

Capacidad digestiva del contenido ruminal de la oveja (*Ovis aries*) y llama (*Lama glama*)
alimentados con forrajes de baja calidad

*Tesis presentada para optar al título de Magister de la Universidad de Buenos Aires, Área
Producción Animal*

Abimael Ortiz Chura

Médico Veterinario y Zootecnista – Universidad Nacional del Altiplano Puno – 2012

Lugar de trabajo: Catedra de Nutrición Animal. Facultad de Agronomía. Universidad de
Buenos Aires



Escuela de graduados Ing. Alberto Soriano

Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires

Comité consejero**Director de tesis**

Gustavo Jaurena
Ingeniero Agronomo (UBA)
PhD (Wales University)

Co-director (a)

María E. Cerón Cucchi
Médico Veterinario (UNMSM)
Doctor en Farmacia y Bioquímica (UBA)

Consejero de estudios

Marisa Wawrzekiewicz
Ingeniero Agronomo (UBA)
Doctor en Ciencias Agropecuarias (UBA)

Jurado de tesis**JURADO**

Hugo Mario Arelovich
Ingeniero Agrónomo (Universidad Nacional del Sur)
PhD (Oklahoma State University)

JURADO

Ana María Smacchia
Médico Veterinario (Universidad Nacional de Rosario)
Doctor en Ciencias Biomédicas (Universidad Nacional de Rosario)

JURADO

Jorge Avila Stagno
Médico Veterinario (Universidad de Concepción)
PhD (The University of Sydney)

Fecha de defensa de la tesis: 18 de junio de 2018

Agradecimientos

A la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la UBA, gracias por abrirme las puertas y permitir mi crecimiento profesional.

A los docentes de la Maestría en Producción Animal FAUBA, por compartir sus conocimientos.

A mi familia por el enorme apoyo que siempre me han brindado, y además por ser parte del soporte emocional que necesito todo el tiempo, y que por lo tanto pudieron llevar a buen término esta tesis y otros logros.

Asimismo, quiero agradecer a Gustavo Jaurena, María E. Cerón Cucchi, Marisa Wawrzkievicz y a Silvio Cravero, gracias por su sabiduría y orientación.

También quiero agradecer a mis amigos y compañeros de la cátedra de Nutrición y Alimentación Animal: Gabriela, Juan Manuel, Florencia, Rocio, Jesica, Hector, Ignacio, Guillermo, Susana, y a Dorita y Estela del INTA-Castelar, gracias por su inmenso apoyo.

A mis compañeros de maestría Edwaldo y Alfonso, por su compañía en la ejecución de esta tesis. A Daniel Lopez por su grato apoyo.

Igualmente agradezco al programa nacional de becas - Perú (PRONABEC) por el financiamiento de la beca de maestría y el desarrollo de esta tesis. Así también se agradece a la FAUBA por el financiamiento parcial de la tesis (UBACyT 2014/17 N°735 BA, CISNA).

Finalmente, a todas y cada una de las personas con quienes compartí y me enseñaron muchas cosas valiosas a nivel personal y profesional.

Declaración

Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en esta u otra institución.

INDICE GENERAL

Comité consejero.....	ii
Agradecimientos	iii
Declaración	iv
Abreviaturas	ix
Resumen.....	xii
Abstract	xiii
Capítulo 1. Introducción.....	1
I. Introducción.	1
Capítulo 2. Revisión bibliográfica	4
2.1. Los camélidos sudamericanos	4
2.1.1. Biología general.....	4
2.1.2. Los camélidos en Sudamérica.....	4
2.2. Anatomía y fisiología digestiva de los camélidos en comparación con las ovejas	5
2.2.1. El estómago de los camélidos	6
2.2.2. La motilidad del estómago.....	7
2.2.3. Tiempo de retención de alimentos en el tracto digestivo.....	8
2.2.4. Fermentación y producción de ácidos grasos volátiles.....	8
2.3. Aspectos generales de la nutrición y alimentación en los camélidos en comparación con las ovejas.....	9
2.3.1. El consumo de materia seca.....	9
2.3.2. Digestibilidad.....	10
2.4. La microbiota ruminal	11
Capítulo 3. Materiales y Métodos	13
3.1. Lugar, planteo experimental y muestreo del contenido ruminal	13
3.2. Evaluación del consumo y análisis químico de los forrajes	14
3.3. Caracterización de los parámetros bioquímicos y las poblaciones microbianas	15
3.3.1. Determinación de los ácidos grasos volátiles (AGV), nitrógeno amoniacal (N-NH ₃) y pH	15
3.3.2. Cuantificación de las poblaciones bacterianas y metanógenos mediante PCRq en tiempo real	15

3.3.3 Cuantificación de poblaciones de protozoos ciliados del rumen	17
3.4. Incubación de los inóculos y sustratos <i>in vitro</i>	18
3.4.1. Digestibilidad, producción de gas y motilidad de protozoos.....	18
3.4.2. Determinación de la producción de metano (CH ₄).....	19
3.5. Análisis estadístico	19
Capítulo 4. Resultados	21
4.1. Consumo, caracterización de los parámetros bioquímicos y las poblaciones microbianas ruminales.....	21
4.2. Incubación de los inóculos y sustratos <i>in vitro</i>	24
4.2.1. Digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia seca, materia orgánica, y de la fibra.....	24
4.2.2. Parámetros de producción de gas, metano y motilidad de protozoos <i>in vitro</i>	25
4.2.3. Parámetros bioquímicos de la fermentación <i>in vitro</i>	29
Capítulo 5. Discusión	31
5.1. Caracterización de los parámetros bioquímicos y las poblaciones microbianas ruminales	31
5.2. Incubación de los inóculos y sustratos <i>in vitro</i>	34
5.2.1. La digestibilidad, parámetros de producción de gas, metano y la motilidad de protozoos <i>in vitro</i>	34
5.2.2. Parámetros bioquímicos de la fermentación	35
5.4. General	36
Capítulo 6. Conclusiones	37
Bibliografía	38
Anexo	48

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Secuencia de primers para la PCRq en tiempo real.....	16
Cuadro 2. Composición química del heno de festuca y paspalum (g/kg MS, excepto la MS g/kg material original).....	22
Cuadro 3. Parámetros bioquímicos de la fermentación del rumen de ovejas y llamas alimentadas con heno de festuca.....	23
Cuadro 4. Densidad de bacterias y protozoos ciliados del rumen de ovejas y llamas alimentadas con heno de festuca (valores expresados en Log ₁₀ para el número de copias)	24
Cuadro 5. Digestibilidad de la materia seca (DMS), de la materia orgánica (DMO) y de la FDN (DFDN) (g/kg MS) a 24 y 48 horas de incubación del heno de festuca y paspalum con el inóculo ruminal de ovejas y llamas.	25
Cuadro 6. Parámetros de producción de gas y producción de metano <i>in vitro</i> del heno de festuca y paspalum incubados con licor ruminal de ovejas y llamas.....	26
Cuadro 7. Motilidad de protozoos ruminales <i>in vitro</i> de ovejas y llamas incubadas con heno de festuca y paspalum durante 0, 24 y 48 h.	28
Cuadro 8. Motilidad de protozoos del LR de ovejas y llamas a 0, 24 y 48 h. de incubación.	28
Cuadro 9. Parámetros bioquímicos de la fermentación de licor ruminal de ovejas y llamas incubadas con heno de festuca y paspalum.....	30
Cuadro 10. Medio de incubación modificado.	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de los compartimentos digestivos de los Camélidos Sudamericanos.	7
Figura 2. Compartimento 1 de la llama, vista izquierda (corte).....	7
Figura 3. Preestómagos de la llama, vista izquierda.	7
Figura 4. Preestómagos y estómagos de la llama, vista derecha.....	7
Figura 5. Dinámica de consumo de materia seca (g/kg PV ^{0.75}) durante el periodo de experimentación en llamas y ovejas alimentadas con heno de <i>Festuca arundinacea</i>	21
Figura 6. Cinética de producción de gas <i>in vitro</i> del LR de ovejas y llamas alimentadas con heno de festuca,.....	27
Figura 7. Cinética de producción de gas <i>in vitro</i> del heno de festuca y paspalum,	27
Figura 8. Corte histológico (transversal) de la lámina de festuca a tiempo "0"	48
Figura 9. Corte transversal de la lámina de festuca a 12 horas digestión en el C-1 de las llamas (40×).....	49
Figura 10. Corte transversal de la lámina de festuca a 12 horas digestión en el rumen de las ovejas (40×).....	49
Figura 11. Corte transversal de la lámina de festuca a 24 horas digestión en el C-1 de las llamas (40×).	49
Figura 12. Corte transversal de la lámina de festuca a 24 horas digestión en el rumen de las ovejas (40×).....	49
Figura 13. Corte transversal de la lámina de festuca a 48 horas digestión en el C-1 de las llamas (40×).	50
Figura 14. Corte transversal de la lámina de festuca a 48 horas digestión en el C-1 de las llamas (40×).	50
Figura 15. Protozoos entodiniomorfos y holotricos del rumen de la oveja.	52

Abreviaturas

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AGV: Ácidos grasos volátiles

AGVtotal: Ácidos grasos volátiles totales

AOAC: Association official analytical chemists

A/P: Relación acetato propionato

c.a.: Cantidad aproximada

CEyBA: Comité de ética y bienestar animal

CH₄: Metano

C-1: Compartimento 1

C-2: Compartimento 2

C-3: Compartimento 3

Cm: Centímetro

CMS: Consumo voluntario de materia seca

CO₂: Dióxido de carbono

CR: Contenido ruminal

CSA: Camélidos sudamericanos

dL: Decilitro

e.g.: Por ejemplo, del latín “*Exempli gratia*”

EEM: Error estándar de la media

FAUBA: Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires

^aFDN_{mo}: Fibra detergente neutro con amilasa y libre de cenizas

FDA_{mo}: Fibra detergente ácido libre de cenizas

°C: Grados centígrados

g: Gramo

GEI: Gases de efecto invernadero

GLM: General lineal model (modelo general lineal)

h: Hora

INEI: Instituto Nacional de Estadística e Informática

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

Kg: Kilogramo

L: Litros

LDA_{as}: Lignina en detergente ácido con ácido sulfúrico

LR: Líquido o licor ruminal

mEq: Miliequivalente

mg: Miligramo

mL: Mililitros

mm: Milímetros

mM: Milimolar

MS: Materia seca

MO: Materia orgánica

msnm: Metros sobre el nivel del mar

N: Normal

N-NH₃: Nitrogeno amoniacal

NRC: National research council

NLIN: No linear model (modelo no líneal)

nm: Nanometro

NT: Nitrógeno total

PGAN: Producción de gas acumulada neta

Pool: Mezcla

PB: Proteína bruta

PCR: Polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)

PCRq: Polymerase chain reaction quantitative (Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativo)

pH: Potencial de hidrogeniones

PV^{0.75}: Peso metabólico (PM)

SF₆: Hexafluoruro de azufre

SAS: Statistical Analysis System

UK: Reino Unido, del inglés “United Kingdom”

USA: Estados Unidos de America, del inglés “United State of America”

v/v: Volúmen/volúmen

vs: Versus

Resumen

El objetivo fue evaluar el impacto del tipo de contenido ruminal (CR) de ovejas y llamas sobre la capacidad de digestión *in vitro* de forrajes de baja calidad. Para ello se alimentaron a voluntad con heno de festuca dos llamas y tres ovejas (provistas de cánula ruminal permanente). Los tratamientos consistieron en comparar el CR de llama (n=3) y oveja (n=4) como fuente de inóculos para la incubación de los sustratos (*Festuca arundinacea* y *Paspalum modestum*). Se consideró 21 días de acostumbramiento al forraje, y un día para la obtención y procesamiento de muestras (durante dos periodos). Las muestras de CR fueron obtenidas antes de la alimentación diaria, y se determinó la bioquímica ruminal y las poblaciones microbianas mediante PCRq. Por otro lado, los sustratos fueron incubadas *in vitro* durante 48 h, y se determinó la digestibilidad, parámetros de bioquímicos, parámetros de producción de gas y metano. Los resultados de N-NH₃ y ácidos grasos volátiles señalan que el CR de las llamas mostró mayor grado de actividad microbiana que en ovejas ($P < 0,001$). La densidad de protozoos ciliados fue mayor para las llamas en comparación a las ovejas ($5,0$ vs $3,6 \times 10^4$ células/mL; $P = 0,010$). Sin embargo, no se evidenció diferencia en la densidad de bacterias y metanógenos totales, tampoco en las bacterias fibrolíticas. Por otro lado, la digestibilidad de MS, MO y FDN y el potencial de producción de gas fueron mayores para el CR de las ovejas ($P < 0,001$). Se concluye que el CR de las llamas presentó mayor grado de actividad microbiana que las ovejas cuando fueron alimentadas con forrajes de baja calidad. No obstante, el licor ruminal de la oveja presentó mayor capacidad digestiva por presentar valores superiores de digestibilidad y producción de gas respecto de la llama.

Palabras clave: Camélidos; Festuca alta; Metano; PCRq, Producción de gas.

Abstract

The objective of this study was to evaluate the impact of the type of ruminal content (CR) obtained from sheep and llamas upon the potential of *in vitro* digestion for low quality forages. To attain this objective, two llamas and three sheep (fitted with a permanent ruminal cannulae) were fed with fescue hay. The treatments were based in comparing the CR of llama (n=3) and sheep (n=4) as an inoculum source for substrate incubation (*Festuca arundinacea* and *Paspalum modestum*). The adaptation period to the diets was 21 days, and one day for sample collection and processing (in two periods). Initial CR samples were obtained before daily feeding, ruminal biochemistry parameters were determined, as well as microbial populations by qPCR. Additionally, the substrates were incubated *in vitro* for 48 h, and digestibility, ruminal biochemistry, kinetics of total gas production and methane were determined. The results of NH₃-N and volatile fatty acids have shown that the CR of the llamas had indicators of a greater microbial activity than that of sheep ($P < 0.001$). The density of ciliate protozoa was higher for llamas than sheep (5.0 vs 3.6×10^4 cell/mL, $P = 0.010$). However, there was neither a difference in the density of bacteria and total methanogens nor in populations of fibrolytic bacteria. On the other hand, the digestibility of DM, OM, NDF and gas production potential were highest for CR of sheep ($P < 0.001$). It is concluded that the CR of the llamas presented a much greater microbial activity than the sheep when both species are fed with low quality hays. However, the ruminal liquor of the sheep had a greater digestive capacity due to its higher digestibility and gas production than the llama.

