soya animal<sup>-1</sup> y R8 = 120 g de UP animal<sup>-1</sup> + 120 g de U animal<sup>-1</sup> + energía balanceada + AA balanceados.

Cuadro 20. Efecto de la urea y urea protegida con un polímero en las características del ambiente ruminal en novillos Holstein.

Variables	Tratamiento <sup>1</sup>				Error Estándar
	R1	R2	R3	R8	
pH	6.95 <sup>a</sup>	6.81 <sup>a</sup>	6.82 <sup>a</sup>	6.90 <sup>a</sup>	0.035
Ácidos grasos volátiles (mM 100mM <sup>-1</sup> )					
Acético	72.1 <sup>a</sup>	72.4 <sup>a</sup>	71.8 <sup>a</sup>	71.9 <sup>a</sup>	0.343
Propiónico	16.9 <sup>ace</sup>	17.1 <sup>a</sup>	16.3 <sup>bde</sup>	17.0 <sup>ac</sup>	0.342
Butírico	11.1 <sup>bcd</sup>	10.5 <sup>bcd</sup>	11.9 <sup>a</sup>	11.1 <sup>bc</sup>	0.356
Acético : Propiónico	4.3 <sup>ac</sup>	4.2 <sup>bcd</sup>	4.5 <sup>a</sup>	4.2 <sup>bcd</sup>	0.087
Total AGV	75.2 <sup>bcd</sup>	74.8 <sup>bcd</sup>	76.3 <sup>bc</sup>	80.6 <sup>a</sup>	2.477
Metano <sup>2</sup>	0.458 <sup>a</sup>	0.457 <sup>a</sup>	0.459 <sup>a</sup>	0.458 <sup>a</sup>	0.006

<sup>a, b</sup> = medias con diferente literal en una hilera son diferentes ( $P \leq 0.01$ )

R1 = RTM testigo (2000 g soya animal<sup>-1</sup>); R2 = 120 g UP (urea protegida con un polímero) animal<sup>-1</sup> + 1210 g soya animal<sup>-1</sup>; R3 = 120 U (urea) animal<sup>-1</sup> + 1210 g soya animal<sup>-1</sup> y R8 = 120 g de UP animal<sup>-1</sup> + 120 g de U animal<sup>-1</sup> + energía balanceada + AA balanceados.

<sup>2</sup> moles de metano producido por mol de glucosa fermentada en rumen.

**Concentración de pH, AGV y metano:** la sustitución de pasta de soya por urea en la dieta, independientemente de la fuente, no provocó cambios en pH del líquido ruminal, producción teórica de metano, y en la proporción molar de ácido acético ( $P > 0.10$ ). Sin embargo, la sustitución de 790 g de pasta de soya por 120 g de U en la dieta causó una disminución significativa ( $P \leq 0.01$ ) de la proporción molar de ácido propiónico e incrementó ácido butírico ( $P \leq 0.01$ ), efecto que puede deberse a una menor disponibilidad de energía en relación al N-NH<sub>3</sub> en rumen (Russell, 1998). En tanto, la concentración total de AGV se incrementó ( $P \leq 0.01$ ) por efecto de la combinación de U + UP con adecuado balance de energía y aminoácidos en la dieta; este cambio se debe probablemente a una mayor fermentación de la MS y, al respecto, Calsalmiglia y Ferret (2002) mencionan que la cantidad de AGV producidos en rumen depende de la porción de alimento ingerido y la velocidad de degradación.



**Tasa de pasaje y contenido total de sólidos, líquidos y FDN en rumen:** cuatro h después de la alimentación de los novillos, la urea independientemente de la fuente incrementó ( $P \leq 0.01$ ) la tasa de pasaje de FDN y disminuyó ( $P \leq 0.01$ ) la cantidad total de sólidos en rumen. En cambio, la combinación de U + UP (con o sin balance en energía y AA) en la RTM causó una disminución ( $P \leq 0.01$ ) en el contenido total del rumen y la cantidad total de líquidos, en comparación con RTM testigo. En tanto, por efecto de combinar U + UP pero con adecuado balance de energía y AA en la dieta decreció ( $P \leq 0.01$ ) el porcentaje de MS en rumen.

Cuadro 21. Efecto de urea y urea protegida con un polímero en la ingesta, tamaño de rumen, y tasa pasaje de la FDN; determinadas por la evacuación del rumen en novillos Holstein.

