



Evaluación *in vitro* de una fuente de nitrato protegido para rumiantes: efecto sobre la degradación de la materia seca y producción de metano



María Elizabeth Rendón-Correa ^a

Sandra Lucia Posada-Ochoa ^a

Jaime Ricardo Rosero-Noguera ^{a*}

^a Universidad de Antioquia. Facultad de Ciencias Agrarias. Grupo de Investigación en Ciencias Agrarias – GRICA Calle 70 No. 52 – 21, Apartado aéreo 1226. Colombia.

*Autor de correspondencia: jaime.rosero@udea.edu.co

Resumen:

El objetivo fue evaluar un método para reducir la tasa de liberación del nitrato de calcio en un ambiente de fermentación ruminal simulado, y determinar su efecto sobre la degradación de la materia seca y la producción de metano. En el experimento *in vitro* se usó pasto kikuyo (*Cenchrus clandestinus*, *Hochst ex Chiov*) (KK) como alimento base y la adición de nitrato protegido (NP), nitrato libre (NL) y urea (KU) al ambiente de fermentación. La cantidad de nitrato adicionado correspondió al 3 % de la materia seca incubada. Los datos se analizaron con medidas repetidas en el tiempo considerando como efectos fijos el tratamiento y el tiempo y como factor aleatorio el animal donador del inóculo ruminal. Después de 24 h de incubación, el NL y el NP redujeron la degradación de la materia seca en 11.4 y 15 %, respectivamente. La adición de nitratos redujo significativamente la producción de metano. La diferencia en las tasas de producción de metano expresadas en ml/g de materia seca degradada entre los tratamientos NL (21.0) y NP (31.2) a las 48 h de incubación, indican menor tasa de liberación del nitrato como consecuencia del método de protección empleado. Los resultados de este ensayo muestran que la inclusión de nitratos protegidos en niveles correspondientes al 3 % de la materia seca incubada pueden llegar a reducir en un 53 % la producción de metano.

Palabras clave: Aditivos, Metano, Nitrato encapsulado.

Recibido: 20/01/2023

Aceptado: 03/09/2024

Entre los gases de efecto invernadero (GEI) originados por la actividad humana, el metano (CH_4) es el gas emitido en mayor cuantía después del dióxido de carbono (CO_2). Si bien el CH_4 permanece en la atmósfera durante un período más corto de tiempo y se emite en cantidades menores, su potencial de calentamiento global es entre 25 a 34 veces mayor que el del CO_2 ⁽¹⁾. Las emisiones de CH_4 entérico representan el 30 % de las emisiones mundiales de este gas. Debido a que el CH_4 es un contaminante climático de vida corta, la reducción de las emisiones de CH_4 entérico pueden ayudar a mitigar el cambio climático dentro de nuestro actual tiempo de vida⁽²⁾.

En los rumiantes, la producción de CH_4 ocurre durante la fermentación entérica de la materia orgánica, debido a la necesidad de remover el hidrógeno del rumen para mantener un bajo potencial redox en el sitio de la fermentación. El nitrato (NO_3^-), un aceptor de electrones, se ha estudiado como una vía potencial para direccionar los equivalentes reducidos lejos de la metanogénesis; presentándose como una ruta disipadora de hidrógenos con utilidad para el animal y el medio ambiente⁽³⁾. En el rumen el NO_3^- es reducido a nitrito (NO_2^-) ($\text{NO}_3^- + \text{H}_2 \rightarrow \text{NO}_2^- + \text{H}_2\text{O}$) y éste al ion amonio (NH_4^+) ($\text{NO}_2^- + 3\text{H}_2 + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{NH}_4^+ + 2\text{H}_2\text{O}$), proceso que captura cuatro moles de hidrógeno por mol de NO_3^- reducido⁽⁴⁾. La reducción de NO_3^- a NO_2^- tiene un $\Delta G = -130$ kJ y de NO_2^- a NH_4^+ , presenta un $\Delta G = -371$ kJ, los cuales son energéticamente más favorables que la producción de metano ($\Delta G = -67$ KJ)⁽⁵⁾. La reducción de NO_2^- a NH_4^+ es un paso lento, debido a la baja producción de la enzima nitrito-reductasa de los microorganismos ruminales, lo que puede conducir a un aumento en los nitritos a nivel ruminal. Estos nitritos atraviesan la pared ruminal y pasan a la circulación sanguínea uniéndose a la hemoglobina y formando metahemoglobina, afectando el transporte de oxígeno en la sangre; lo que finalmente podría provocar la muerte por hipoxia⁽⁶⁾. Considerando que el suministro del NO_3^- puro puede presentar riesgos para la salud del animal, se han realizado varios trabajos con NO_3^- encapsulado para liberarlo lentamente a los microorganismos ruminales y disminuir su potencial efecto tóxico^(7,8,9). El objetivo de este trabajo fue evaluar un método para reducir la tasa de liberación del nitrato de calcio en un ambiente de fermentación ruminal simulado, y determinando su efecto sobre la degradación de la materia seca y la producción de metano.