Keywords: Camelids, Tall fescue; Methane; qPCR; Gas production.

Capítulo 1. Introducción

I. Introducción.

La producción de Camélidos domésticos (alpaca y llama), es una de las actividades de mayor importancia e impacto en el desarrollo socio-económico de la población alto-andina, no solo por su capacidad de adaptación a las difíciles condiciones ambientales (sobre los 3,000 msnm), sino por su utilización como fuente de proteína animal, medio de transporte, y en el caso de la alpaca como un recurso para la producción de fibra de buena calidad (Sumar, 1988).

En la actualidad la población total de Camélidos Sudamericanos (CSA) (vicuña, guanaco, alpaca y llama) en los países andinos se encuentra alrededor de 6,9 millones, destacándose: Perú con 52%, Bolivia 34%, Argentina 11% y otros 3% (Raggi, 2000). Asimismo, la población de alpacas en el Perú en los últimos años ha logrado un crecimiento considerable de 2,5 a 3,7 millones, superando en 50% a lo reportado en 1994 (INEI 2013).

Los CSA difieren de los ovinos en la estructura y funcionamiento de su sistema digestivo, y en sus estrategias nutricionales (Vallenas *et al.*, 1971; Engelhardt *et al.*, 1988; San Martín y Bryant, 1989; Jouany *et al.*, 1995). Estudios comparativos han demostrado que los CSA digieren de manera más eficiente los forrajes fibrosos en relación con los ovinos. Esta mayor eficiencia ha sido atribuida al mayor tiempo de retención de la ingesta, mayor número de contracciones de los pre-estómagos y a una mayor habilidad de amortiguar el pH pre-gástrico (producto de la mayor secreción de bicarbonato, asociado a la presencia de sáculos glandulares en la pared de los compartimentos 1 y 2) (Eckerlin y Stevens, 1973; San Martín y Bryant, 1989; Dulphy *et al.*, 1997; Raggi y Ferrando, 1998).

Por otro lado, en las últimas décadas ha surgido la preocupación por la acumulación de gases de efecto invernadero lo que lleva a un aumento de las temperaturas medias globales y origina cambios en agroecosistemas de montaña (Forster *et al.*, 2007). El metano entérico se libera hacia el ambiente (Murray *et al.*, 1976) y dado que resulta en una pérdida de energía para el animal (Johnson y Johnson, 1995), la reducción de las emisiones de metano no sólo sería beneficioso por la mitigación del impacto ambiental, sino también por la mejora de la productividad ganadera.

Pinares-Patiño *et al.* (2003) realizaron los primeros ensayos comparativos entre alpacas y ovejas analizando la producción de metano y otras variables (*e.g.* digestibilidad de la materia seca, producción de ácidos grasos volátiles, población de protozoos) y observaron que la alpaca produce menos metano, pero no difirieron estadísticamente. Sin embargo, Dittman *et al.* (2014b) reportaron que los CSA producen menos metano que los rumiantes menores (cabra y oveja) cuando fue expresada en litros de CH₄/animal/día, pero cuando la producción de metano fue expresada en base a FDN digerido las diferencias desaparecieron. No obstante, es importante tener presente que los camélidos suelen presentar menor consumo de alimento y poseen una menor tasa metabólica basal y por consiguiente esto explicaría la menor emisión de metano en comparación a otros rumiantes (Dittman *et al.*, 2014a).

En otro estudio, Liu *et al.* (2009) observaron diferencias entre las características bioquímicas (pH, N-NH₃) y físicas (potencial redox, osmolaridad, presión y tensión superficial) del CR en los pre-estómagos de la alpaca y el rumen de la oveja, bajo las mismas condiciones de alimentación. Por otra parte, se determinó que las poblaciones de microorganismos del rumen ovejas y alpacas son distintas, debido a que en alpacas se halló una menor población de metanógenos, mayor población de hongos y bacterias celulolíticas que en ovinos (Pei *et al.*, 2013).

En adición, Hinderer y Engelhardt, (1975) determinaron que podría existir características propias del metabolismo animal, tales como una menor tasa de excreción de urea a través de orina (probablemente debido a un mayor reciclaje de nitrógeno), teniendo como resultado mayor N-NH₃ disponible en los pre-estómagos para la actividad metabólica y la síntesis proteica por los microorganismos.

Existen prometedores resultados en favor de la capacidad de los CSA para aprovechar recursos forrajeros de baja calidad. Sin embargo, es escasa la información disponible acerca de los mecanismos ruminales que sustentan estas diferencias en condiciones de bajo contenido de proteína y alto en fibra en la dieta. Este estudio buscó dar respuesta a las siguientes interrogantes: ¿Qué características bioquímicas y microbiológicas del contenido ruminal son distintas entre ovejas y llamas? ¿Qué impacto presenta el tipo de licor ruminal de oveja y llamas sobre la digestibilidad, producción de gas y metano *in vitro* de forrajes de baja calidad?

El presente trabajo pretende profundizar el conocimiento de los mecanismos ruminales involucrados en la aparente superioridad digestiva de las llamas respecto de las ovejas, contribuyendo en un mejor entendimiento de los mecanismos fisiológicos digestivos de las llamas, debido a que se presenta como una alternativa productiva potencial por su adaptación y mayor eficiencia en la utilización de forrajes de baja calidad.

La hipótesis de este estudio consistió en demostrar que cuando ovejas y llamas son expuestas a dietas de baja calidad, las llamas mantienen un ambiente pre-estomacal más enriquecido (por presentar una mayor concentración de $N-NH_3$) respecto de las ovejas, que favorecería una mayor población e intensidad de la actividad microbiana, conduciendo a una mayor capacidad de digestión ruminal *in vitro* de forrajes de baja calidad en las llamas. El objetivo del trabajo fue evaluar el impacto de la fuente de contenido ruminal (ovejas y llamas) sobre los parámetros bioquímicos ruminales, poblaciones microbianas, digestibilidad, producción de gas y metano *in vitro* de forrajes de baja calidad.

Capítulo 2. Revisión bibliográfica

2.1. Los camélidos sudamericanos

2.1.1. Biología general

La alpaca (*Vicugna pacos*), llama (*Lama glama*), guanaco (*Lama guanicoe*) y la vicuña (*Vicugna vicugna*) conforman el grupo de los CSA. Los CSA pertenecen a la familia Camelidae del orden Artiodactyla (Ungulados), y se diferencian de los rumiantes dentro del suborden Tylopoda (pezuña partida) porque difieren en la morfología de los estómagos (tres compartimentos), ausencia de cuernos, y el reemplazo de pezuñas con almohadillas callosas que terminan en garras (Novoa y Wheeler, 1984).

Los camélidos poseen tres complejos compartimentos gástricos, y consecuentemente la digestión es similar, pero no análoga con la digestión de los rumiantes. Por otro lado, los camélidos regurgitan y remastican el forraje ingerido, al igual que los rumiantes. Esto es importante para remarcar que los camélidos no son rumiantes, sino pseudorumiantes o rumiantes modificados (Fowler, 2008).

2.1.2. Los camélidos en Sudamérica

La importancia económica, social y cultural de los CSA para los habitantes alto-andinos está bien documentada. Es así que el sustento económico de los productores de CSA depende de la lana y la carne, derivadas de la producción de alpacas y llamas, y se estima que alrededor de 1.5 millones de pequeños productores de los andes centrales de sudamerica dependen de la crianza de CSA (De los Rios 2006, citado por Quispe *et al.*, 2009).

Los camélidos domesticos se localizan principalmente en las zonas alto-andinas (>3 000 msnm) y se distribuyen principalmente en las fronteras de Perú, Bolivia, Chile y Argentina, y en ciertas regiones de Ecuador y Colombia. En cambio, las vicuñas y guanacos se distribuyen principalmente en Argentina y Chile, y en menor medida en Perú y Bolivia (Hoffman, 2006).

Las condiciones climáticas alto-andinas se caracterizan por temperaturas bajas y con intensa radiación solar. De igual manera, la precipitación en el sur de Perú es errática y limitada,

aproximadamente el 75% de las precipitaciones anuales se presentan entre los meses de diciembre - marzo. La temporada de lluvias en la zona alto-andina contribuye a mejorar la producción de biomasa y el contenido de nutrientes en los pastizales naturales. Sin embargo, durante la estación seca (mayo - octubre), cuando los animales a menudo se encuentran en etapas de destete, gestación avanzada, y a términos de la lactancia, la mala nutrición contribuye a aumentar la mortalidad de las crías. Asimismo, la actividad física en grandes altitudes provoca un gasto adicional de energía para la búsqueda de alimentos, debido a la escasez y la naturaleza accidentada de los Andes (Raggi *et al.*, 1994).

En esta altitud, menos del 5% de la tierra es apta para la agricultura (Gilles, 1980); la parte restante es pastoril y se utiliza principalmente para la crianza extensiva de CSA. Los pastizales en este ecosistema están dominados por especies de los géneros *Estipa*, *Festuca* y *Calamagrostis*.

2.2. Anatomía y fisiología digestiva de los camélidos en comparación con las ovejas

El labio superior de los camélidos es altamente táctil, y útil para la selección del forraje (Fowler, 1998b). Los dientes incisivos de la alpaca están firmemente unidos a la mandíbula inferior. Durante el pastoreo, los dientes presionan hacia la almohadilla dental en el maxilar superior (Fowler, 1998a), además la alpaca es capaz de pastar plantas muy cortas.

Las alpacas no utilizan su lengua para la prehensión del forraje en el pastoreo. Es más, rara vez exponen la lengua fuera de la boca, ya que no se lamen a sí mismos, ni a sus crías ni los bloques de sal (Smuts y Bezuidenhout, 1987).

Los diferentes tipos de forraje requieren diferentes tiempos para la rumia, pero en general las alpacas dedican un tercio del tiempo del día a la rumia, ya que no son tan activos en la oscuridad (Fowler, 1998a). Las alpacas realizan movimientos mandibulares entre 25-35 veces en 15 segundos durante la rumia, y el patrón de masticación durante la rumia es en forma horizontal en arco (formando una figura en ocho), en comparación con el patrón elíptico unilateral de bovinos y ciervos (Koford, 1957).

La localización, la cantidad y la histología de las glándulas salivales de los camélidos son similares a la de los bovinos, ovinos y caprinos (Fowler, 1998b). En un estudio de la glándula parotida el flujo salival antes de la alimentación diaria en la alpaca fue de 140 mL/hora, el

pH 8.6, y la composición fue la siguiente: $\text{HCO}_3^{(-)}$ 121 mEq/L, HPO_4 33.5 mEq/L, Na 146.8 mEq/l, y K 13.7 mEq/L. Durante la alimentación el flujo fue 202 mL/h, pH 8.58, la composición de $\text{HCO}_3^{(-)}$ fue 127.8 mEq/L (McDowell *et al.*, 1974).

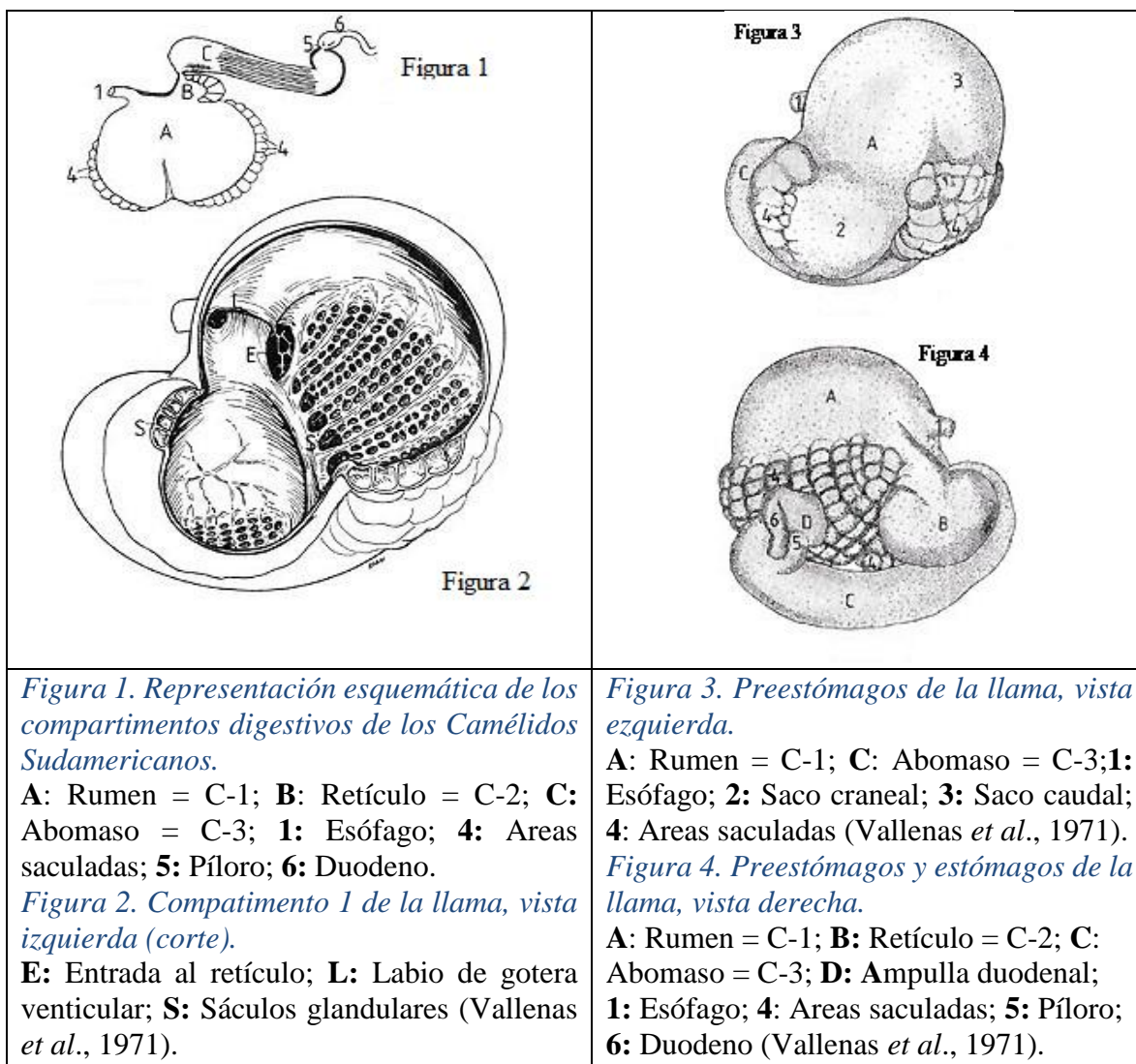
2.2.1. El estómago de los camélidos

Las estrategias digestivas entre los camélidos y rumiantes son similares. Ambos utilizan forrajes fibrosos que requieren una cámara de fermentación para convertir los nutrientes de los forrajes en moléculas que pueden ser absorbidas por el animal. Sin embargo, la morfología del estómago de los CSA es diferente a la de los rumiantes. Los CSA contienen sólo tres compartimentos (C-1, C-2 y C-3), de los cuales los dos primeros son pre-gastricos y el tercero es el gástrico (Ver figuras 1, 2 y 3), en comparación con los cuatro compartimentos del rumiante (Smith *et al.*, 1994). El C-1 ocupa gran parte de la región izquierda del abdomen (Fowler, 1998b) y constituye aproximadamente el 83% del volumen total del tracto gastrointestinal (TGI) (Vallenas *et al.*, 1971).