Variables	Tratamiento				Error Estándar
	R1	R2	R3	R8	
Cinética de digestión de FDN					
Kp	1.5 <sup>bdf</sup>	2.0 <sup>a</sup>	1.8 <sup>ace</sup>	2.0 <sup>ac</sup>	0.1014
Contenido en rumen					
Contenido total (kg)	49.5 <sup>a</sup>	40.5 <sup>bde</sup>	40.9 <sup>bde</sup>	46.9 <sup>ac</sup>	2.1495
MS (%)	15.4 <sup>ac</sup>	14.8 <sup>ace</sup>	15.7 <sup>a</sup>	12.6 <sup>bdf</sup>	0.6824
Sólidos (kg)	7.8 <sup>a</sup>	6.1 <sup>bcd</sup>	6.4 <sup>bc</sup>	5.9 <sup>bcd</sup>	0.3564
Líquidos (kg)	41.6 <sup>a</sup>	34.5 <sup>bde</sup>	34.5 <sup>bde</sup>	41.1 <sup>ac</sup>	1.9482
FDN (%)	47.1 <sup>a</sup>	44.7 <sup>bde</sup>	46.7 <sup>ac</sup>	45.7 <sup>ace</sup>	0.8247

<sup>a, b</sup> = medias con diferente literal en una hilera son diferentes ( $P \leq 0.01$ )

<sup>1</sup>R1 = RTM testigo (2000 g soya animal<sup>-1</sup>); R2 = 120 g UP (urea protegida con un polímero) animal<sup>-1</sup> + 1210 g soya animal<sup>-1</sup>; R3 = 120 U (urea) animal<sup>-1</sup> + 1210 g soya animal<sup>-1</sup> y R8 = 120 g de UP animal<sup>-1</sup> + 120 g de U animal<sup>-1</sup> + energía balanceada + AA balanceados.

### 3.5.2 Pruebas de digestibilidad

**Consumo de nutrientes:** en el Cuadro 22 se presentan los datos acerca del consumo de los nutrientes proporcionados a los novillos usados en las pruebas metabólicas y se observa que no hubo rechazos durante los periodos experimentales. El consumo de MS fue el esperado, es decir, los novillos recibieron los nutrimentos definidos en los tratamientos.

Cuadro 22. Consumo de nutrientes en novillos Holstein antes y después de proporcionar un suplemento de urea y urea protegida con un polímero

Variable	Tratamientos <sup>1</sup>				Error estándar
	R1	R2	R3	R8	
Peso del novillo, kg	380	389	368	368	15.07
Consumo, g d <sup>-1</sup>					
Materia seca	7975 <sup>a</sup>	8180 <sup>a</sup>	7636 <sup>a</sup>	7728 <sup>a</sup>	317.08
Materia orgánica	7258 <sup>a</sup>	7445 <sup>a</sup>	7003 <sup>a</sup>	7182 <sup>a</sup>	290.04
FDN	5933 <sup>a</sup>	5950 <sup>a</sup>	5555 <sup>a</sup>	5673 <sup>a</sup>	240.54
N	231 <sup>a</sup>	238 <sup>a</sup>	220 <sup>a</sup>	223 <sup>a</sup>	9.17

<sup>a, b</sup> = medias con diferente literal en una hilera son diferentes ( $P \leq 0.01$ )

<sup>1</sup> R1 = RTM testigo (2000 g soya animal<sup>-1</sup>); R2 = 120 g UP (urea protegida con un polímero) animal<sup>-1</sup> + 1210 g soya animal<sup>-1</sup>; R3 = 120 U (urea) animal<sup>-1</sup> + 1210 g soya animal<sup>-1</sup> y R8 = 120 g de UP animal<sup>-1</sup> + 120 g de U animal<sup>-1</sup> + energía balanceada + AA balanceados.

**Flujo de nutrientes a duodeno:** de acuerdo con el análisis de los datos del Cuadro 23, el efecto de sustituir 39.5 o 100 % de la pasta de soya en la RTM por U o UP disminuyó ( $P \leq 0.01$ ) el flujo de MS y MO hacia duodeno. También disminuyó ( $P \leq 0.01$ ) el flujo de la FDN a duodeno por efecto de la combinación de U + UP con un adecuado balance de energía y aminoácidos en la RTM. Además, no se observan cambios ( $P > 0.10$ ) en el flujo a duodeno del N amoniacal, N microbiano y N en alimento entre tratamientos. Sin embargo, la eficiencia del N y del N microbiano fue menor por efecto de la combinación de U + UP con un adecuado balance de energía y aminoácidos ( $P \leq 0.01$ ) en la RTM, en comparación con el efecto que provocó la RTM testigo. El análisis de los resultados indica una congruencia entre el flujo de los nutrientes y el consumo y, al respecto, Van Vuuren *et al.* (1992) señalan que éste es un importante factor en el total del flujo hacia el duodeno, ya que en promedio 65 % de la MO ingerida y hasta 80 % de la FDN consumida es digerido en el rumen.