El experimento se realizó en el laboratorio Nutrilab-Grica en la Sede de Investigación Universitaria (SIU) de la Universidad de Antioquia - Colombia.

Una muestra de pasto kikuyo (*Cenchrus clandestinus*, Hochst ex Chiov) de 45 días de rebrote se colectó en la hacienda “La Montaña” localizada en el municipio de San Pedro de los milagros (Antioquia – Colombia) a una altura de 2,470 msnm y una temperatura media de 16 °C, correspondiendo a una zona de vida Bosque Húmedo Montano Bajo.

La muestra de pasto se secó parcialmente en horno de ventilación forzada a 60 °C por 72 h, molida a través de un tamiz de 1 mm y almacenada para su posterior análisis químico. Sobre la muestra parcialmente seca de pasto se determinaron las concentraciones de materia seca (MS), proteína cruda (PC) y cenizas⁽¹⁰⁾. Las proporciones de fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) se determinaron como describe Van Soest *et al*⁽¹⁰⁾. El Cuadro 1 presenta la composición química del pasto kikuyo.

Cuadro 1: Composición química del pasto kikuyo (*Cenchrus clandestinus*)

Composición química	Valor
Materia seca (MS), %	23.5
Proteína cruda, % MS	20.6
Fibra en detergente neutro, % MS	57.2
Fibra en detergente ácido, % MS	30.3
Cenizas, % MS	11.5

La fuente de NO³⁻ empleada fue nitrato de calcio (CALCINIT, 15.5-0-0, YARA, Bogotá, Col.). La protección del NO³⁻ se realizó con el uso de un jabón, producido artesanalmente a partir de la saponificación de un aceite de soya comercial con hidróxido de sodio (NaOH, Merck N° 106462).

Los tratamientos evaluados fueron pasto kikuyo incubado como tratamiento testigo (KK), pasto kikuyo + nitrato sin protección (NL), pasto kikuyo + nitrato protegido (NP) y pasto Kikuyo + urea (KU). Los tratamientos con NO³⁻ se ajustaron para aportar 3 % de nitrato/g MS incubada. El tratamiento con urea se incluyó como testigo control, para evidenciar el efecto que tendría la adición de nitrógeno sobre la degradación de la materia seca y la producción de CH₄.

El contenido de nitrógeno presente en los aditivos se determinó por el método Kjeldahl⁽¹⁰⁾; para urea 48.1, nitrato sin protección 13.0 y nitrato protegido 3.9.

El líquido ruminal para la incubación *in vitro* se obtuvo de tres vacas Holstein adultas no lactantes, provistas de cánula ruminal de una etapa descrito por Castillo y Hernández⁽¹¹⁾. Los animales donadores se manejaron en un sistema de pastoreo rotacional con pasto kikuyo, libre acceso a agua fresca y suplemento mineral. El líquido ruminal se colectó en horas de la mañana (0600) y se transportó al laboratorio en recipientes térmicos previamente

climatizados con agua a 39 °C. El líquido ruminal fue gaseado con CO₂ y filtrado a través de cuatro capas de algodón y conservado en un baño maría a 39 °C para el proceso de inoculación.