La superficie ventral de C-1 posee pliegues y está cubierta por un epitelio glandular mucinoso de los sáculos glandulares (Ver figura 2) (Fowler, 1998b). Las regiones no glandulares del C-1 están cubiertas por un epitelio estratificado escamoso que no contiene papilas (Eckerlin y Stevens, 1973).

El segundo compartimento (C-2) se ubica en la superficie cráneo-dorsal derecha de C-1 (Fowler, 1998b). Este compartimento constituye el 6% del volumen total del TGI. La ingesta en el C-2 está en forma líquida, excepto de la curvatura menor, que está cubierta de una mucosa glandular con papilas. Entre el paso del C-2 y el C-3, hay un pasaje tubular estrecho de 1-2 cm de diámetro (Heller *et al.*, 1986).

El diámetro de C-3 es cinco veces mayor que el diámetro del pasaje tubular estrecho. Este último compartimento conforma el 11% del volumen total TGI (Vallenas *et al.*, 1971). Las 4/5 partes proximales del C-3 es similar a C-1 y C-2, pero sin sáculos (Eckerlin y Stevens, 1973). El último 1/5 contiene glándulas gástricas y pilóricas (Cummings *et al.* 1972; Eckerlin y Stevens, 1973).



2.2.2. La motilidad del estómago

Las contracciones del estómago de la llama y guanaco fueron estudiadas por Vallenas *et al.* (1971). El estómago se contrae 3-4 veces por minuto en un animal en reposo, y entre 4-5 veces por minuto inmediatamente después de la alimentación (Fowler, 1998b). Los eructos se producen 3-4 veces durante cada ciclo (Van Saun, 2006). La dirección de las contracciones del C-1 son caudo-craneales, situación opuesta a la de los rumiantes (cráneo-caudal) (Fowler, 1998a).

Los contenidos del saco dorsal y caudal tienen un bajo contenido de humedad y son homogéneos. Por otra parte, las partículas de alimentos más pequeñas y fluidas se encuentran

en el saco cráneo-ventral. El patrón de la motilidad tiende a volcar la ingesta de ida y vuelta entre los sacos craneal y caudal. Este es un mecanismo altamente eficaz para mezclar la ingesta y mejorar el proceso de fermentación (Van Saun, 2006).

2.2.3. Tiempo de retención de alimentos en el tracto digestivo

El tiempo de retención es la cantidad de horas que permanece el alimento en el tracto digestivo (pre-estómagos, estómago e intestinos). Las alpacas presentan un mayor tiempo de retención de partículas sólidas de la digesta en comparación a las ovejas (50,3 vs 43,2 h., respectivamente; Florez, 1973), resultados coincidentes en llamas (Clemens y Stevens, 1980; San Martín, 1987). Por otro lado, la tasa de pasaje de la fase líquida es mayor en llamas (10,4%/h) que en ovejas (7,7%/h) (San Martín, 1987), además estos resultados coinciden con los publicados por Clemens y Stevens (1980), y Heller *et al.* (1986).

La tasa de pasaje más rápida de la fase líquida en llamas podría ser debida a la mayor proporción de flujo salival a los pre-estómagos (Owens y Isaacson, 1977). Harrison *et al.* (1975) reportaron una mejor síntesis de proteína microbiana (hasta un 25%) como resultado del aumento de la tasa de dilución líquida, luego de la aplicación de saliva artificial. Por otro lado, la retención relativamente corta de la fase líquida ruminal en llamas, podría indicar una mejora en el crecimiento microbiano en el C-1 y C-2, asegurando una mínima cantidad de energía para mantener poblaciones microbianas envejecidas y poco activas (Ørskov, 1982).

2.2.4. Fermentación y producción de ácidos grasos volátiles

Los CSA tienen una mayor concentración de ácidos grasos volátiles (AGV) en los pre-estómagos con respecto a los rumiantes (San Martín, 1991). El pH cercano a la neutralidad en el C-1, neutraliza los AGV, que luego se mantienen en forma de iones y se absorben más lentamente (López *et al.*, 1998). Los sáculos del C-1 y C-2 también contribuyen en tamponar el pH del estómago durante la alimentación (Eckerlin y Stevens, 1973).

La concentración de AGV en los pre-estómagos de las alpacas aumenta durante la alimentación, con un pico de concentración a los 30 minutos después de la alimentación (Vallenas y Stevens, 1970). El sistema de absorción más efectivo en el estómago de los camélidos es probablemente la razón de la caída del pH después de la alimentación (2,5 h)

es menor en estas especies que en los rumiantes (Hintz *et al.*, 1973). Luego de 5 a 6 h post-alimentación, la concentración de AGV y pH en los pre-estómagos vuelve a los niveles preprandiales.

Los camélidos son capaces de adaptarse a dietas bajas en proteína, mediante el reciclaje de urea obtenida como producto final del metabolismo del nitrógeno. La urea es utilizada por las bacterias de los pre-estómagos para formar su propia proteína. La proteína bacteriana posteriormente es digerida y absorbida a lo largo del tracto intestinal. La presencia de AGV mejora la eficiencia del reciclaje de urea; por lo tanto, es deseable que los camélidos consuman fuentes de carbohidratos cuando son sometidos a dietas con bajo contenido de proteína en la dieta (Hinderer y Engelhardt, 1975).

2.3. Aspectos generales de la nutrición y alimentación en los camélidos en comparación con las ovejas

2.3.1. El consumo de materia seca

El consumo de materia seca (CMS) varía entre 1,3 y 1,5% del peso corporal en alpacas gestantes (consumo a mantenimiento), y entre 2,0 a 2,8% del peso corporal en hembras lactantes (Van Saun, 2006). Por otro lado, Johnson (1994) en un estudio utilizando dos grupos de llamas juveniles (2 años), señalan que el CMS varía entre 1,8 y 2,0% de peso vivo. El consumo medio en alpacas es de 1,8% del peso corporal, que representa un 20% menos de la capacidad de consumo en las ovejas (San Martín y Bryant, 1989).

El CMS depende de las diferencias en la composición nutricional de los alimentos, la disponibilidad y la digestibilidad. Asimismo, se ve afectado por la cantidad de fibra detergente neutro (López *et al.*, 1998) y el contenido de proteína del forraje (San Martín y Bryant, 1989).

Los valores de CMS por kg de peso metabólico (PM), bajo condiciones de pastoreo en llamas y alpacas varía entre 38 - 67 g, y esto depende de muchos factores, entre ellos el tipo, calidad del pastizal y la estación del año (San Martín, 1987). Al igual que en los estudios en jaulas metabólicas, el consumo en pastoreo es menor en los CSA con respecto a las ovejas. En adición, San Martín (1987) informó que las llamas y alpacas tenían el mismo nivel de

consumo en pasturas mejoradas y pastos nativos. Sin embargo, los valores de CMS fueron 36 y 26% más bajos (pastos mejorados y nativos, respectivamente) con respecto a las ovejas.

Los niveles más bajos de CMS en las alpacas y llamas respecto a las ovejas probablemente resulten debido a un menor nivel de requerimiento energético de mantenimiento (Engelhardt y Schneider, 1977; Van Saun, 2006). Además, San Martín (1987) señala que el consumo en los CSA podría estar limitado por un menor volumen de los pre-estómagos respecto al rumen, y que la tasa de pasaje es más lenta que en las ovejas bajo las mismas condiciones de alimentación (San Martín, 1987).

2.3.2. Digestibilidad

El mayor tiempo de retención de la digesta en los CSA en comparación con las cabras y ovejas, es uno de los principales factores que influye sobre la mayor capacidad de digestión de forrajes de baja calidad. Sin embargo, cuando son alimentados con forrajes de mayor calidad no se hallaron ninguna diferencia entre CSA y rumiantes menores (Sponheimer *et al.*, 2003). La selectividad de los alimentos es otro factor para tomar en cuenta cuando se evalúa y compara valores de digestibilidad. San Martín *et al.* (1982) reportaron una mayor selectividad en las ovejas en comparación a las alpacas. Por otra parte, Van Soest (1982) señala que las porciones de alimento rechazado por animales fueron las fracciones más lignificadas. Además, cabe mencionar que, si la selectividad no se cuantifica, puede conducir a obtener coeficientes de digestión más altos en animales más selectivos.

Otro factor para considerar es la calidad nutricional de los alimentos utilizados. San Martín *et al.* (1985) observó mayor digestibilidad en alpacas respecto de las ovejas, cuando fueron alimentadas con dietas de 7,5% de proteína, que cuando recibían dietas por encima de 10,5% de proteína. Por otro lado, la mayor eficiencia de digestión en CSA también estaría relacionada con las contracciones más frecuentes de los pre-estómagos, el ciclo de rumia, y la relación de flujo salival y tamaño de los pre-estómagos.

En definitiva, estos atributos proporcionan mayor eficiencia en la mezcla, fermentación y absorción de la digesta, y adicionalmente la mayor capacidad de mantener concentraciones superiores N-NH₃ en los pre-estómagos proporcionaría más nitrógeno para la síntesis de

proteína microbiana, mejorando así la digestibilidad (Hinderer y Engelhardt, 1975; Engelhardt y Schneider, 1977).

2.4. La microbiota ruminal

Los CSA y rumiantes son capaces de digerir material vegetal en virtud de la extensa población de microorganismos ruminales incluyendo bacterias, hongos, protozoos y arqueas metanógenas. Asimismo, estos proporcionan nutrientes predominantemente en forma de ácidos grasos volátiles y proteínas microbianas, que representan como las principales fuentes de energía y proteína para los CSA y los rumiantes (Wanapat *et al.*, 2000).

El ecosistema ruminal está compuesto por bacterias (más de 200 especies, con una concentración media de 1×10^{10} bacterias/mL), arqueas metanogénicas, protozoos (más de 20 especies, con cifras de 1×10^6 protozoos/mL) y hongos (con densidades que alcanzan las 1×10^4 zoosporas/mL) (Joblin, 1981). Asimismo, en los últimos años, las bacterias fibrolíticas del rumen (*Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Ruminococcus albus*), han sido ampliamente estudiados y se demostró que tienen un papel importante en la digestión de la fibra (Denman y McSweeney, 2006).

La literatura indica que los CSA digieren de manera más eficiente la fibra de los forrajes, en relación con los ovinos. Esta mayor eficiencia se atribuyó a un mayor tiempo de retención de la ingesta en los C-1 y C-2, mayor capacidad de amortiguar el pH ruminal y aun mayor número de contracciones (San Martín y Bryant, 1989; Dulphy *et al.*, 1997).

Sin embargo, probablemente existan explicaciones de estas diferencias en la naturaleza de la población microbiana del C-1 y C-2, que afectaría el tipo de fermentación que se produce y los productos finales de la fermentación. Wanapat *et al.* (2000), en un estudio entre búfalos y bovinos domésticos, señala que existen diferencias significativas entre las poblaciones de microorganismos del rumen, en particular mencionan mayores poblaciones de bacterias y hongos celulolíticos, bajo las mismas condiciones de alimentación, que podría explicar la mayor eficiencia digestiva de los búfalos con relación a los bovinos. Por lo tanto, una conformación distinta de la microbiota de los pre-estómagos de camélidos respecto de los ovinos podría aportar información adicional sobre la mayor eficiencia en la digestión de forrajes fibrosos reportados en la literatura.

Por otro lado, en la actualidad los avances en las técnicas de biología molecular se han utilizado con éxito para monitorear microorganismos del rumen mediante PCRq en tiempo real (Denman y McSweeney, 2006; Wanapat y Cherdthong, 2009) y PCR- DGGE (Nicholson *et al.*, 2010, citado por Khejornsart *et al.*, 2011). Estas técnicas son más sensibles, ahorran tiempo y tiene mayor precisión, en comparación a las técnicas tradicionales. Estudios mediante el uso de PCRq en tiempo real, reportan que la densidad de bacterias totales en los pre-estómagos de alpacas fue menor con relación a la de los ovinos (Pei *et al.*, 2013). Asimismo, los porcentajes de metanógenos con relación al total de bacterias fueron menores en alpacas respecto de las ovejas (Pei *et al.*, 2013), esta situación podría explicar parcialmente la menor producción de metano de las alpacas en relación con las ovejas (Liu *et al.*, 2009).