**Digestibilidad *in situ* de la MS (DISMS):** la DISMS fue menor en las horas 6 y 9 ( $P \leq 0.01$ ) de incubación por efecto de sustituir 790 g de pasta soya en la RTM por urea. Mientras que la DISMS se incrementó en las horas 9 y 12 ( $P \leq 0.01$ ) de incubación debido a la combinación de U + UP con un adecuado balance de energía y aminoácidos (Cuadro 24) en la RTM, en comparación con la RTM testigo. En las horas 24 y 48 de incubación no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ( $P > 0.10$ ). Al respecto, Ruiz *et al.* (2002) reportan que la adición de urea de lenta liberación en dietas totalmente mezcladas mejora la desaparición de la MS.

Cuadro 23. Flujo de nutrientes a duodeno de novillos Holstein antes y después de proporcionar un suplemento de urea y urea protegida con un polímero

Variable	Tratamientos				Error estándar
	R1	R2	R3	R8	
Flujo a duodeno, g d <sup>-1</sup> :					
Materia seca	4159 <sup>a</sup>	3917 <sup>bdc</sup>	3982 <sup>ac</sup>	3825 <sup>bcd</sup>	84.47
Materia orgánica	3457 <sup>a</sup>	3207 <sup>bce</sup>	3289 <sup>ac</sup>	3045 <sup>bde</sup>	79.68
FDN	3035 <sup>a</sup>	2903 <sup>acd</sup>	2923 <sup>ac</sup>	2799 <sup>bcd</sup>	78.86
N amoniacal	150.1 <sup>a</sup>	147.3 <sup>a</sup>	138.5 <sup>a</sup>	130.6 <sup>a</sup>	11.24
N microbiano	71.6 <sup>a</sup>	70.7 <sup>a</sup>	64.6 <sup>a</sup>	63.9 <sup>a</sup>	5.40
N alimento	78.5 <sup>a</sup>	76.6 <sup>a</sup>	73.9 <sup>a</sup>	66.6 <sup>a</sup>	6.04
Eficiencia N bacteriano <sup>1</sup>	18.9 <sup>a</sup>	17.4 <sup>ac</sup>	16.5 <sup>bcd</sup>	15.2 <sup>bcd</sup>	1.1950
Eficiencia N <sup>2</sup>	0.65 <sup>a</sup>	0.61 <sup>acd</sup>	0.63 <sup>ac</sup>	0.58 <sup>bcd</sup>	0.02575

<sup>a, b</sup> = medias con diferente literal en una hilera son diferentes ( $P \leq 0.01$ ).

<sup>1</sup>g de N bacteriano kg<sup>-1</sup> materia orgánica fermentada en rumen.

<sup>2</sup>Flujo a duodeno de N no amoniacal /consumo de N.

<sup>1</sup>R1 = RTM testigo (2000 g soya animal<sup>-1</sup>); R2 = 120 g UP (urea protegida con un polímero) animal<sup>-1</sup> + 1210 g soya animal<sup>-1</sup>; R3 = 120 U (urea) animal<sup>-1</sup> + 1210 g soya animal<sup>-1</sup> y R8 = 120 g de UP animal<sup>-1</sup> + 120 g de U animal<sup>-1</sup> + energía balanceada + AA balanceados.