Un día antes del inicio del experimento, una solución buffer se preparó de acuerdo con lo descrito por McDougall⁽¹²⁾. Esta solución se mezcló con cada uno de los inóculos colectados en una proporción 9:1 (buffer: inóculo). Una muestra de 0.5 g de pasto kikuyo y los aditivos a evaluar se pesaron y dispuestos en frascos de vidrio con capacidad de 100 ml. Posteriormente, un volumen de 50 ml de la solución buffer-inóculo se adicionó a cada frasco; durante el proceso continuamente se gaseó con CO₂ para garantizar condiciones de anaerobiosis y se procedió a su sellado con tapones de caucho. Los frascos sellados se mantuvieron en estufa de ventilación forzada a 39 °C y se retiraron del proceso de incubación en los horarios de 24 y 48 h posteriores a la incubación para determinar la degradación de la MS y la producción de CH₄.

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

La producción total de gases se midió a las 24 y 48 h de incubación a través de la medición de la presión generada en cada frasco con el uso de un transductor digital (Ashcroft 2089QG-Precision Digital Test Gauges, USA) descrito por Posada *et al*⁽¹³⁾. Posterior a la medición se tomó una muestra de gas para determinar la concentración de gas CH₄. Se utilizó una válvula de tres salidas. La primera salida se conectó a una aguja (0.6 mm), la segunda conectada al transductor de presión y la tercera a una jeringa plástica que sirvió para la extracción de la muestra de gas. La aguja acoplada a la válvula se insertó a través de la tapa de caucho para la medición de la presión, y posteriormente los gases acumulados en la parte superior del frasco se retiraron con el uso de la jeringa hasta el punto de que la presión registrada en el transductor alcanzó el valor de cero. El gas colectado en la jeringa se almacenó en bolsas de poliolefina coextruida tipo Clear Flex (Baxter, USA). Luego de finalizar la toma de muestras, se procedió con la medición de las concentraciones de CH₄ por cromatografía gaseosa. Una submuestra de 100 µl de gas se tomó de cada bolsa con la ayuda de una jeringa para ser inyectada en un cromatógrafo de gases Thermo Trace GC Ultra (Thermo Scientific, USA). La producción de CH₄ se estableció como el producto del volumen total de gas registrado en el tiempo de incubación (24 y 48 h) y la concentración de CH₄ determinada en la muestra por cromatografía de gases.

Después del muestreo de gas en cada horario de medición se abrieron los frascos para medir la materia seca degradada (MSD), determinada por diferencia de peso entre la MS incubada (MSI) y el residuo después de su incubación. Para determinar la MSD por gravimetría, el contenido de cada frasco se filtró a través de crisoles de vidrio (porosidad 1, 100 - 160 μm) con ayuda de una bomba de vacío. El conjunto crisol-residuo se secó en estufa de ventilación forzada a 60 °C por 48 h y posteriormente pesado. Luego de descontar el peso del crisol se obtuvo el valor de la MS degradada como la diferencia entre la MS del residuo y la MS del blanco, todo esto dividido entre el valor de la MS inicialmente incubada⁽¹⁴⁾. La fracción líquida de cada frasco de incubación se preservó con la adición de ácido sulfúrico (98 % v/v) gota a gota hasta lograr un pH promedio de 2; cada muestra se centrifugó a 4,000 rpm por 10 min y finalmente se tomó una submuestra de 1.5 ml de sobrenadante para la medición de los ácidos grasos volátiles (AGV), (acético, propiónico y butírico), por cromatografía gaseosa. La fracción líquida restante se utilizó para determinar las concentraciones de nitrógeno amoniacal (N-NH₃) por el método de Kjeldahl⁽¹⁰⁾.

El efecto de los tratamientos sobre la producción de gases, CH₄ y degradación de la MS se analizaron con un modelo de medidas repetidas en el tiempo, usando el procedimiento PROC MIXED de SAS⁽¹⁵⁾ donde los efectos fijos correspondieron al tratamiento y el tiempo (horarios), y el efecto aleatorio a la fuente de inóculo ruminal (animal). La comparación de medias se realizó con la prueba Tukey - Kramer ($P < 0.05$). Las diferencias entre tratamientos con respecto a la producción de AGV y N-NH₃ a las 24 h se midieron con un modelo completamente aleatorizado, empleando el procedimiento GLM de SAS⁽¹⁵⁾. Las diferencias entre medias se determinaron con la prueba de comparaciones múltiples de Duncan ($P < 0.05$).