Sin embargo, St Pierre y Wright (2012), bajo la hipótesis de que los camélidos poseen un sistema digestivo distinto, y pueden ser poblados por distintos metanógenos, construyeron una biblioteca de clones de genes (*16S* ARNr) a partir de cinco animales individuales. Estos autores observaron que los metanógenos dominantes fueron los filotipos del género *Methanobrevibacter* y la densidad de los metanógenos totales fue de $4,4 \times 10^8$ a $1,5 \times 10^9$ células/g. Estos valores fueron comparados con estudios previamente reportados en vacunos ($9,8 \times 10^8 - 1,3 \times 10^9$ células/g), pero no hallaron diferencias en las densidades. Por lo tanto, las emisiones reducidas de metano en la alpaca serian debido a las diferencias en la estructura de las comunidades de metanógenos (St-Pierre y Wright, 2012).

El principal factor que afecta la densidad microbiana en el rumen es la dieta. No obstante, la diferencia en la tasa de pasaje de la fase líquida de los pre-estómagos podría ser uno de los principales factores que influye sobre la densidad de microorganismos (Lemosquet *et al.*, 1996). Esta condición podría mejorar la síntesis de proteína microbiana (Harrison *et al.*, 1975), debido a que de esta manera se acelera el crecimiento microbiano, y por lo tanto se asegura una mínima cantidad de energía para mantener poblaciones microbianas envejecidas (Hespel y Bryant, 1979 citado por Pei *et al.*, 2013).

Capítulo 3. Materiales y Métodos

3.1. Lugar, planteo experimental y muestreo del contenido ruminal

El estudio se realizó en el galpón de metabolismo del Departamento de Producción Animal de la Facultad de Agronomía (latitud sur 34°59'13" y longitud este 58°48'55" (Modis, 2013), de la Universidad de Buenos Aires (FAUBA), Argentina. Los análisis químicos de los forrajes y las determinaciones *in vitro* fueron realizados en el Laboratorio de Nutrición Animal de la FAUBA. Los estudios microbiológicos se realizaron en el Instituto de Patobiología del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria de Castelar (INTA-Castelar). El cuidado y manejo de los animales fueron avalados por el comité de ética y bienestar animal de la Facultad de Agronomía (CEyBA - FAUBA) según el expediente 2014/2.

Con el propósito de expresar las capacidades diferenciales entre llamas (*Lama glama*) y ovejas (*Ovis aries*), se utilizaron dos llamas y tres ovejas de $76,5 \pm 0,7$ kg y $68,2 \pm 9,2$ kg de peso vivo, respectivamente (media y desvío estándar). Los animales estuvieron provistos de cánulas ruminales permanentes, y fueron alimentados a voluntad con una dieta de heno de festuca (*Festuca arundinacea*) de baja calidad ofrecido en dos raciones diarias (08:00 y 16:00 h). Los animales fueron acostumbrados a la dieta durante 21 días, seguido de un día para la colección de muestras de contenido ruminal durante dos periodos experimentales (separado por siete días).

Los tratamientos consistieron en comparar la fuente de inóculo ruminal (llama vs oveja) incubados con heno de festuca (*Festuca arundinacea*) y paspalum (*Paspalum modestum*), y las unidades experimentales consistieron en tres contenidos ruminales (CR) de llama (dos individuales + una mezcla de los contenidos individuales) y cuatro CR de oveja (tres individuales + una mezcla de los contenidos individuales).

Las muestras de CR fueron recolectadas antes de la alimentación diaria (c.a. 200 g; compuesto por 50: 50 v/v fases líquida y sólida). Las muestras de CR para la incubación *in vitro* fueron preservadas en termos previamente atemperados (39°C) conservando las condiciones de anaerobiosis para ser transportados hasta el laboratorio, una vez en el laboratorio los contenidos ruminales fueron masajeados suavemente de modo de favorecer

la liberación de los microorganismos adheridos. Posteriormente se filtraron a través de gasa de algodón (4 paños) para obtener el líquido ruminal (LR) individual, y el líquido ruminal compuesto “*pool*” de los individuos de cada especie. Por otra parte, las muestras del LR individual fueron conservadas en un freezer de -70° C para las determinaciones microbiológicas y bioquímicas.

Cabe aclarar que a partir de este momento la terminología utilizada para denominar contenido ruminal, y líquido ruminal será la siguiente:

- Contenido ruminal: Muestra ruminal compuesta por la fase sólida y líquida
- Licor o líquido ruminal: Este se obtiene a partir del filtrado de los contenidos ruminales
- Medio de cultivo ruminal: es el conjunto del líquido ruminal + medio de incubación

3.2. Evaluación del consumo y análisis químico de los forrajes

El consumo de materia seca fue determinado mediante la diferencia del forraje ofrecido y el rechazado, y fue monitoreado desde el inicio del ensayo hasta el final (durante 38 días). Sin embargo, fueron considerados los últimos 16 días de evaluación para el análisis descriptivo de los datos.

La caracterización química de los forrajes (*Festuca arundinacea* y *Paspalum modestum*), se realizó mediante los análisis de materia seca (MS) por secado en estufa (105° C) y las cenizas (CEN) por incineración a 550° C durante 4 h (AOAC, 1990, Nro. 942.05), el contenido de nitrógeno total (NT) fue determinado por el método Kjeldahl y multiplicado por 6,25 para obtener el contenido de proteína bruta (PB) (AOAC, 1990, Nro. 984.13), mientras que las fracciones de fibra detergente neutro (${}_{a}\text{FDN}_{\text{mo}}$), ácido (FDA_{mo}), y la lignina en detergente ácido (LDA_{as}), se determinaron de acuerdo a los métodos descritos por Van Soest *et al.* (1991), con el equipo ANKOM[®] 220 Fiber Analyzer (ANKOM Technology, Macedon NY-USA).

3.3. Caracterización de los parámetros bioquímicos y las poblaciones microbianas

3.3.1. Determinación de los ácidos grasos volátiles (AGV), nitrógeno amoniacal (N-NH₃) y pH

Las muestras del LR fueron evaluadas por cromatografía gaseosa con el equipo Konik 5000B con automuestreador Robokrom GC y una columna capilar Nukol de 30 m y 0,32 mm (Konik Group. Miami-USA), y los resultados fueron expresados en mM de acetato, propionato y butirato. La purificación de los AGV se realizó con ácido ortofosfórico 25% en ácido sulfúrico 0,5M a razón de 0,5 mL cada 2 mL de muestra, y luego centrifugadas por 10 minutos a $5\ 000 \times g$ (Friggens *et al.*, 1998).

El N-NH₃ fue determinado mediante el uso de la técnica de espectro-colorimetría con el kit de uremia (Lab Wiener[®] Rosario-Argentina). Las muestras fueron estabilizadas con ácido sulfúrico 0,02N (0,5 mL de la muestra + 0,5 mL de ácido sulfúrico), luego fueron centrifugadas por 10 minutos a $5\ 000 \times g$. Las lecturas fueron determinadas con el equipo UV VIS Spectrophotometer Metrolab[®] 1500 (Lab Wiener[®], USA) a 540 nm de longitud onda. Por otro lado, los valores de pH de las muestras fueron medidos con un potenciómetro (Corning Ltd, Halstead, Essex, UK).

3.3.2. Cuantificación de las poblaciones bacterianas y metanógenos mediante PCRq en tiempo real

El ADN genómico total fue extraído a partir de 0,25g de pellet ruminal (obtenido después de la centrifugación del LR de cada animal) mediante el uso del kit de extracción minikit DNA Stool QIAamp[®] (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Asimismo, el ADN fue analizado cualitativamente y cuantitativamente mediante corridas electroforéticas en geles de agarosa al 0,8% y mediante espectrofotometría a 260 nm (Nanodrop ND-1000, Thermo Fisher Scientific, USA).

La cuantificación absoluta fue realizada mediante el uso del equipo ABI 7500 qPCR y con el respaldo del software ABI 7500 v2.3 (Applied Biosystem-ABI[®], USA) y la reacción fue conducida en un volumen final de 20 μ L compuesto por: 4 μ L 5X HOT FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne, Estonia), 0,2 μ L de cada primers (50 pmol), 2 μ L de ADN genómico y 13,8 μ L de agua grado PCR. Los primers utilizados para la amplificación de la

región *16S* ARNr y *mcrA* fueron obtenidos de la bibliografía (Cuadro 1) para bacterias totales, metanógenos totales, y las principales bacterias fibrolíticas (*F. succinogenes*, *R. albus* y *R. flavefaciens*)

Cuadro 1. Secuencia de primers para la PCRq en tiempo real

Especies	Secuencia (5' – 3')	Tm, °C	Tamaño, pb	Referencias
Bacterias totales	F-CGGCAACGAGCGCGAACCC R-CCATTGTAGCACGTGTGTAGCC	60	130	Denman y McSweeney, (2006)
Metanógenos totales (<i>mcrA</i>)	F-TTCGGTGGATCDCARAGRGC R-GBARGTCGWAWCCGTAGAATCC	60	140	Denman <i>et al.</i> , (2007)
<i>F. succinogenes</i>	F-GGTATGGGATGAGCTTGC R-GCCTGCCCCTGAACTATC	60	445	Tajima <i>et al.</i> , (2001)
<i>R. flavefaciens</i>	F-TCTGGAAACGGATGGTA R-CCTTTAAGACAGGAGTTTACAA	55	295	Koike y Kobayashi, (2001)
<i>R. albus</i>	F-CCCTAAAAGCAGTCTTAGTTCCG R-CCTCCTTGCGGTTAGAACA	55	175	Koike y Kobayashi, (2001)

La amplificación involucró un ciclo de 95°C por 15 min para la activación de la enzima, seguida de 40 ciclos de 95° C por 30 seg de desnaturalización, 60° C de hibridación por 30 seg (Cuadro 1), y 72°C por 1 min de extensión (Singh *et al.*, 2014). Por otra parte, la especificidad del amplicón fue verificado de acuerdo con la curva de disociación del producto final de la PCR, mediante el incremento de la temperatura y la velocidad 1° C cada 30 seg desde los 60 a 95° C.

Se utilizaron como estándares el ADN plasmídico que contiene la secuencia génica de interés, y que, fue obtenida mediante clonación de PCR utilizando el conjunto de primers específicos de cada especie estudiada. Las bandas observadas en el gel fueron incididas y purificadas mediante el kit Illustra GFX PCR DNA y Gel Band Purification (GE Healthcare, UK), de acuerdo con las instrucciones del kit. Los productos purificados fueron ligados en un vector plasmídico (PCR[®]4-TOPOvector[®]) utilizando el kit TOPO TA Cloning

(Invitrogen, USA). Posteriormente fueron transformadas a células *Escherichia coli* competentes (TOP10 *E. coli*) según las instrucciones del kit. La extracción y purificación del ADN plasmídico fue realizada con el kit Illustra Plasmid Prep Mini Spin (GE Healthcare, UK), según las indicaciones del fabricante, y los plásmidos que contenían el inserto correcto se separaron mediante amplificación por PCR con sus respectivos primers.

El número de copias de cada estándar fue estimado según Singh *et al.* (2014) con la siguiente ecuación: $N^{\circ} \text{ copias}/\mu\text{L} = (\text{concentración del plásmido (g}/\mu\text{L}) \times 6,022 \times 10^{23}) / (\text{largo del plásmido recombinante (pb)} \times 660)$. Por otra parte, se prepararon diluciones de 10^8 a 10^1 para construir la curva estándar para cada especie, y se amplificaron junto con las muestras por duplicado. El número de copias de los genes *16S* ARNr de cada muestra fue estimada a partir de la siguiente ecuación: $N^{\circ} \text{ copias/g de rumen} = (Q \times C) / V$, donde Q: es la media cuantitativa del número de copias, C: concentración total de ADN en cada muestra (ng/g) y V: es la concentración de ADN utilizado en la reacción (ng). En cada reacción, los valores de la regresión lineal de la curva estándar estuvieron dentro de los límites normales ($R^2 = 0,99$; la pendiente = -3,2 a -3,6; eficiencia = 100-110%).

3.3.3 Cuantificación de poblaciones de protozoos ciliados del rumen

La densidad y composición genérica de protozoos ciliados del rumen se evaluó de acuerdo con la metodología descrita por Dehority (1993). Las muestras de rumen fueron mezcladas con solución salina de formalina (formalina 10% en solución NaCl 0,85%) en una proporción de 1:1 (v/v) y luego fueron coloreadas con verde de metilo y observadas al microscopio óptico Nikon model eclipse E200MV® (Leitz Wetzlar – Alemania) (Anexo, figura 15).

La concentración de protozoos fue determinada con la siguiente fórmula:

$$\text{Protozoos totales} \left(\frac{N^{\circ}}{mL} \right) = [P_{z50} \times \left(\frac{V_{celda}}{V_{50c}} \right) \times F_d]$$

Donde: P_{z50} = número de protozoos en 50 campos, V_{celda} = volumen de la celda, V_{50c} = volumen de los 50 campos de la celda, F_d = factor de dilución.

3.4. Incubación de los inóculos y sustratos *in vitro*

3.4.1. Digestibilidad, producción de gas y motilidad de protozoos

La incubación *in vitro* se realizó según lo descrito por Wawrzkievicz y Danelón (2004). Sin embargo, con el propósito de asegurar que la incubación refleje las condiciones del ambiente ruminal original de los animales, al medio de incubación no se agregó solución macro y micro mineral, ni peptona ni bicarbonato de amonio (manteniendo la solución buffer de bicarbonato de sodio, resazurina, agente reductor y agua destilada) (ver cuadro 10 del anexo).

Los sustratos (*F. arundinacea* y *P. modestum*), fueron incubados en botellas en un baño termoestable (39°C) durante 48 h, manteniendo la relación sustrato: inóculo en 0,8 g MS incubada: 20 mL medio de incubación ruminal (1:1 v/v; licor ruminal y medio incubación). La digestibilidad de la MS, MO y FDN de los sustratos fue determinada a las 24 y 48 h de incubación y consistió en recuperar los residuos no digeridos en bolsas filtrantes ANKOM® F57 (Goering y Van Soest, 1970).