**Digestión ruminal y en el tubo digestivo posterior de nutrientes:** en el Cuadro 25 se observa que sustituir pasta de soya por urea con o sin protección en la RTM favorece el porcentaje de digestibilidad de MS y MO ( $P \leq 0.01$ ). En cambio, por efecto de la combinación de UP + U con

un adecuado balance de energía y aminoácidos en la RTM, se incrementa la digestión ruminal de FDN y N ( $P \leq 0.01$ ) con respecto a la RTM testigo. El porcentaje de digestión de MS y MO en el tubo digestivo posterior no mostró cambios ( $P > 0.10$ ) entre tratamientos. Sin embargo el porcentaje de digestión de FDN y nutrientes N en el tubo digestivo posterior fue menor ( $P \leq 0.01$ ) por efecto de la U o UP en la RTM (Cuadro 25). Beever *et al.* (1985), Donaldson *et al.* (1989) y Cervantes *et al.* (2000) indican que concentraciones altas de nutrientes nitrogenados y carbohidratos altamente solubles en el rumen favorecen la digestibilidad de las dietas. En este contexto, el análisis de los resultados del presente estudio indicarían que los cambios provocados por sustituir pasta de soya por la combinación de U + UP con un adecuado balance de energía y aminoácidos en la DISMS, digestión ruminal y en el tubo digestivo posterior de MS, MO, FDN y N en dietas para vacas lecheras, se deben a la sincronización adecuada en la liberación de N-NH<sub>3</sub> con la disponibilidad de carbohidratos en rumen, favoreciendo la síntesis de proteína microbiana (Hristov *et al.*, 2005).

Cuadro 24. Efecto de la urea (U o UP) en la desaparición (%) *in situ* de materia seca (DISMS), durante 48 h de incubación

Incubación (h)	Tratamiento <sup>1</sup>				Error estándar
	R1	R2	R3	R8	
3	42.6 <sup>a</sup>	43.1 <sup>a</sup>	42.1 <sup>a</sup>	43.0 <sup>a</sup>	0.68
6	50.8 <sup>ac</sup>	50.1 <sup>bce</sup>	47.7 <sup>bdf</sup>	52.1 <sup>a</sup>	0.74
9	53.0 <sup>bde</sup>	55.2 <sup>ac</sup>	49.9 <sup>bdf</sup>	55.7 <sup>a</sup>	0.93
12	54.9 <sup>bde</sup>	59.2 <sup>ac</sup>	55.4 <sup>bce</sup>	60.8 <sup>a</sup>	2.05
24	67.8 <sup>a</sup>	68.0 <sup>a</sup>	66.7 <sup>a</sup>	68.9 <sup>a</sup>	2.07
48	77.9 <sup>a</sup>	79.6 <sup>a</sup>	77.8 <sup>a</sup>	80.1 <sup>a</sup>	1.13

<sup>a, b</sup> = medias con diferente literal en una hilera son diferentes ( $P \leq 0.01$ ).

<sup>1</sup>R1 = RTM testigo (2000 g soya animal<sup>-1</sup>); R2 = 120 g UP (urea protegida con un polímero) animal<sup>-1</sup> + 1210 g soya animal<sup>-1</sup>; R3 = 120 U (urea) animal<sup>-1</sup> + 1210 g soya animal<sup>-1</sup> y R8 = 120 g de UP animal<sup>-1</sup> + 120 g de U animal<sup>-1</sup> + energía balanceada + AA balanceados.

Cuadro 25. Digestión de nutrientes en rumen y en el tubo digestivo posterior en novillos Holstein antes y después de proporcionar un suplemento de urea y urea protegida con un polímero

Variable	Tratamientos				Error estándar
	R1	R2	R3	R8	
Digestión o absorción en rumen, % de consumo:					
Materia seca	47 <sup>bdf</sup>	51 <sup>ac</sup>	50 <sup>ace</sup>	52 <sup>a</sup>	1.09
Materia orgánica	52 <sup>bdf</sup>	56 <sup>ac</sup>	55 <sup>bce</sup>	58 <sup>a</sup>	1.08
FDN	48 <sup>bcd</sup>	50 <sup>ac</sup>	50 <sup>acd</sup>	52 <sup>a</sup>	1.42
N	66.2 <sup>bcd</sup>	68.0 <sup>ac</sup>	66.1 <sup>bcd</sup>	69.9 <sup>a</sup>	1.60
Digestión post-ruminal, % del flujo a duodeno:					
Materia seca	59 <sup>a</sup>	56 <sup>a</sup>	56 <sup>a</sup>	58 <sup>a</sup>	1.76
Materia orgánica	58 <sup>a</sup>	54 <sup>a</sup>	54 <sup>a</sup>	57 <sup>a</sup>	2.12
FDN	74 <sup>a</sup>	71 <sup>bde</sup>	71 <sup>bde</sup>	73 <sup>ac</sup>	0.82
N	75.6 <sup>a</sup>	73.2 <sup>bcd</sup>	73.3 <sup>bcd</sup>	74.2 <sup>ac</sup>	0.78

<sup>a, b</sup> =medias con diferente literal en una hilera son diferentes ( $P \leq 0.01$ ).