El efecto del NO₃⁻ sobre la MSD, producción de gases y producción de CH₄ *in vitro* en los intervalos de medición de 0 a 24 h y 0 a 48 h se presentan en el Cuadro 2. Los tratamientos con NO₃⁻ presentaron una reducción en la degradación de la MS a las 24 h de incubación. El NP provocó una reducción en la DMS del 24 % en tanto que la reducción ocasionada por el NL fue del 18 % cuando comparados con el tratamiento control (KK). A las 48 h de incubación no se presentaron diferencias estadísticas ($P > 0.05$) entre tratamientos. Cuando la DMS se expresó en términos porcentuales, claramente los tratamientos que incluyeron nitratos presentan menores degradaciones a las 24 y 48 h de incubación ($P < 0.01$) que el tratamiento KK. La comparación en los tratamientos KU y KK, evidencia que la adición de urea al ambiente de fermentación no tuvo efecto sobre DMS y la producción de CH₄, indicando que el aporte de nitrógeno en el tratamiento control (KK) fue el suficiente para mantener la actividad microbiana durante el proceso de incubación.

Cuadro 2: Efecto del nitrato con y sin protección sobre la producción total de gas, producción de metano y la materia seca degradada (MSD) en dos horarios de fermentación *in vitro*

Variable	Horario	Tratamientos				Efectos		
		KK	NL	NP	KU	T	Ti	Tx Ti
MSD, g	0 a 24 h	0.266 ^a	0.218 ^{bc}	0.202 ^c	0.248 ^{ab}	0.01	0.01	0.03
	0 a 48 h	0.271	0.27	0.267	0.30			
MSD, %	0 a 24 h	55.5 ^{ab}	49.2 ^{bc}	47.0 ^c	56.1 ^a	0.01	0.01	0.33
	0 a 48 h	64.6 ^{ab}	58.5 ^b	60.5 ^b	67.9 ^a			
Producción de gas, ml	0 a 24 h	46.9 ^a	35.2 ^{ab}	23.4 ^b	45.1 ^a	0.01	0.01	0.01
	0 a 48 h	84.2 ^a	57.1 ^b	60.1 ^b	84.4 ^a			
Producción de gas, ml/g de MSD	0 a 24 h	177.8 ^a	161.0 ^{ab}	115.3 ^b	181.5 ^a	0.01	0.01	0.01
	0 a 48 h	313.8 ^a	211.2 ^c	225.6 ^b	279.7 ^{ab}			
Metano, ml	0 a 24 h	8.2 ^a	2.6 ^b	1.6 ^b	7.8 ^a	0.01	0.01	0.01
	0 a 48 h	17.7 ^a	5.7 ^b	8.3 ^b	16.35 ^a			
Metano, ml/100 ml de gas	0 a 24 h	17.5 ^a	7.4 ^b	6.8 ^b	17.2 ^a	0.01	0.01	0.05
	0 a 48 h	21.0 ^a	9.7 ^b	13.8 ^b	19.4 ^a			
Metano, ml/g de MSD	0 a 24 h	30.9 ^a	12.0 ^b	7.8 ^b	31.2 ^a	0.01	0.01	0.01
	0 a 48 h	66.0 ^a	21.0 ^b	31.2 ^b	54.2 ^a			

KK= kikuyo (*Cenchrus clandestinus*); NL= kikuyo + nitrato libre; NP= kikuyo + nitrato protegido; KU= kikuyo + urea; T= efecto del tratamiento; Ti= efecto del horario de incubación; TxTi= efecto de la interacción entre el tratamiento y el horario de incubación.

^{abc} Medias de tratamientos con diferente letra en la misma fila presentan diferencias ($P < 0.05$).

La producción total de gas se redujo significativamente ($P < 0.001$) con el tratamiento NP a las 24 h de incubación, en comparación con los tratamientos KK y KU. Transcurridas 48 h de incubación *in vitro*, los tratamientos NP y NL disminuyeron en promedio un 30 % la producción total de gas con relación a los tratamientos KK y KU ($P < 0.05$). Cuando se expresó el volumen de gas en ml/g MSD, el tratamiento NP produjo un 35 % y 28 % menos de gas que el KK durante las 24 y 48 h *in vitro*.

Los tratamientos NL y NP redujeron en 68 y 80 % la producción total de CH₄ con respecto al KK ($P < 0.05$) a las 24 h. Finalizadas las 48 h el tratamiento NL mantiene un 68 % de reducción en el volumen de CH₄ y NP alcanza una disminución del 53 % con respecto al tratamiento KK.