La producción de gas fue estimada a partir del registro de la presión a las 4, 8, 12, 16, 24, 36 y 48 h de incubación utilizando un transductor de presión tipo 443A® (Bailey y Mackey Ltd., Birmingham, Gran Bretaña) conectado a un panel digital (Data Track®, Christchurch, Gran Bretaña). Adicionalmente, en forma simultanea se registró el volumen de producción de gas en el 30% de las botellas incubadas.

La producción de gas bruta fue corregida por la producción de gas de los blancos (botellas sin sustrato), y el patrón de la producción de gas acumulada neta (**PGAN**) fue ajustada mediante la ecuación exponencial de Ørskov y McDonald (1979):

$$p = a + b (1 - e^{-ct})$$

Dónde:

p : representa la producción de gas acumulada en el tiempo t (mL), a : es la producción de gas a $t = 0$, b : es el potencial de producción de gas (mL/g MS) y c : es la velocidad de producción de gas (%/h)

Con la finalidad de monitorear complementariamente la fermentación *in vitro*, se evaluó la motilidad de protozoos *in vitro* a partir del LR de las botellas incubadas a las 0, 24 y 48 h. La evaluación consistió en la observación directa de 10 campos en microscopio óptico (Nikon model eclipse E200MV[®]) utilizando una escala de evaluación de 1 – 5, en donde: 1: sin motilidad; 2: baja motilidad (1-25%); 3: regular motilidad (26-50%); 4: alta motilidad (51-75%); 5: alta motilidad (76-100%).

3.4.2. Determinación de la producción de metano (CH₄)

La producción de CH₄ *in vitro*, fue estimada a partir de la recolección del volumen total de gas de las botellas hasta las 24 h. El gas del espacio superior del frasco fue transferido a una botella de muestreo de gases y luego fue retirado con una jeringa hermética para el análisis de CH₄, mediante el uso de cromatografía de gases (Hewlett Packard[®] 4890, equipado con una columna Porapak N 80/100 de 2 m de largo).

3.5. Análisis estadístico

Los parámetros bioquímicos fermentativos del rumen (AGV, N-NH₃ y el pH) y la densidad de bacterias totales, metanógenos totales, *F. succinogenes*, *R. albus* y *R. flavofaciens*, y los protozoos del rumen de ovejas y llamas, se completaron en dos periodos, y con cada muestra analizada por duplicado (réplicas analíticas). Los resultados fueron analizados a través del modelo general lineal (GLM) utilizando el Proc GLM del SAS (versión 9.4; SAS Institute Inc. Cary, NC, USA), considerando las diferencias como estadísticamente significativas cuando $P < 0,050$.

Se utilizó un diseño en bloques (periodos) completos aleatorizados (Bloque= Periodo).

Modelo experimental I.

$$Y_{ijk} = \mu + \text{Per}_i + \text{Trat}_j + E_{ijk}$$

Donde: Y_{ijk} = variable en estudio; μ = media general; Per_i = periodo ($i = 2$); Trat_j = tipo de “contenido ruminal”, llama vs oveja ($j = 2$); E_{ijk} = error experimental ($k = 3$)

Por otro lado, la digestibilidad, parámetros de producción de gas *in vitro* (a , b y c), metano, y los parámetros bioquímicos de la fermentación (AGV, N-NH₃ y pH) se completaron en dos

periodos, y con cada muestra incubada por duplicado. Los parámetros de producción de gas (a , b y c) fueron estimados mediante el uso del Proc NLIN del SAS (versión 9,4; SAS Institute Inc. Cary, NC, USA).

Los resultados de digestibilidad de MS, MO y FDN, parámetros de producción de gas, metano y los parámetros fermentativos fueron evaluados a través del modelo general lineal (GLM) del SAS con un diseño en bloque completo aleatorizados (Bloque= Periodo) de acuerdo con el siguiente modelo:

Modelo experimental II.

$$Y_{ijkl} = \mu + \text{Per}_i + \text{Trat}_j + \text{An}(\text{Trat})_k + \text{Sust}_l + (\text{Trat} \times \text{Sust})_{jl} + E_{ijkln}$$

Donde, Y_{ijk} = variable en estudio; μ = media general; Per_i = periodo ($i = 2$); Trat_j = tipo de “contenido ruminal”, llama vs oveja ($j = 2$); $\text{An}(\text{Trat})_k$ = animales dentro del tratamiento ($k = 7$); Sust_l = tipo de sustrato ($l = 2$); $(\text{Trat} \times \text{Sust})_{jl}$ = interacción; E_{ijkln} = error experimental.

Para todas las variables fueron verificados los supuestos de homogeneidad de varianza (Test de Levenne), independencia entre los errores y normalidad (Test de Schapiro Wills). Por otra parte, el resultado de la motilidad de protozoos fue estimado mediante el análisis de varianza no paramétrico (Test de Kruskal Wallis) y los efectos fueron considerados si $P < (0,050)$.

Capítulo 4. Resultados

4.1. Consumo, caracterización de los parámetros bioquímicos y las poblaciones microbianas ruminales

Los animales recibieron como único forraje el heno de festuca durante todo el experimento cuya composición química se informa en el cuadro 2. El consumo voluntario de la materia seca (CMS) del heno de festuca fue de 39,9 y 18,3 g/kg PV^{0,75} para las llamas y ovejas, respectivamente (Figura 5). Asimismo, de manera descriptiva en la figura 5 se observa el patrón de consumo indicando claramente un periodo inicial de 2-5 días de adaptación al forraje, hasta que se logra estabilizarse.

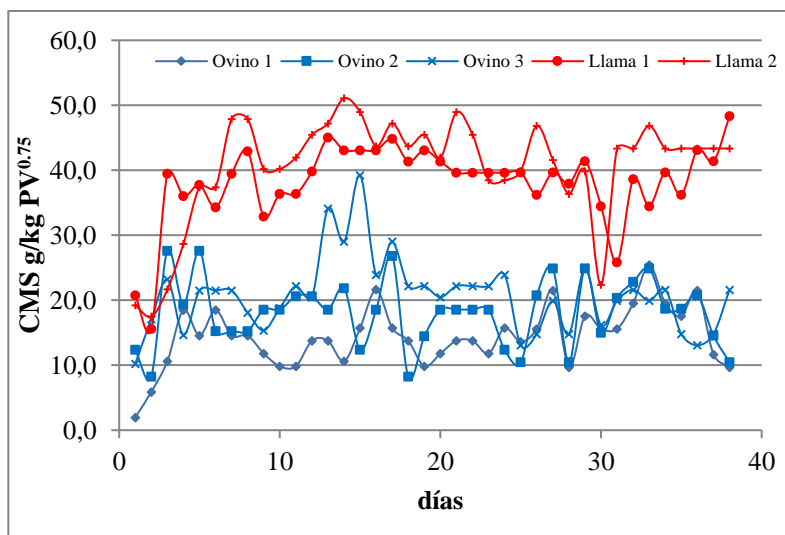


Figura 5. Dinámica de consumo de materia seca (g/kg PV^{0.75}) durante el periodo de experimentación en llamas y ovejas alimentadas con heno de Festuca arundinacea.

Cuadro 2. Composición química del heno de festuca y paspalum (g/kg MS, excepto la MS g/kg material original)

Forrajes	MS	Cenizas	PB	EE	FDN	FDA	Hemi*	Celulosa†	LDA
Festuca	912	87	63	17	773	432	342	392	40
Paspalum	917	59	48	21	739	371	368	337	34

MS: Materia seca, MO: Materia orgánica. PB: Proteína bruta, FDN: Fibra detergente neutro con amilasa y libre de cenizas, FDA: Fibra detergente ácido libre de cenizas, LDA: Lignina en detergente ácido, * Hemicelulosa= FDN - FDA, † Celulosa= FDA – LDA.

El valor de pH del LR inicial de las ovejas fue mayor que el de las llamas ($P=0,010$), mientras que la concentración de $N-NH_3$ y AGV total del contenido ruminal de las llamas duplicó respecto del valor de las ovejas ($P < 0,001$; Cuadro 3). La concentración del acetato, propionato, butirato, iso-butarato e iso-valerato fueron mayores para las llamas ($P < 0,001$, $0,001$, $0,001$, $0,020$ y $0,010$, respectivamente) que las ovejas. Sin embargo, el valerato y la relación A: P no fueron distintos en ambas especies ($P=0,100$ y $0,370$, respectivamente), tampoco para la proporción molar del acetato y propionato ($P=0,638$ y $0,203$, respectivamente), pero si presentó una mayor proporción de butirato el LR de las llamas respecto de las ovejas ($P=0,007$).

Los resultados no revelaron diferencias entre ovejas y llamas para las poblaciones de metanógenos totales y bacterias totales ruminales ($P=0,360$ y $0,630$, respectivamente), de igual manera, la cuantificación absoluta y la representación relativa (%) de las bacterias fibrolíticas como: *F. succinogenes*, *R. albus* y *R. flavefaciens* no evidenciaron diferencias entre ovejas y llamas ($P=0,110$, $0,390$ y $0,580$, respectivamente).

Sin embargo, la densidad de protozoos totales fue mayor para las llamas respecto de las ovejas, así también se halló una mayor densidad de protozoos del grupo entodiniomorfos y que predominó el género *Eudiplodinium* y otros ($P=0,010$ y $<0,001$). Por otro lado, en los pre-estómagos de las llamas no se detectó la presencia de protozoos holotricos, pero si en las ovejas (Cuadro 4).

Cuadro 3. Parámetros bioquímicos de la fermentación del rumen de ovejas y llamas alimentadas con heno de festuca

Variables	Especies		EEM ^a	p-valor
	Oveja	Llama		
pH	6,8	6,7	0,04	0,010
N-NH ₃ (mg/dL)	7,2	14,2	0,81	<0,001
Concentración (Mm/L)				
AGVtotal	45,7	88,7	5,74	<0,001
Acetato	35,0	67,8	4,53	<0,001
Propionato	7,7	14,2	0,99	<0,001
Butirato	1,6	4,2	0,23	<0,001
Iso-buirato	0,7	1,2	0,15	0,020
Valerato	0,2	0,5	0,12	0,100
Iso-valerato	0,6	0,9	0,10	0,010
A:P	4,6	4,8	0,21	0,370
Proporción (mol/100mL)				
Acetato	79,0	78,7	0,64	0,638
Propionato	17,3	16,4	0,66	0,203
Butirato	3,7	4,9	0,36	0,007

^a EEM: Error estándar de la media; AGVtotal: Ácidos grasos volátiles totales; A: P: Relación acetato y propionato.

Cuadro 4. Densidad de bacterias y protozoos ciliados del rumen de ovejas y llamas alimentadas con heno de festuca (valores expresados en Log₁₀ para el número de copias)

Variables	Especies		EEM ^a	p-valor
	Oveja	Llama		
Metanógenos totales (copias/g)	7,4	7,3	0,13	0,360
Bacterias totales (copias/g)	10,6	10,7	0,10	0,630
<i>F. succinogenes</i> (copias/g)	7,8	8,1	0,17	0,110
<i>R. albus</i> (copias/g)	7,3	7,4	0,17	0,390
<i>R. flavefaciens</i> (copias/g)	8,6	8,7	0,19	0,580
<i>F. succinogenes</i> (%) [*]	0,4	0,7	0,19	0,140
<i>R. albus</i> (%)	0,1	0,1	0,03	0,550
<i>R. flavefaciens</i> (%)	1,3	1,2	0,41	0,860
Protozoos totales (10 ⁴ /mL)	3,6	5,0	0,35	0,010
Entodiniomorfos (10 ⁴ /mL)	3,5	5,0	0,36	0,010
<i>Entodinium</i> (%)	92,7	67,3	2,55	0,001
<i>Eudiplodinium</i> y otros (%)	7,3	32,8	2,54	0,001
Holotricos (10 ³ /mL)	1,4	0,0	0,11	0,010

^a EEM: Error estándar de la media,

* Valor relativo (%), expresado respecto a las bacterias totales.

4.2. Incubación de los inóculos y sustratos *in vitro*

4.2.1. Digestibilidad *in vitro* de la materia seca, materia orgánica, y de la fibra

La fuente de licor ruminal (llama vs oveja) no influyó sobre la digestibilidad de la MS, MO y FDN a las 24 h de incubación ($P= 0,099, 0,074$ y $0,228$, respectivamente). Sin embargo, a las 48 h, el LR de las ovejas indujo una mayor digestibilidad de los sustratos que el de las llamas ($P < 0,010$; Cuadro 5).

La digestibilidad de la MS, MO y FDN del heno de festuca fue mayor a la del paspalum a las 24 y 48 h de incubación ($P < 0,001$). El heno de festuca presentó valores superiores de

digestibilidad frente al heno de paspalum en 18, 18 y 32%, respectivamente a las 48 h de incubación. No se observó interacción especie \times sustrato.

Cuadro 5. Digestibilidad de la materia seca (DMS), de la materia orgánica (DMO) y de la FDN (DFDN) (g/kg MS) a 24 y 48 horas de incubación del heno de festuca y paspalum con el inóculo ruminal de ovejas y llamas.

Variables	Especies			Sustratos			p-valor		
	Oveja	Llama	EEM ^a	Festuca	Paspalum	EEM	E ^b	S ^c	E \times S ^d
Digestibilidad a las 24 h de incubación									
DMS	356	365	11,0	382	338	6,9	0,099	0,001	0,427
DMO	312	323	11,7	336	299	7,3	0,074	0,001	0,594
DFDN	154	164	16,5	180	139	10,3	0,228	0,001	0,357
Digestibilidad a las 48 h de incubación									
DMS	426	403	14,5	454	375	8,9	0,008	0,001	0,486
DMO	390	367	15,2	416	340	9,5	0,005	0,001	0,463
DFDN	241	215	18,1	272	185	11,3	0,007	0,001	0,504

^aEEM: Error estándar de la media, ^bEspecie, ^cSustrato, ^dInteracción entre Especie y Sustrato.