**Digestión total y excreción fecal de nutrientes:** La UP con un adecuado balance de aminoácidos y energía incrementó el porcentaje de digestión total de la MS y MO ( $P \leq 0.01$ ), mientras que su excreción fecal disminuyó ( $P \leq 0.02$ ). Con relación al porcentaje total de digestión de la FDN, ésta disminuyó con sólo sustituir la pasta de soya de la RTM por U con o sin protección ( $P \leq 0.01$ ), en cambio su excreción fecal se incrementó ( $P \leq 0.02$ ). No se observó cambios significativos ( $P < 0.1$ ) en el porcentaje de digestión total y excreción fecal del N entre tratamientos (Cuadro 26).

Cuadro 26. Digestión total (%) y excreción fecal ( $\text{g d}^{-1}$ ) de nutrientes en novillos Holstein antes y después de proporcionar un suplemento de urea y urea protegida con un polímero

Variable	Tratamientos				Error estándar
	R1	R2	R3	R8	
Digestión total, %					
Materia seca	79 <sup>bc</sup>	79 <sup>bcd</sup>	78 <sup>bcd</sup>	80 <sup>a</sup>	0.53
Materia orgánica	80 <sup>bcd</sup>	80 <sup>bc</sup>	79 <sup>bcd</sup>	82 <sup>a</sup>	0.52
FDN	87 <sup>ac</sup>	86 <sup>bde</sup>	85 <sup>bde</sup>	87 <sup>a</sup>	0.34
N	84.1 <sup>a</sup>	83.7 <sup>a</sup>	83.2 <sup>a</sup>	84.9 <sup>a</sup>	0.89
Excreción fecal, $\text{g d}^{-1}$					
Materia seca	1702 <sup>bce</sup>	1704 <sup>ac</sup>	1784 <sup>a</sup>	1620 <sup>bdf</sup>	42.17
Materia orgánica	1479 <sup>ac</sup>	1471 <sup>ace</sup>	1520 <sup>a</sup>	1340 <sup>bdf</sup>	39.70
FDN	784 <sup>bde</sup>	826 <sup>ac</sup>	857 <sup>a</sup>	765 <sup>bde</sup>	20.96
N	37.2 <sup>a</sup>	39.5 <sup>a</sup>	37.5 <sup>a</sup>	34.6 <sup>a</sup>	3.54

<sup>a, b</sup> = medias con diferente literal en una hilera son diferentes ( $P \leq 0.01$ ).

### **3.6 Conclusiones**

En dietas formuladas para vacas lecheras, sustituir la pasta de soya por la combinación de urea de rápida solubilidad e hidrólisis y de urea protegida con un polímero con solubilidad paulatina (1:1), pero con adecuado balance de energía y aminoácidos, causa un efecto positivo en las variables de respuesta digestiva al disminuir el porcentaje de materia seca, concentración total de sólidos y líquidos, y concentración de amonio en rumen; además también se reduce el flujo de materia seca y fibra detergente neutro a duodeno y su excreción. Así mismo, se incrementó la digestibilidad ruminal y el porcentaje total de digestión de la MS, MO, FDN y compuestos nitrogenados (N); además, la DISMS en la 9 y 12 horas de incubación. Con respecto al ambiente ruminal sólo se incrementó la concentración total de ácidos grasos volátiles.