El Cuadro 3, se presenta el efecto de la adición de NO₃⁻ protegido y sin protección sobre la producción de AGV y nitrógeno amoniacal (N-NH₃) en un sistema de fermentación *in vitro*. La producción de AGV y N-NH₃ no fue afectada por la adición de NO₃⁻ o urea al ambiente de fermentación ($P > 0.05$).

Cuadro 3: Efecto del nitrato con y sin protección sobre la producción de ácidos grasos volátiles y nitrógeno amoniacal (N-NH₃) a las 24 horas de fermentación *in vitro*

Variables	Tratamientos				Valor de P
	KK	NL	NP	KU	
Acético, mmol/L	62.9	58.9	76.7	98.2	0.29
Propiónico, mmol/L	16.9	14.5	12.3	20.3	0.44
Butírico, mmol/L	8.5	7.7	7.1	8.5	0.20
N-NH ₃ , mg/L	14.0	10.5	10.5	11.7	0.69

KK= kikuyo (*Cenchrus clandestinus*); NL= kikuyo + nitrato libre; NP= kikuyo + nitrato protegido; KU= kikuyo + urea.

La disminución en la MSD presentada con el NP pudo ser consecuencia del jabón empleado para la protección. Existen evidencias de que el jabón de soya presenta una alta disociación en medios con pH cercanos a 6.5⁽¹⁶⁾. Esta característica del jabón de soya quizá podría producir un incremento en el contenido de ácidos grasos poliinsaturados, lo cuales deprimen significativamente la digestibilidad de la pared celular⁽¹⁷⁾. De haberse presentado una alta disociación del jabón, se favorece la velocidad de liberación del NO³⁻, lo que también pudo disminuir la MSD. Por lo tanto, con el NP se pudo presentar un efecto aditivo de los ácidos grasos insaturados y el NO²⁻ en la reducción de la MSD. Por otra parte, en los tratamientos NL y NP se pudo reducir la MSD por el efecto tóxico de los nitritos (NO²⁻), los cuales generan la inhibición del crecimiento y la abundancia de metanógenos y otras bacterias importantes como *F. succinogenes* y *R. flavefaciens* en la degradación de la materia seca en rumen^(18,19).

La mitigación en la producción de CH₄ por la inclusión de NO³⁻ *in vitro* ha sido reportada previamente^(8,20,21). En el presente estudio, la utilización de una dosis del 3 % de NO³⁻, con el tratamiento de NL, redujo en 68 % la producción de CH₄ /g MSD durante las 48 h de incubación. La reducción observada con NL en la producción de CH₄ pudo deberse a la alta capacidad reductora del NO³⁻ en medio anaerobio^(22,23). El NO³⁻ se comporta como un sumidero alternativo de hidrógeno en rumen, a través de su reducción hasta NH₄⁺, proceso energéticamente más favorable ($\Delta G = -501$ kJ) que la reducción de CO₂ a CH₄ ($\Delta G = -67$ KJ)⁽⁵⁾. Además, el NO²⁻, proveniente de la reducción del NO³⁻ pudo haber ejercido un efecto tóxico sobre la población de metanógenos y algunas bacterias celulolíticas^(19,23) como se mencionó, lo que pudo favorecer la tendencia en la reducción de la MSD.

Con el NP se alcanzó un porcentaje de reducción del 74 % en la producción de CH₄ en ml/g de MSD, afectando la degradación de la MS en 21 %, a las 24 h en comparación con el tratamiento control (KK). Natael *et al*⁽¹⁸⁾, evaluando una dosis similar de NP (3 % de la MS incubada), en una dieta 80:20 (forraje: concentrado) encontraron una reducción del 10 % en la producción de CH₄ durante el mismo tiempo de incubación, sin afectar la degradación de la materia orgánica incubada. Con una inclusión del 15 % de NP en 24 horas *in vitro*, Lee *et*

al⁽⁸⁾ obtuvieron una reducción del 45 % en el volumen de CH₄ producido con respecto al control.