A manera de ilustración, en las figuras 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14 del Anexo, se evidenció la desaparición (*in situ*) de tejidos vegetales del heno de festuca alta a las 12, 24 y 48 h de digestión ruminal en ovejas y llamas.

4.2.2. Parámetros de producción de gas, metano y motilidad de protozoos *in vitro*

El LR de las ovejas presentó un mayor valor asintótico “b” (Cuadro 6) de la producción de gas respecto al de las llamas ($P= 0,026$), pero la tasa de producción de gas “c” fue superior para las llamas ($P= 0,003$). Por otro lado, la *fase lag* no presentó diferencias entre especies ($P= 0,431$), y ninguno de los parámetros de producción de gas *in vitro* presentó interacción entre especie \times sustrato.

Estos resultados también se reflejan en la Figura 6, donde se aprecia que el LR de las ovejas alcanzó una mayor producción de gas acumulada neta, en coincidencia con el valor más alto

para el parámetro "b", mientras que el LR de las llamas alcanzó más rápidamente el valor asintótico, como consecuencia de una mayor tasa "c".

Al comparar los sustratos, los parámetros *a*, *b*, *c* y la fase *lag* fueron diferentes ($P < 0,001$), ya que el heno de festuca tuvo una mayor fase lag y valor asintótico "b" que el heno de paspalum ($P = 0,001$). No obstante, la tasa de producción de gas "c" fue superior para el heno de paspalum ($P = 0,001$; Figura 7). La mayor PGAN de la festuca fue coherente con el mayor valor de digestibilidad alcanzado a las 48 h.

Cuadro 6. Parámetros de producción de gas y producción de metano in vitro del heno de festuca y paspalum incubados con licor ruminal de ovejas y llamas.

Variables	Especies			Sustratos			p-valor		
	Oveja	Llama	EEM ^a	Festuca	Paspalum	EEM	E ^b	S ^c	E × S ^d
Parámetros de producción de gas									
<i>a</i>	-1,7	-1,6	1,31	-2,6	-0,7	0,82	0,877	0,007	0,202
<i>b</i>	131,3	105,5	22,37	146,4	90,4	13,92	0,026	0,001	0,115
<i>c</i>	0,04	0,06	0,01	0,03	0,07	0,01	0,003	0,001	0,194
Fase Lag (h)	0,4	0,6	0,48	0,8	0,1	0,30	0,431	0,001	0,249
Producción de metano a las 24 h de incubación									
g / kg MSD	6,8	7,9	1,27	7,4	7,2	0,79	0,083	0,709	0,246
g / kg MOD	11,3	13,1	2,07	12,7	11,8	1,28	0,093	0,372	0,242
g / kg FDND	41,4	46,1	6,98	42,4	45,1	4,30	0,188	0,435	0,476

^a EEM: Error estándar de la media. ^b Especie, ^c Sustrato, ^d Interacción entre Especie y Sustrato, "a": Producción de gas a tiempo = 0, "b": Potencial de producción de gas (mL/g MS) y "c": Tasa de producción de gas (%/h), MSD: Materia seca digerida, MOD: Materia orgánica digerida, FDND; Fibra detergente neutro-digerida.

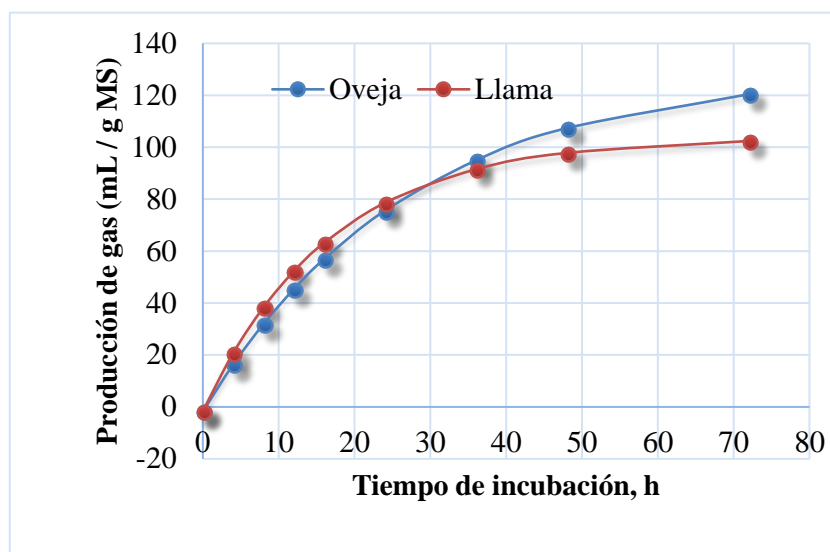


Figura 6. Cinética de producción de gas *in vitro* del LR de ovejas y llamas alimentadas con heno de festuca, ajustadas con el modelo de Ørskov y McDonald (1979),

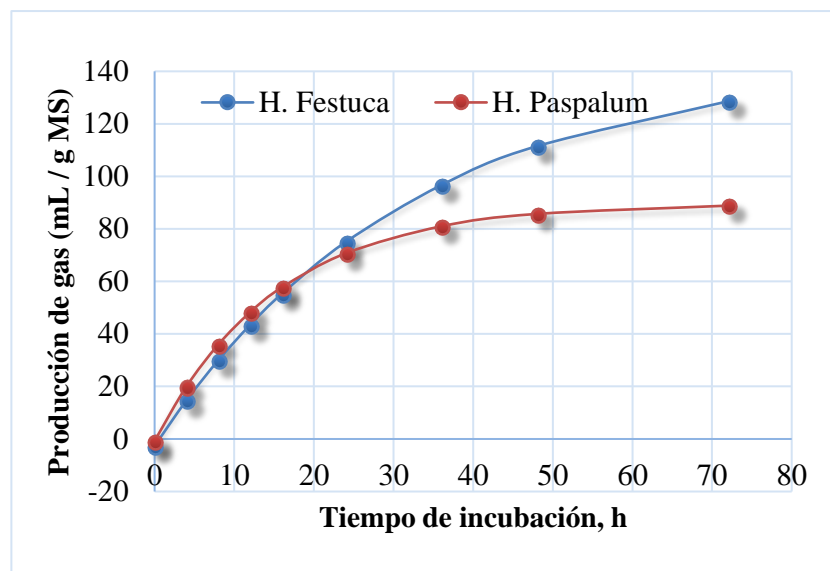


Figura 7. Cinética de producción de gas *in vitro* del heno de festuca y paspalum, ajustadas con el modelo de Ørskov y McDonald (1979),

Por otra parte, los valores de producción de metano *in vitro* a 24 h de incubación (expresado en g/kg de MS, MO, y FDN digerida) no presentó interacción especie \times sustrato, tampoco se

halló diferencias entre especies o sustratos ($P= 0,083, 0,093, 0,188$ y $P= 0,709, 0,372, 0,435$, respectivamente) (Cuadro 6).

La motilidad de los protozoos entre especies (oveja vs llama) y sustratos (festuca vs paspalun) no presentó diferencias ($P= 0,543$ y $0,348$, respectivamente). Sin embargo, la motilidad disminuyó según transcurrió la incubación ($P < 0,001$; Cuadro 7). De tal manera que la motilidad de los protozoos a las 24 h de incubación con LR de las ovejas fue mayor respecto de las llamas ($P < 0,001$), pero no se encontró diferencias a 0 y 48 h de incubación (Cuadro 8).

Cuadro 7. Motilidad de protozoos ruminales in vitro de ovejas y llamas incubadas con heno de festuca y paspalum durante 0, 24 y 48 h.

Variable		Motilidad	p-valor
Especie	Oveja	43,9	0,543
	Llama	40,7	
Sustrato	Festuca	45,0	0,338
	Paspalun	40,0	
Tiempo	0	69,7	<0,001
	24	38,8	
	48	19,1	

Cuadro 8. Motilidad de protozoos del LR de ovejas y llamas a 0, 24 y 48 h. de incubación.

Variable		Motilidad	p-valor
Tiempo (h)	Especie		
0	Oveja	63,4	0,054
	Llama	78,0	
24	Oveja	48,1	0,001
	Llama	26,4	
48	Oveja	20,1	0,102
	Llama	17,6	

4.2.3. Parámetros bioquímicos de la fermentación *in vitro*

El pH resultó mayor para el LR de la oveja que la llama ($P= 0,006$), de igual manera la festuca presentó valores mayores de pH que el paspalum ($P= 0,011$) a las 24 h de incubación, pero esta diferencia desapareció hacia las 48 h de incubación (Cuadro 9).

La concentración de N-NH₃ del LR de la llama fue mayor en 63 y 48% con respecto a la de las ovejas a las 24 y 48 h, respectivamente. Por otra parte, la concentración de AGVtotal fue mayor para el LR de las llamas en comparación a las ovejas ($P < 0,001$) a las 24 y 48 h de incubación. Es decir que las diferencias observadas en la concentración de N-NH₃ y AGVtotal del LR inicial se mantuvo en los ambientes ruminales *in vitro*. No obstante, los sustratos no mostraron diferencias ($P= 0,662$) a las 24 h de incubación, pero sí, luego de 48 h de incubación.

La concentración de acetato, propionato, butirato, valerato y la proporción acetato: propionato (A: P) fue mayor en LR de las llamas que en ovejas a las 24 h de incubación ($P < 0,001$), a las 48 h de incubación, la concentración de AGVtotal fue mayor en LR de llamas a excepción del propionato ($P= 0,399$; Cuadro 9). Por otro lado, los sustratos no presentaron diferencias para los valores de AGVtotal y acetato a las 24 h de incubación, pero sí para propionato, butirato, valerato y A: P. Asimismo, a las 48 h, el heno de festuca presentó niveles más altos de AGVtotal, acetato, propionato y valerato, mas no, para el butirato y la relación A: P.

Cuadro 9. Parámetros bioquímicos de la fermentación de licor ruminal de ovejas y llamas incubadas con heno de festuca y paspalum.

Variables	Especie			Sustrato			p-valor		
	Oveja	Llama	EEM ^a	Festuca	Paspalum	EEM	E ^b	S ^c	E × S ^d
Parámetros fermentativos <i>in vitro</i> a 24 h									
pH	6,0	5,7	0,18	6,0	5,7	0,11	0,006	0,011	0,153
N-NH ₃ , mg/dL	1,4	3,7	0,55	3,3	1,8	0,34	0,001	0,001	0,004
AGVtotal, mM	78,5	99,8	6,91	89,9	88,4	4,30	0,001	0,686	0,944
Acetato	55,9	73,3	5,60	64,4	64,9	3,47	0,001	0,850	0,853
Propionato	18,4	20,0	1,47	20,5	17,9	0,91	0,028	0,002	0,661
Butirato	3,7	5,6	0,51	4,3	5,1	0,32	0,001	0,007	0,098
Valerato	0,5	0,8	0,07	0,7	0,6	0,05	0,001	0,004	0,166
A:P	3,1	3,8	0,17	3,1	3,7	0,10	0,001	0,001	0,825
Parámetros fermentativos <i>in vitro</i> a 48 h									
pH	5,4	5,4	0,05	5,4	5,4	0,03	0,486	0,862	0,233
N-NH ₃ , mg/dL	3,3	6,3	1,04	5,9	3,7	0,64	0,001	0,001	0,094
AGVtotal, mM	96,9	111,6	5,74	108,4	100,0	3,57	0,001	0,007	0,151
Acetato	69,0	82,4	4,38	78,2	73,2	2,72	0,001	0,028	0,114
Propionato	22,4	21,9	1,22	24,2	20,2	0,76	0,399	0,001	0,167
Butirato	4,8	6,4	0,58	5,2	6,0	0,36	0,001	0,016	0,434
Valerato	0,7	0,9	0,07	0,9	0,7	0,05	0,001	0,002	0,115
A:P	3,1	3,8	0,16	3,2	3,6	0,10	0,001	0,001	0,541

^a EEM: Error estándar de la media, ^b Especie, ^c Sustrato, ^d Interacción entre Especie y Sustrato, AGVtotal: Ácidos grasos volátiles totales; N-NH₃: Nitrógeno amoniacal; A: P: Relación acetato y propionato.

Capítulo 5. Discusión

5.1. Caracterización de los parámetros bioquímicos y las poblaciones microbianas ruminales

El valor de pH en los pre-estómagos de las llamas estuvo dentro de los rangos normales (6,5 – 7,5) cercanos a la neutralidad, coincidentes con los valores reportados por Nilsen *et al.* (2015), pero estos valores no concuerdan con estudios previos que indican que los CSA poseen el pH más alto y constante en el tiempo que los ovinos (Jouany *et al.*, 1995; Lemosquet *et al.*, 1996). Sin embargo, en este trabajo, si bien el valor de pH del rumen de las ovejas fue mayor en 0,1 unidades, dicha diferencia careció de relevancia biológica, además cabe aclarar que el menor pH en los pre-estómagos de las llamas fue producto de la mayor concentración de AGVtotal.

La concentración de N-NH₃, AGVtotal, acetato, propionato y butirato fueron mayores en los pre-estómagos de las llamas en comparación a las ovejas alimentadas con forraje de baja calidad (6% de PB). Sin embargo, Liu *et al.* (2009) indicaron que cuando alpacas y ovejas fueron alimentadas con dietas base alfalfa o sorgo + la suplementación con concentrado (>14% de PB en la dieta), la concentración AGVtotal, butirato y N-NH₃ fue mayor para las ovejas que para las alpacas, y no encontró diferencias en la concentración de propionato, valerato y A: P entre animales.

Por otro lado, Nilsen *et al.* (2015) en un ensayo con alpacas, alimentadas con distintas dietas conformada por heno de gramínea y suplementadas con amaranto, cebada y quinua (11-14% de PB en la dieta), observó que las concentraciones de AGVtotal, N-NH₃, acetato, propionato y butirato fueron inferiores respecto a los observados en este estudio. Asimismo, estas diferencias respecto con nuestros resultados podría ser atribuido con el momento (pre y post alimentación) y la técnica de obtención de contenido ruminal, en este caso mediante sondaje oro-esófago-gástrico y cánula ruminal.