### 3.7 Literatura citada

- ANKOM, 2000. Operator's manual ANKOM automated fiber analyzer. O'Neil Rd Macedon N. Y. 14502. pp: 7 – 17.
- AOAC, 2003. Official Methods of Analysis, 17<sup>th</sup> edition. Association of Official Analytical Chemist. Washington, D.C.
- Beever, D. E., D. J. Thomson, M. J. Ulyatt, S. B. Cammell, and M. C. Spooner. 1985. The digestion of fresh perennial ryegrass (*Lolium perenne* L. cv. Melle) and white clover (*Trifolium repens* L. cv. Blanca) by growing cattle fed indoors. British Journal of Nutrition 54: 763 – 775.
- Calsamiglia, S., y A. Ferret. 2002. Fisiología ruminal relacionada con la patología digestiva: Acidosis y meteorismo. Departamento de ciencia animal y de los alimentos. Universidad Autónoma de Barcelona. XVIII Curso de especialización. pp: 97 – 115.
- Cervantes, R. M., C. E. Álvarez, O. N. Torrentera, M. G. Mendoza, S. S. Espinoza, F. A. Velderrain, y S. González. 2000. Época de corte y composición nutricional, sitio y grado de digestión de ballico anual (*Lolium multiflorum*) en novillos. Agrociencia 34: 413 – 422.
- Donaldson, R. S., M. A. McCann, H. E. Amos, and C. S. Hoveland. 1989. Effects of implant and protein supplementation on steers grazing winter annuals. Journal of Animal Science 67 (Supplement 2): 34-38.
- Forero, O., F. N. Owens, and K. S. Lusby. 1980. Evaluation of slow-release urea for winter supplementation of lactating range cows. Journal of Animal Science 50:532-538.
- Garrett, J., T. Miller-Webster, W. Hoover, C. Sniffen, and D. Putnam. 2005. Encapsulated slow release urea in lactating dairy cow diets impacts microbial efficiency and metabolism in continuous culture. Journal of Animal Science 83(Supplement 1):321 (Abstract).
- Hess, H. D., L. M. Monsalve, C. E. Lascano, J. E. Carulla, T. E. Díaz, and M. Kreuzer. 2003. Supplementation of a tropical grass diet with forage legumes and *Sapindus saponaria* fruits: effects on in vitro ruminal nitrogen turnover and methanogenesis. Australian Journal of Agricultural Research 54: 703-717.
- Hill, F. N., and D. L. Anderson. 1958. Comparison of metabolizable energy and productive energy determination with growing chicks. Journal of Nutrition 64: 587-603.
- Hristov, A. N., J. K. Ropp, K. L. Grandeen, S. Abedi, R. P. Etter, A. Melgar, and A. E. Foley. 2005. Effect of carbohydrate source on ammonia utilization in lactating dairy cows. Journal of Animal Science 83:408 – 421.



- Huhtanen, P., and H. Khalili. 1991. Sucrose supplements in cattle given grass silage-based diet. *Animal Feed Science and Technology* 33: 275 – 287.
- Huntington, G. B., D. L. Harmon, N. B. Kristensen, K. C. Hanson, and J. W. Spears. 2006. Effects of a slow-release urea source on absorption of ammonia and endogenous production of urea by cattle. *Animal Feed Science and Technology* 130: 225–241
- Ipharraguerre, R., and J. H. Clark. 2003. Soyhulls as an alternative feed for lactating dairy cows: A review. *Journal of Dairy Science* 86:1052-1073
- Khalili, H., and P. Huhtanen. 2002. Effect of casein infusion in the rumen, duodenum or both sites on factors affecting forage intake and performance of dairy cows fed red clover-grass silage. *Journal of Dairy Science* 85:909–918
- King, D. 2005. Optigen: la tecnología del nitrógeno. Una herramienta en la formulación de la dieta para optimizar la salud ruminal y el desempeño del ganado. *In: Memoria del 5<sup>a</sup> Ronda de Biotecnología en Ganado Lechero*. Alltech de México S.A. de C.V. Querétaro, México. pp: 37 – 40.
- Lobley, G. E., D. M. Bremner, and G. Zuur. 2000. Effects of diet quality on urea fates in sheep as assessed by refined, non-invasive [<sup>15</sup>N<sup>15</sup>] urea kinetics. *British Journal of Nutrition* 84: 459 – 468.
- Löset, C. A., E. C. Titgemeyer, J. S. Drouillard, B. D. Lambert, and A. M. Trater. 2001. Urea and biuret as nonprotein nitrogen sources in cooked molasses blocks for steers fed prairie hay. *Animal Feed Science and Technology* 94:115 – 126.
- Ludden, P. A., D. L. Harmon, B. T. Larson, and D. E. Axe. 2000. Influence of the novel urease inhibitor *N*-(*n*-butyl) thiophosphoric triamide on ruminant nitrogen metabolism: I. In vitro urea kinetics and substrate digestion. *Journal of Animal Science* 78:181– 187.
- Mathison, G. W., S. R. Soofi, and M. Worsley. 1994. The potential of isobutyraldehyde monourea (propanal, 2-methyl-monourea) as a nonprotein nitrogen source for ruminant animals. *Canadian Journal of Animal Science* 74:665 – 674.
- Mertens, D. R., and L. O. Ely. 1979. A dynamic model of fiber digestion and passage in the ruminant for evaluating forage quality. *Journal of Animal Science* 49: 1085 – 1095.
- Nocek, J. E., and J. E. English. 1986. In situ digestion kinetics: Evaluation of rate determination procedures. *Journal of Dairy Science* 69:77 – 87.
- Oltjen, R. R., L. L. Slyter, A. S. Kozak, and E. E. Williams. 1967. Evaluation of urea, biuret, urea phosphate and uric acid as NPN sources for cattle. *Journal of Nutrition* 94: 68 – 70.