El propósito de usar NP es disminuir la velocidad de disolución del NO³⁻, para favorecer el crecimiento de bacterias reductoras de NO³⁻ y NO²⁻ que aceleren la formación de NH⁴⁺ ⁽⁸⁾. El incremento en este tipo de bacterias favorece la velocidad de reducción de NO³⁻ a NO²⁻ y a su vez de NO²⁻ a NH⁴⁺ lo que implicaría una disminución en el riesgo de toxicidad que representa el NO²⁻ tanto para los microorganismos ruminales como para el animal hospedero. Teóricamente, la reducción de 0.015 g de NO³⁻ debería disminuir 5.32 ml de CH₄^(24,25), pero con NP se obtuvo una reducción total de 9.4 ml de CH₄, lo que corresponde a un 76 % más de lo esperado. Este comportamiento posiblemente se presentó por un efecto factorial de los ácidos grasos poliinsaturados provenientes de la disociación del jabón y el NO²⁻, proveniente de la reducción del NO³⁻, sobre la disminución en la MSD, lo que finalmente favoreció la reducción en la producción de CH₄ *in vitro*. La disociación del jabón elaborado con aceite de soya quizá favoreció la reducción en la producción de CH₄, como lo sucedido en otro trabajo⁽²⁶⁾, donde encontraron una fuerte correlación entre el alto grado de instauración del aceite de soya y la reducción significativa en el número de metanógenos y densidad de protozoos en rumen. Esta correlación favoreció la reducción en la producción de CH₄ en un 60 % con respecto al control en 36 h *in vitro*. Machmüller⁽²⁷⁾ en un análisis realizado a ocho experimentos *in vitro* y cuatro *in vivo* acerca del potencial de los ácidos grasos de cadena media sobre la producción de CH₄, reportó una disminución significativa en el número de metanógenos y una reducción hasta del 40 % en la liberación de CH₄ con el uso de aceite de soya.

En el presente trabajo no se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) en el perfil de fermentación por el uso de NO³⁻, sin embargo, sí se presentó una diferencia numérica del 28 % en la producción de ácido propiónico con el NL y del 40 % con NP, en comparación con el tratamiento con urea (Cuadro 3). La adición de NO³⁻ en rumen puede disminuir la producción de CH₄ y a la vez de propionato, ya que, reduce la disponibilidad de hidrógenos, debido a que muchas bacterias reductoras de NO³⁻ pueden usarlos como sustrato⁽²⁸⁾, por lo tanto, esto puede generar competencia no solo con la metanogénesis, sino también con la propiogénesis⁽²⁹⁾. Se ha descrito⁽¹⁸⁾ que la inclusión de NO³⁻ protegido a razón del 3 % de la MS incubada en una dieta 80:20 (concentrado: forraje) dio una reducción lineal en la producción de ácido propiónico y un aumento en la de acético. Contrario a esto Lund *et al*⁽³⁰⁾, reportan que la producción de AGV no se afectó estadísticamente por la adición de NO³⁻ en ninguna de las concentraciones empleadas (6.66, 13.3 y 20 g/kg MS).

La concentración de N-NH₃ a las 24 h de incubación no presentó variaciones entre tratamientos. Contrario a lo encontrado en otros estudios^(8,26), donde las dietas con urea presentaron un incremento en la concentración de N-NH₃ en comparación con los tratamientos que contenían NL y NP. La razón para que el tratamiento KU no presenta un

aumento significativo en la concentración de NH_3 , transcurridas 24 h, puede ser debido a que aunque la urea es una fuente de nitrógeno altamente disponible, ésta se hidroliza rápidamente a NH_3 y es utilizada por los microorganismos ruminales para su crecimiento y desarrollo durante las tres primeras horas de incubación⁽³¹⁾, disminuyendo así los niveles de NH_3 e incrementando posiblemente la población bacteriana y la actividad fermentativa, comportamiento que coincide con el aumento en la MSD observado con el tratamiento KU. El hecho de que no se presentaran diferencias en la concentración de N- NH_3 entre los tratamientos NL y NP con respecto al control puede ser por el tipo de metabolismo presentado por el NO^{3-} . En el rumen el NO^{3-} se metaboliza principalmente por reducción asimilatoria hasta NH_3 pero dependiendo del equilibrio de las actividades enzimáticas, se puede formar óxido nitroso (N_2O) a través de la desnitrificación. Debido a que el inóculo ruminal utilizado en el actual estudio se obtuvo de animales no adaptados al NO^{3-} , es posible que el NO^{2-} se haya acumulado en el sistema y en lugar de reducirse a NH_3 se haya desviado a la vía de denitrificación, convirtiendo NO^{2-} a N_2O , principal fuente de N_2O en condiciones anaeróbicas⁽³²⁾. Con una inclusión de 2 y 2.5 % de NO^{3-} en el total de la MS incubada por 24 h, Welty *et al*⁽³³⁾, observaron que el NO^{3-} tuvo un efecto mínimo sobre la concentración de NH_3 , el cual solo registró un incremento significativo una hora después de iniciar el ensayo *in vitro*, y el resto del tiempo los valores descendieron y permanecieron bajos durante la incubación.