En adición, Oldham *et al.* (2014) observaron que la producción de AGV en el ciego en las alpacas contribuye el 26% respecto al total de AGV producidos, y podría ser relevante para obtener energía adicional en comparación a los rumiantes

La mayor concentración de N-NH₃ en las llamas con respecto a las ovejas podría estar relacionada con la mayor capacidad de reciclaje de nitrógeno de las llamas en respuesta al bajo aporte de proteína de los forrajes de baja calidad (Jouany *et al.*, 1995). Esta mayor disponibilidad de nitrógeno para los microorganismos ruminales favorecería una mayor actividad metabólica microbiana, reflejada en los valores de concentración más altos de los AGV y N-NH₃ hallados, pero no influyó sobre la digestibilidad ruminal *in vitro*, por el contrario, las ovejas presentaron un mayor nivel de digestión de los sustratos incubados.

El valor óptimo de N-NH₃ en rumen, es definido como la cantidad mínima de N-NH₃ necesaria para mantener el máximo nivel de síntesis de proteína microbiana y el máximo nivel de la degradabilidad ruminal de la MS (Satter y Slyter, 1974; Mehrez *et al.*, 1977). Boucher *et al.*, (2007) determinaron que los valores óptimos de N-NH₃ en el rumen de bovinos, se encuentran entre 11 – 13 mg/dL. En este trabajo los valores hallados para las llamas estuvieron dentro del rango óptimo reportado para bovinos. Pero, a pesar de que existen reportes de N-NH₃ en los pre-estómagos de los CSA, los valores óptimos aún no han sido definidos. Además, Russell *et al.* (1992) mencionan que las bacterias fibrolíticas son muy dependientes de la disponibilidad de N-NH₃ como fuente de nitrógeno, es más su capacidad fermentativa disminuye considerablemente cuando el nitrógeno es limitante, debido a la reducida capacidad para usar nitrógeno de fuentes provenientes de péptidos y aminoácidos. Por lo tanto, el N-NH₃ ruminal es fundamental para garantizar la funcionalidad óptima del rumen.

Por otra parte, el bajo contenido de proteína y alto en fibra indigestible en los forrajes tienden a estar relacionadas con el bajo consumo voluntario y respuesta animal (Minson y Milford, 1967). No obstante, el mantenimiento de los valores óptimos y constantes de N-NH₃ podrían contribuir positivamente sobre el consumo, debido a que los microorganismos reciben un aporte más elevado y constante de nitrógeno para su actividad metabólica. Además, esta situación podría contribuir a explicar los valores de CMS que fueron observados en este trabajo.

Actualmente, existe escasa información disponible acerca del uso de técnicas moleculares para identificar y monitorear poblaciones microbianas de los pre-estómagos de los CSA. Estudios pioneros fueron realizados por Cerón-Cucchi *et al.* (2013) quienes identificaron mediante PCR la presencia de *F. succinogenes*, *R. albus* y *R. flavefaciens* en los pre-estómagos de las llamas. Por otro lado, Pei *et al.* (2010) cuantificaron y encontraron diferencias en las poblaciones de bacterias totales en el rumen de ovejas y alpacas (7,7 vs 6,9 Log de copias/g) alimentadas con heno de alfalfa y concentrado. Asimismo, Pei *et al.* (2013) reportaron que el porcentaje de metanógenos en relación con el total de bacterias fue menor en alpacas respecto de las ovejas. No obstante, nuestros resultados no evidenciaron diferencias significativas en la densidad de bacterias y metanógenos totales entre llamas y ovejas

En concordancia con los valores reportados para ovejas y búfalos (Koike y Kobayashi, 2001; Koike *et al.*, 2003; Michalet-Doreau *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2014), y en las ovejas y llamas de este estudio, se observó una mayor población de *R. flavefaciens* y *F. succinogenes*, y en menor número al *R. albus*. No obstante, los resultados difirieron con los reportados por Cobellis *et al.* (2016) y Adeyemi *et al.* (2016) quienes observaron que el *R. albus* era la especie dominante. Por otro lado, Wanapat y Cherthong (2009) observaron que el *F. succinogenes* era las más abundante respecto a las fibrolíticas en búfalos alimentados con forraje y concentrado.

Estos valores con alta variabilidad podrían ser atribuidas a distintos factores, tales como la dieta, edad, ubicación geográfica, estación de año y la salud animal (Henderson *et al.*, 2015), igualmente, a la técnica utilizada (método de extracción de ADN, primers, PCR tiempo real vs PCR competitiva), y finalmente a la utilización de las unidades de expresión (número de copias por g, mL o en ng/μL) (Wanapat y Cherthong, 2009; Popova *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2014; Cobellis *et al.*, 2016).

Por otra parte, los resultados indican que las llamas poseen una mayor densidad de protozoos totales y entodiniomorfos, respecto a las ovejas. No obstante Pinares-Patiño *et al.* (2003) y Pei *et al.* (2013) no encontraron diferencias entre alpacas y ovejas bajo las mismas condiciones de alimentación. Ambos autores reportaron la ausencia de protozoos holotricos en la alpaca, situación que coincide con nuestros resultados, y los reportados por Jouany

(2000), Del Valle *et al.* (2008) y Cerón-Cucchi *et al.* (2016). Posiblemente la ausencia de holotricos se deba al tipo de dieta (Willians y Coleman, 1992; citado por Pinares-Patiño *et al.* 2003). Sin embargo, en este trabajo ambas especies consumieron la misma dieta, y aún así no se observó la presencia de los protozoos holotricos, por lo que descartamos que se deba principalmente al efecto de la dieta, sino a otros factores relacionadas con el ambiente físico y bioquímico de los pre-estómagos de los CSA que no fueron estudiados en este trabajo.

5.2. Incubación de los inóculos y sustratos *in vitro*

5.2.1. La digestibilidad, parámetros de producción de gas, metano y la motilidad de protozoos *in vitro*.

La composición nutricional de los forrajes utilizados fue representativa de los forrajes de baja calidad que consumen las llamas en las zonas alto-andinas, y que son característicos por su bajo contenido de proteína y alto contenido de fibra. La digestibilidad de la MS, MO y FDN a las 24 h de incubación no fue influenciada por el tipo de LR de llama y oveja. Sin embargo, a las 48 h, el LR de oveja presentó valores superiores de digestibilidad respecto a la llama, lo que se relaciona con el valor asintótico de la producción de gas.

Los valores inferiores de digestibilidad del LR de las llamas estarían relacionados con la disminución de la motilidad de protozoos ruminales, asociados con la alta sensibilidad de los protozoos a cambios de pH en condiciones de fermentación *in vitro* y a la rápida disminución de los nutrientes aportados por el sustrato y el inóculo ruminal.

Los valores de la digestibilidad del heno de festuca alta fueron inferiores a los reportados por Sheehan *et al.* (1985) que utilizaron el método de Tilley y Terry. Por otra parte, la digestibilidad en LR de la oveja fue similar a lo reportado en ovejas por Buettner *et al.* (1982). En cambio, la digestibilidad en LR de las llamas fueron inferiores a los reportados en llamas por Dulphy *et al.* (1997) en ensayo *in vivo*.

Por otra parte, Bueno *et al.* (2005) estudiaron la influencia de la fuente de inóculo (oveja y vaca) sobre la producción de gas y digestibilidad, determinando que el valor asintótico de la

producción de gas y la digestibilidad de la MO no fueron influenciadas por la fuente inóculo. No obstante, la tasa de producción de gas fue mayor para el inóculo ruminal de las vacas. Este reporte coincide con los estudios de Cone *et al.* (2002) quienes hallaron una alta correlación entre la fuente de inóculo (oveja y vaca) y la producción de gas, pero la tasa de producción de gas estuvo pobremente correlacionada.

En otros trabajos, Xu *et al.* (2016) evaluaron el efecto de dos fuentes de inóculo ruminal provenientes de bovinos con alta y baja digestibilidad, y no hallaron el efecto de la fuente de inóculo sobre la producción de gas y digestibilidad de la paja de cebada. En estudios más recientes se determinó que el uso de inóculo ruminal de bisontes (con alta capacidad de digestión de forrajes de baja calidad) en vacas incrementa el consumo, la digestión total de la proteína y la retención de nitrógeno, asimismo, altera el microbioma ruminal y la concentración de AGV (Ribeiro *et al.*, 2017).

Actualmente, existen muy pocos trabajos que estudien la producción de metano en CSA, aunque existe controversia acerca de si los camélidos producen más o menos metano que los rumiantes menores. De acuerdo con nuestros resultados, no se hallaron diferencias entre llamas y ovejas, ni entre festuca y paspalum en la producción de metano. Sin embargo, Dittmann *et al.* (2014b) reportaron que los CSA producen menos metano que los rumiantes menores, cuando los valores fueron expresados en base al peso vivo por día (en promedio 56% de lo reportado en rumiantes), así como también mencionaron que la producción de metano no fue diferente cuando fue expresada en base al consumo de FDN digestible. La explicación más probable de la menor producción absoluta de metano en CSA podría estar asociada con el menor nivel consumo de alimentos por unidad de peso vivo (NRC, 2007; Meyer *et al.*, 2010; Dittmann *et al.*, 2014a).

5.2.2. Parámetros bioquímicos de la fermentación

La concentración de N-NH₃ y AGV_{total} inicial y a 24 h de incubación fue indicativo de un mayor grado de actividad fermentativa en el LR de las llamas respecto con las ovejas, coincidentes con los mayores valores numéricos de digestibilidad a 24 h. El valor más alto de N-NH₃ y AGV en el LR inicial de las llamas repercutió favorablemente sobre el

mantenimiento del nivel más alto de los parámetros fermentativos a las 24 y 48 h, pero no influyó sobre la digestibilidad de MS, MO y FDN de sustratos. El LR de las ovejas respecto de las llamas a las 48 h mostró un mayor incremento numérico de AGVtotal, acetato, propionato y butirato con respecto a las 24 h (18,4 vs 11,8; 13,1 vs 9,1; 4,0 vs 1,9 y 1,1 vs 0,8 mM, respectivamente), que finalmente se reflejó sobre la mayor digestibilidad y el valor asintótico.

5.4. General

El objetivo del estudio fue evaluar el impacto del contenido ruminal de ovejas y llamas sobre los parámetros bioquímicos ruminales, poblaciones microbianas, y la digestibilidad, producción de gas y metano *in vitro* de forrajes de baja calidad. Las hipótesis que guió este estudio consistió en demostrar que cuando ovejas y llamas son expuestos a dietas de baja calidad, las llamas mantienen un ambiente pre-estomacal más enriquecido por presentar una mayor concentración de N-NH₃ respecto de las ovejas, lo que favorece positivamente a una mayor población e intensidad de la actividad microbiana, conduciendo a una mayor capacidad de digestión ruminal *in vitro* de forrajes de baja en las llamas.

Los resultados obtenidos permitieron refutar la hipótesis planteada, dado que la digestibilidad ruminal *in vitro* de la MS, MO y FDN y el parámetro “b” de la PGAN fue mayor para el LR de las ovejas. No obstante, el contenido pre-estomacal de las llamas presentó poblaciones microbianas distintas, reflejada en la mayor densidad de protozoos totales, entodiniomorfos y ausencia de los protozoos holotricos. En adición, el valor inferior de digestibilidad estaría influenciada por una mayor sensibilidad de los microorganismos ruminales a cambios de pH en condiciones de incubación *in vitro* y a la rápida disminución de los nutrientes aportados por el sustrato y el inóculo ruminal, reflejándose en la disminución de la motilidad de los protozoos.

Capítulo 6. Conclusiones

Cuando las llamas y ovejas fueron alimentadas con forrajes de baja calidad, el contenido ruminal de las llamas presentó una mayor actividad microbiana que el de las ovejas, tal como fue evidenciada por la mayor concentración de ácidos grasos volátiles totales.

En el contenido ruminal de las llamas se observó una mayor densidad de protozoos totales y del grupo entodiniomorfo, y la ausencia de holotricos con respecto a las ovejas. Sin embargo, no se encontró diferencias en la densidad de bacterias totales, metanógenos totales y las bacterias fibrolíticas.

El licor ruminal de las ovejas mostró una mayor capacidad de digestión ruminal *in vitro* por presentar un mayor valor de digestibilidad y potencial de producción de gas respecto de las llamas.

Se recomienda realizar estudios complementarios con un mayor número de animales sobre los mecanismos ruminales que involucran estas diferencias, también resultaría interesante realizar determinaciones en los animales sobre los mecanismos que involucran la mayor capacidad de reciclaje de nitrógeno (urea en saliva y en sangre) en condiciones de alimentación con dietas de baja calidad.