- Ramírez, J. E., E. G. Álvarez, M. Montano, Y. Shen, and R. A. Zinn. 1998. Influence of dietary magnesium level on growth-performance and metabolic responses of Holstein steers to laidlomycin propionate. *Journal of Animal Science* 76:1753 – 1759.
- Russell, J. B., 1998. Strategies that ruminal bacteria use to handle excess carbohydrate. *Journal of Animal Science* 76: 1955–1963.
- SAS. Institute Inc. 1999. SAS User's Guide Statistics. Version 8.0. Cary North Carolina, USA. pp: 956 – 971.
- Tedeschi, L. O., M. J. Baker, D. J. Ketchen, and D. G. Fox. 2002. Performance of growing and finishing cattle supplemented with a slow-release urea product and urea. *Canadian Journal of Animal Science* 82:567–573.
- Vanzant, E. S., R. C. Cochran, and E. C. Titgemeyer. 1998. Standardization of in situ techniques for ruminant feedstuff evaluation. *Journal of Animal Science* 76:2717-2729.
- Wang, Z., and L. A. Goonewrdene. 2004. The use of mixed in the analysis of animal experiments with repeated measures data. *Canadian Journal of Animal Science* 84: 1 – 11.
- Whitelaw, F. G., J. S. Milne, and S. A. Wright. 1991. Urease (EC 3.5.1.5) inhibition in the sheep rumen and its effect on urea and nitrogen metabolism. *British Journal of Nutrition* 66:209–225.
- Wolin, M. J. 1960. A theoretical rumen fermentation balance. *Journal of Dairy Science* 43:1452-1459.
- Zinn, R. A., and F. N. Owens. 1986. A rapid procedure for purine measurement and its use for estimating net ruminal protein synthesis. *Canadian Journal of Animal Science* 66:157-166.

## CAPITULO IV. CONCLUSIONES GENERALES

La inclusión de urea sintética, aunque limitada (1 – 3%), en dieta para rumiantes ha sido viable debido a la capacidad de los microorganismos ruminales para utilizar nutrientes nitrogenados no proteínicos en la síntesis de proteína microbiana, la cual está disponible al rumiante cuando pasa al tubo digestivo posterior.

El recubrimiento de la urea con un polímero sintético biodegradable, resistente a la actividad de microorganismos ruminales, temperatura y pH, permitió la lenta liberación de la urea en el medio ruminal y una menor hidrólisis a nitrógeno amoniacal. Lo anterior abre la posibilidad de sustituir parte del nitrógeno proteínico por nitrógeno no proteínico, sin causar efectos secundarios ni perjudiciales en la salud de los bovinos.

Además, el análisis de los resultados obtenidos *in vitro* e *in situ* acerca de los efectos de la urea protegida con polímero sintético en variables ruminales, microbiológicas y fermentativas, sugiere que es factible el uso de la urea en combinación con urea protegida (1:1) más un adecuado balance de energía y aminoácidos, en la alimentación de vacas lecheras. No obstante, es recomendable realizar un estudio *in vivo* acerca del efecto de la urea protegida en variables de producción y calidad de leche en vacas lecheras, con el propósito de verificar los resultados obtenidos en la presente investigación.