Los resultados de este ensayo *in vitro* muestran que la inclusión de nitratos protegidos en niveles correspondientes al 3 % de la materia seca incubada pueden llegar a reducir en un 53 % la producción de metano después de 48 h de incubación *in vitro*. El uso de jabones con aceite de soya como método de protección del nitrato debe ser considerado con más detalle, una vez que la disociación del jabón en pH cercanos a 6.5, favorece la liberación de ácidos grasos insaturados, pudiendo alterar la dinámica de fermentación y degradación del alimento en el rumen.

Agradecimientos

Al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación – Minciencias de la República de Colombia por la financiación de este trabajo a través del proyecto 66737 (convocatoria 836-2019).

Literatura citada:

1. IPCC. Climate Change 2013: The physical science basis. Inter-governmental Panel on Climate Change, Working Group I Contribution to the IPCC Fifth Assessment Report. Cambridge Univ Press, New York, USA. 2013. https://www.ipcc.ch/pdf/assessmentreport/ar5/wg1/WG1AR5_ALL_FINAL.pdf.

2. FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Soluciones ganaderas para el cambio climático. 2018. <https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/4c38936f-8175-4752-bb66-32710168079e/content>.
3. Lee C, Beauchemin KA. A review of feeding supplementary nitrate to ruminant animals: nitrate toxicity, methane emissions, and production performance. *Can J Anim Sci* 2014;94(4):557-570.
4. Hino T, Asanuma N. Suppression of ruminal methanogenesis by decreasing the substrates available to methanogenic bacteria. *CAB Reviews. Perspect Agric Vet Sci Nutr Nat Resour* 2003;73:1R-8R.
5. Ungerfeld EM, Kohn RA. The role of thermodynamics in the control of ruminal fermentation. *Ruminant Physiol* 2006;55-85.
6. Bruning-Fann CS, Kaneene JB. The effects of nitrate, nitrite, and N-nitroso compounds on animal health. *Vet Hum Toxicol* 1993;35(3):237-253.
7. Lee C, Araujo RC, Koenig KM, Beauchemin KA. Effects of encapsulated nitrate on enteric methane production and nitrogen and energy utilization in beef heifers. *J Anim Sci* 2015;93(5):2391-2404.
8. Lee C, Araujo R, Koenig KM, Beauchemin KA. *In situ* and *in vitro* evaluations of a slow-release form of nitrate for ruminants: Nitrate release rate, rumen nitrate metabolism and the production of methane, hydrogen, and nitrous oxide. *Anim Feed Sci Technol* 2017;231:97-106.
9. Mamvura CI, Cho S, Mbiriri DT, Lee HG, Choi NJ. Effect of encapsulating nitrate in sesame gum on *in vitro* rumen fermentation parameters. *J Anim Sci* 2014;27(11):1577-1583.
10. AOAC. Official Methods of Analysis. 18th ed. Washington, DC, USA: Association of Official Analytical Chemists. 2005.
11. Castillo C, Hernández J. Ruminal fistulation and cannulation: A necessary procedure for the advancement of biotechnological research in ruminants. *J Anim* 2021;11(7):1870.
12. McDougall EI. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochem J* 1948;43(1):99-109.
13. Posada SL, Rosero-Noguera R, Bolívar D. Relación entre presión y volumen para la implementación de la técnica *in vitro* de producción de gases en Medellín, Colombia. *Rev Colomb Cienc Pecu* 2006;19(4):407-414.