**Anexo A. Preparación de la solución mineral reducida de acuerdo con Bryant y Robinson (1962)**

1. Solución carbonato de sodio al 8%, (se aforó a 1000 mL de agua destilada y esterilizada)
  - a. 8.0 g de  $\text{NaCO}_3$
2. Solución mineral I (se aforó a 1000 mL de agua destilada y esterilizada)
  - a. 6.0 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$
3. Solución mineral II (se aforó a 1000 mL de agua destilada y esterilizada)
  - a. 6.0 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
  - b. 6.0 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
  - c. 12.0 g  $\text{NaCl}$
  - d. 2.45 g  $\text{MgSO}_4$
  - e. 1.6 g  $\text{CaCl}_2\text{H}_2\text{O}$
4. Solución de resarzurina
  - a. 0.1 mL de solución de resarzurina al 1% en agua
5. Solución sulfito - cisteina (se aforó a 100 mL de agua destilada y esterilizada)
  - a. 2.5 g de L – cisteína disuelta en 15 mL de  $\text{NaOH}$  2 N (se colocó 4 g en 50 mL de agua destilada)
  - b. 2.5 g de  $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$
  - c. 0.1 mL de rezarsurina

Las soluciones (1), (2), (3), y (4) se mezclaron en las siguientes cantidades para obtener la solución mineral reducida:

50 mL de  $\text{NaCO}_3$

75 mL de solución mineral I

75 mL de solución mineral II

750 mL de agua destilada

1 gota de resarzurina.

50 mL solución sulfito-cisteina (calentada hasta su decoloración)

## Anexo B. Cálculos

### B1. Tasa de pasaje

Basándose en el modelo de Mertens y Ely (1979) la tasa de pasaje ( $K_p$ ) de la FDN se calculó de la siguiente manera:  $K_p = ((FDNI * (1-DRFDN)) / (S * (RFDN/100)))/24$ , donde: FDNI = consumo diario total de FDN, DRFDN = digestibilidad ruminal de FDN (%), S = sólidos en rumen (g), RFDN = FDN en rumen, como porcentaje del total de los sólidos ruminales. La tasa ruminal de digestión de FDN se determinó con la siguiente relación:  $DRFDN = K_d / (K_d + K_p)$ :

### B2. Flujo, excreción, y digestibilidad de nutrientes

El flujo a duodeno de materia seca (FDMS) se calculó con la siguiente formula:

$$FDMS = \left( \frac{Cr_{alimento}}{Cr_{duodeno}} \right) * CMS$$

Donde  $Cr$  es la concentración de cromo en la dieta (alimento) o quimo duodenal (duodeno), mientras que CMS es el consumo diario de materia seca. Usando el FDMS se calculó el flujo a duodeno de otros nutrientes:

$$FD_x = FDMS * X_{duodeno}$$

Donde  $FD_x$  es el flujo diario a duodeno del nutriente x (MO, FDN, NN-amoniaco, N microbiano, N alimento), mientras que  $X_{duodeno}$  es el contenido del nutriente x en quimo duodenal.

Para el cálculo de la excreción fecal diaria de MS (EFMS):

$$EFMS(g\ d^{-1}) = \left( \frac{Cr_{alimento}}{Cr_{duodeno}} \right) * CMS$$

Donde  $Cr$  es la concentración de cromo en la dieta (alimento) o materia fecal (heces) mientras que CMS es el consumo diario de MS. Usando EFMS se calculó la excreción fecal de otros nutrientes:

$$EF_x = EFMS * X_{heces}$$

Donde  $EF_x$  es la excreción fecal diaria del nutriente  $x$  (MO, FDN, N), mientras que  $X_{heces}$  es el contenido del nutriente en heces.

La digestión ruminal, en el tubo digestivo posterior y total de nutrientes (o desaparición en el caso de N) se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Ruminal} = \left( \frac{\text{Consumo}_x - \text{Flujo}_x}{\text{Consumo}_x} \right) * 100$$

$$\text{Tubo digestivo posterior} = \left( \frac{\text{Flujo}_x - \text{Excreción}_x}{\text{Flujo}_x} \right) * 100$$

$$\text{Total} = \left( \frac{\text{Consumo}_x - \text{Excreción}_x}{\text{Consumo}_x} \right) * 100$$

Donde  $\text{Consumo}_x$ ,  $\text{Flujo}_x$ , y  $\text{Excreción}_x$  es el consumo, flujo y excreción diaria del nutriente  $x$ . Adicionalmente se calculó la eficiencia del NM y NNA de la siguiente forma:

$$ENM = \frac{\text{FDNM}}{\text{MO}_{\text{fermentada}}}$$

$$ENNA = \frac{\text{FDNNA}}{\text{N}_{\text{consumido}}}$$

Donde  $\text{MO}_{\text{fermentada}}$  es la diferencia entre MO consumida menos la MO que llega a duodeno (kg), mientras que  $\text{N}_{\text{consumido}}$  corresponde a los g de N consumido  $d^{-1}$ .