14. Posada SL, Ramírez-Agudelo JF, Rosero-Noguera R. Producción de metano y digestibilidad de mezclas kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) - papa (*Solanum tuberosum*). Rev Agron Mesoam 2014;25(1):141-150.
15. SAS Inst. Inc. 2019. http://www.sas.com/en_us/software/university-edition.html.
16. Sukhija PS, Palmquist DL. Dissociation of calcium soaps of long-chain fatty acids in rumen fluid. J Dairy Sci 1990;73(7):1784–1787.
17. Jenkins TC, Palmquist DL. Effect of added fat and calcium on *in vitro* formation of insoluble fatty acid soaps and cell wall digestibility. J Anim Sci 1982;55(4):957–963.
18. Natel AS, Abdalla AL, de Araujo RC, McManus C, Paim T, de Abdalla FAL, *et al.* Encapsulated nitrate replacing soybean meal changes *in vitro* ruminal fermentation and methane production in diets differing in concentrate to forage ratio. J Anim Sci 2019;90(10):1350–1361.
19. Zhao L, Meng Q, Li Y, Wu H, Huo Y, Zhang X, Zhou Z. Nitrate decreases ruminal methane production with slight changes to ruminal methanogen composition of nitrate-adapted steers. BMC Microbiol 2018;18:21.
20. Zhou Z, Yu Z, Meng Q. Effects of nitrate on methane production, fermentation, and microbial populations in *in vitro* ruminal cultures. Bioresour Technol 2012;103(1):173–179.
21. Hulshof RB, Berndt A, Gerrits WJ, Dijkstra J, van Zijderveld SM, Newbold JR, Perdok HB. Dietary nitrate supplementation reduces methane emission in beef cattle fed sugarcane-based diets. J Anim Sci 2012;90(7):2317–2323.
22. Leng R. Interactions between microbial consortia in biofilms: A paradigm shift in rumen microbial ecology and enteric methane mitigation. Anim Pros Sci 2014;54:519-543.
23. Zhou Z, Meng Q, Yu Z. Effects of methanogenic inhibitors on methane production and abundances of methanogens and cellulolytic bacteria in *in vitro* ruminal cultures. Appl Environ Microbiol 2011;77(8): 2634–2639.
24. Lin M, Schaefer DM, Zhao GQ, Meng QX. Effects of nitrate adaptation by rumen inocula donors and substrate fiber proportion on *in vitro* nitrate disappearance, methanogenesis, and rumen fermentation acid. J Anim 2013;7(7):1099–1105.
25. Patra A, Yu Z. Effects of adaptation of *in vitro* rumen culture to garlic oil, nitrate, and saponin and their combinations on methanogenesis, fermentation, and abundances and diversity of microbial populations. Front Microbiol 2015;6:1434.

26. Wang M, Wang R, Yang S, Deng JP, Tang SX, Tan ZL. Effects of three methane mitigation agents on parameters of kinetics of total and hydrogen gas production, ruminal fermentation and hydrogen balance using *in vitro* technique. *J Anim Sci* 2016;87(2):224-232.
27. Machmuller A. Medium-chain fatty acids and their potential to reduce methanogenesis in domestic ruminants. *Agric Ecosyst Environ* 2006;112(2):107-114.
28. Zumft WG. The biological role of nitric oxide in bacteria. *Arch Microbiol* 1993;160(4):253-264.
29. van Zijderveld SM, Gerrits WJ, Apajalahti JA, Newbold JR, Dijkstra J, Leng RA, Perdok, HB. Nitrate and sulfate: Effective alternative hydrogen sinks for mitigation of ruminal methane production in sheep. *J Dairy Sci* 2010;93(12):5856-5866.
30. Lund P, Dahl R, Yang H, Hellwing A, Cao B, Weisbjerg M. The acute effect of addition of nitrate on *in vitro* and *in vivo* methane emission in dairy cows. *Anim Prod Sci* 2014;54(9):1432-1435.
31. Leng R, Emeritus D. The potential of feeding nitrate to reduce enteric methane production in ruminants. A report to the department of climate change, Canberra, Australia. 2008.
32. Kaspar HF, Tiedje JM. Dissimilatory reduction of nitrate and nitrite in the bovine rumen: nitrous oxide production and effect of acetylene. *Appl Environ Microbiol* 1981;41(3):705-709.
33. Welty CM, Wenner BA, Wagner BK, Roman-Garcia Y, Plank JE, Meller RA, *et al.* Rumen microbial responses to supplemental nitrate. II. Potential interactions with live yeast culture on the prokaryotic community and methanogenesis in continuous culture. *J Dairy Sci* 2019;102(3):2217-2231.