Bibliografía

- Adeyemi, K. D., Ahmed, M. A., Jotham, S., Roslan, N. A., Jahromi, M. F., Samsudin, A. A., y Sazili, A. Q. 2016. Rumen microbial community and nitrogen metabolism in goats fed blend of palm oil and canola oil. *Italian J. Anim. Sci.*, 15(4): 666-672.
- AOAC. 1990. *Official Methods of Analysis (15 th Ed.)*. Association of Official Analytical Chemists. Arlington, USA.
- Boucher, S. E., Ordway, R. S., Whitehouse, N. L., Lundy, F. P., Kononoff, P. J., y Schwab, C. G. 2007. Effect of Incremental Urea Supplementation of a Conventional Corn Silage-Based Diet on Ruminal Ammonia Concentration and Synthesis of Microbial Protein. *J. of Dairy Sci.*, 90(12), 5619-5633.
- Bueno, I. C. S., Cabral Filho, S. L. S., Gobbo, S. P., Louvandini, H., Vitti, D. M. S. S., Abdalla, y A. L. 2005. Influence of inoculum source in a gas production method. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 123, 95-105.
- Buettner, M. R., Lechtenberg, V. L., Hendrix, K. S. y Hertel, J. M. 1982. Composition and digestion of ammoniated tall fescue (*Festuca arundinacea* schreb.) hay. *J. of Anim. Sci.*, 54: 173-178.
- Cerón-Cucchi, M. E., Marcoppido, G., Dekker, A., Fondevila, M., De la Fuente, G., Morici, G. y Cravero, S. 2016. Ciliate protozoa of the forestomach of llamas (*Lama glama*) from locations at different altitudes in Argentinian. *Zootaxa*, 4067(1):49-56.
- Cerón-Cucchi, M. E., Marcoppido, G., Trangoni, M. D., y Cravero, S. L. 2013. Detection of fiber-digesting bacteria in the forestomach contents of llamas (*Lama glama*) by PCR. *Rev Argent Microbiol*; 45: 147-149.
- Clemens, E. T. y Stevens, C. E. 1980. A comparison of gastrointestinal transit times in ten species of mammals. *J. Agric. Sci. (Cambridge)* 94: 735 – 37.
- Cobellis, G., Yu, Z., Forte, C., Acuti, G., y Trabalza-Marinucci, M. 2016. Dietary supplementation of *Rosmarinus officinalis* L. leaves in sheep affects the abundance

of rumen methanogens and other microbial populations. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 7: 27.

- Cone, J. W., van Gelder, A. H., y Bachmann, H. 2002. Influence of inoculum source on gas production profiles. *Anim Feed Sci Technol*, 99(1), 221-231.
- Cummings, J. F., Munnell, J. F. y Vallenas, A. 1972. The mucigenous glandular mucosa in the complex stomach of two New World Camelids, the llama and guanaco. *J. Morphol.*, 137: 71- 110.
- Dehority, B. A. 1993. *Laboratory manual for classification and morphology of rumen ciliate protozoa*. Florida.
- Del Valle, I., De La Fuente, G. y Fondevila, M. 2008. Ciliate protozoa of the forestomach of llamas (*Lama glama*) and alpacas (*Vicugna pacos*) from the Bolivian Altiplano. *Zootaxa* 1703: 62-68.
- Denman, S. E., Tomkins, N. W., y McSweeney, C. S. 2007. Quantitation and diversity analysis of ruminal methanogenic populations in response to the antimethanogenic compound bromochloromethane. *FEMS Microbiology Ecology*, 62(3): 313-322.
- Denman, S. E., y McSweeney, C. S. 2006. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. *FEMS Microbiology Ecology*, 58(3): 572-582.
- Dittmann, M. T., Hummel, J., Runge, U., Galeffi, C., Kreuzer, M. y Clauss, M. 2014a. Characterising an artiodactyl family inhabiting arid habitats by its metabolism: Low metabolism y maintenance requeriments. *J. of Arid Enviroments*; 107: 41-48.
- Dittmann, M. T., Runge, U., Lang, R. A., Moser, D., Galeffi, C., Kreuzer, M. y Clauss, M. 2014b. Methane emission by camelids. *PloS One* 9, e94363.
- Dulphy, J. P., Dardillat, D., Jailler, M. y Ballet, J. M. 1997. Comparative study of forestomach digestión in llamas and sheep. *Reprod. Nutr. Dev.* Vol 37: 709 – 795.

- Eckerlin, R. H. y Stevens, C. E. 1973. Bicarbonate secretion by the glyular saccules of the llama stomach. *Cornell Vet.* 63: 436-445.
- Engelhardt, W. V., Lechner-Doll, M., Heller, R. y Rutagwenda, T. 1988. Physiology of the forestomach in the camelids with particular reference to adaptation to extreme dietary conditions—a comparative approach. *Animal Res Develop*, 28: 56-70.
- Engelhardt, W. V. y Schneider, W. 1977. Energy and nitrogen metabolism in the llama. *Anim. Res. and Develop.*, 5: 68-72.
- Florez, J. A. 1973. Velocidad de pasaje de la ingesta y digestibilidad en alpacas y ovinos. {Rate of passage and digestibility in alpacas and sheep.} *Prog. Acad. Med. Vet., Univ. Nac. Mayor de San Marcos, Lima (B.S. Thesis)*, 46 pp.
- Forster, P., Ramaswamy, V., Artaxo, P., Berntsen, T., Betts, R., Fahey, D. W., Haywood, J., Lean, J., Lowe, D. C., Myhre, G., Nganga, J., Prinn, R., Raga, G., Schulz, M. y Van Dorly, R. 2007. Changes in atmospheric constituents and in radiative forcing. In: *Climate change: The physical science basis. Contribution of working group to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change.* (eds. S. Solomon, D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K. B. Averyt, M. Tignor, y H. L. Miller) Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Fowler, M. E. 2008. Camelids are not ruminants. In Fowler, M. E. and Miller, R. E., eds. *Zoo and Wild Animal Medicine - Current Therapy*, 6th ed. 3375 – 385.
- Fowler, M. E. 1998a. Feeding and Nutrition. In: *Medicine and Surgery of South American Camelids: Llama, Alpaca, Vicuna, Guanaco*, second ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 12-48.
- Fowler, M. E. 1998b. Digestive system. In: *Medicine and Surgery of South American Camelids: Llama, Alpaca, Vicuna, Guanaco*, second ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 305-359.

- Friggens, N. C., Oldham, J. D., Dewhurst, R. J. y Horgan, G. 1998. Proportion of volatile fatty acids in relation to the chemical composition of feeds based on grass silage. *J. Dairy Sci.* 81: 1331-1344.
- Gilles, J. 1980. Andean peasant economics and pastoralism. Small Ruminant CRSP, Dept. of Rural Sociology, Univ. Missouri, Columbia, MO, Pub. No. 1: 135.
- Goering, H. K., y P. J. Van Soest. 1970. Forage fiber analyses (Apparatus, reagents, procedures and some applications). in U. ARS, editor. *Agricultural Handbook N° 379*, Washington, DC, USA. 20 pp.
- Harrison, D. G., Beaver, D. E., Thompson, D. H. y Osbourn, D. F. 1975. Manipulation of rumen fermentation in sheep by increasing the rate of flow of water from the rumen. *J. Agric. Sci., Camb.*, 85: 93-101.
- Heller, R., Cercasov, V. y Engelhardt, W. V. 1986. Retention of fluid and particles in the digestive tract of the llama (*Lama guanacoe* f. Glama). *Comp. Biochem. Physiol.* 83 (4): 687 - 691.
- Hinderer, S. y Engelhardt, W. V. 1975. Urea metabolism in the llama. *J. Comp. Biochem. Physiol.* 521: 619-622.
- Hintz, H. F., Schryver, H. F. y Halbert, M. 1973. A note on the comparison of digestion by new world camels, sheep and ponies. *Anim. Prod.* 16(3):303-305.
- Hoffman, E. 2006. *The Complete Alpaca*. Book 2nd edition. Bonny Doon Press, Santa Cruz, CA, 620 pp.
- Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI). 2013. IV Censo Nacional Agropecuario (IV CENAGRO). Ministerio de Agricultura. Resultados definitivos. pp19.
- Joblin, K. N. 1981. Isolation, enumeration, and maintenance of rumen anaerobic fungi in roll tubes. *Appl. Environ. Microbiol.* 42: 1119–1122.

- Johnson, K. A. y Johnson, D. E. 1995. Methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci*, 73: 2483-2492.
- Johnson, L. W. 1994. Llama nutrition. In Johnson, L.W., ed. Update on Llama Medicine. *Vet. Clin. North Am., Food Anim. Pract.* 10 (2): 187 - 200.
- Jouany, J. P. 2000. The digestion in camelids a comparison to ruminants. *INRA Productions Animales*, 13: 165-176.
- Jouany, J. P. Dardillat, C. y Kayouli, C. 1995. Microbial cell Wall digestión in camelids In: J.L. (ed.) *Elevage et alimentation du dromadaire*. Zaragoza: CIHEAM: 33-42.
- Khejornsart, P., Wanapat, M., y Rowlinson, P. 2011. Diversity of anaerobic fungi and rumen fermentation characteristic in swamp buffalo and beef cattle fed on different diets. *Livestock Science* 139: 230–236.
- Koike, S., Pan, J., Kobayashi, Y., y Tanaka, K. 2003. Kinetics of In Sacco Fiber-Attachment of Representative Ruminal Cellulolytic Bacteria Monitored by Competitive PCR. *Journal of Dairy Science*, 86(4): 1429-1435.
- Koike, S., y Kobayashi, Y. 2001. Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*. *FEMS Microbiology Letters*, 204(2): 361-366.
- Koford, C. B. 1957. The vicuña and the Puna. *Ecol. Monogr.* 27(2):152-219.
- Lemosquet, S., Dardillat, C. Jailler, M. y Dulphy, J. P. 1996. Voluntary intake and gastric digestion of two hays by llamas and sheep: Influence of concentrate supplementation. *J. Agric. Sci.*, 127: 539-548.
- Liu, Q., Dong, C.S., Li, H.Q., Yang, W.Z., Jiang, J.B., Gao, W.J., Pei, C.X. y Liang, Z.Q. 2009. Forestomach fermentation characteristics and diet digestibility in alpacas (*Lama pacos*) y sheep (*Ovis aries*) fed two forage diets. *Anim. Feed Sci. y Technol.* 154: 151-159.

- López, A., Maiztegui, J. y Cabrera, R. 1998. Voluntary intake and digestibility of forages with different nutritional quality in alpacas (*Lama pacos*). *Small Ruminant Research*, 29: 295-301.
- McDowell, L. R., Conrad, J. H., Thomas, J. E., y Harris, L. E. 1974. *Latin American Tables of Feed Composition*. Gainesville: University of Florida.
- Mehrez, A. Z., Ørskov, E. R., y McDonald, I. 1977. Rates of rumen fermentation in relation to ammonia concentration. *B. J. of Nutr.*, 38(3): 437-443.
- Meyer, K., Hummel, J. y Clauss, M. 2010. The relationship between forage cell wall content and voluntary food intake in mammalian herbivores. *Mamm Rev* 40: 221 - 245.
- Michalet-Doreau, B., Fernandez, I., y Fonty, G. 2002. A comparison of enzymatic and molecular approaches to characterize the cellulolytic microbial ecosystems of the rumen and the cecum. *J. of Anim. Sci.*, 80(3): 790-796.
- Minson, D. J. y Milford, R. 1967. The voluntary intake and digestibility of diets containing different proportions of legume and mature Pangola grass (*Digitaria decumbres*). *Australian J. of Exp. Agr. and Anim. Husbandry*, 7: 546-551.
- Modis. 2013. Imágenes satelitales. Visto en <http://daac.ornl.gov/MODIS/>
- Murray, R. M., Byrant, A. M., y Leng, R.A. 1976. Rates of production of methane in the rumen and large intestine in sheep. *Brit. J. Nutr.*, 36:1-14.
- Novoa, C. y Wheeler, J. C. 1984. Llama and alpaca. In Mason, I.L., ed. *Evolution of Domestic Animals*. London: Longman, 116 – 28.
- National Research Council (NRC), 2007. *Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, goats, cervids and New World Camelids*. National Academy Press, Washington, DC.
- Nilsen, B. N.P., Johnston, N., Stevens y Robinson, T.F. 2015. Degradation parameters of amaranth, barley and quinoa in alpacas fed grass hay. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition (Berl)*.

- Oldham, C. L., Robinson, T. F., Hunter, Z. R., Taylor, L., White, J. y Johnston, N. P. 2014. Volatile fatty acid profile for grass hay or alfalfa hay fed to alpacas (*Vicugna pacos*). *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 98: 908-913.
- Ørskov, E. R. y McDonald, I. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to the rate of passage. *J. Agric. Sci.* 92: 499–503.
- Ørskov, E. R. 1982. Protein nutrition in ruminants. Academic Press, New York, NY, 159.
- Owens, F. N. y Isaacson, H. R. 1977. Ruminal microbial yields: factors influencing synthesis and bypass. *Fed. Proc.*, 36: 198-202.
- Pinares-Patiño, C. S., Ulyatt, M. J., Waghorn, G. C., Lassey, K. R., Barry, T. N., Holmes, C. W. y Johnson, D. E. 2003. Methane emission by alpaca and sheep fed on lucerne hay or grazed on pastures of perennial ryegrass/white clover or birdsfoot trefoil. *J. of Agric Sci, Cambridge University Press.* 140: 215–226.
- Pei, C. X., Liu, Q., Dong, C. S., Li, H. Q., Jiang, J. B. y Gao, W. J. 2013. Microbial Community in the Forestomachs of Alpacas (*Lama pacos*) and Sheep (*Ovis aries*). *J. of Integr Agric*, 12: 314-318
- Pei, C. X., Liu, Q., Dong, C.S., Li, H., Jiang, J.B. y Gao, W.J. 2010. Diversity and abundance of the bacterial 16S rRNA gene sequences in forestomach of alpacas (*Lama pacos*) and sheep (*Ovis aries*). *Anaerobe*, 426–432.
- Popova, M., Morgavi, D. P., y Martin, C. 2013. Methanogens and Methanogenesis in the Rumens and Ceca of Lambs Fed Two Different High-Grain-Content Diets. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(6): 1777-1786.
- Quispe, E. C., Rodriguez, T. C., Iñiguez, L. R. y Mueller, J. P. 2009. Producción de fibra de alpaca, llama, vicuña y guanaco en Sudamerica. *Animal Genetic Resources Information*, 45: 1-14.
- Raggi, L. A. 2000. Camelidos en Chile. Situación actual y perspectivas. Fundación para la innovación agraria. Ministerio de agricultura. 10-14.

- Raggi, L. A. y Ferrando, G. 1998. Advances in adaptation and physiology of South American camelids. *Avances en Ciencias Veterinarias* 13: 3-15.
- Raggi, L. A., Jiliberto, E. y Urquieta, B. 1994. Feeding and foraging behaviour of alpaca in northern Chile. *J. Arid Environ.* 26 (1): 73 – 77.
- Ribeiro, G.O., Oss, D.B., He, Z., Gruninger, R.J., Elekwachi, C., Forster, R.J. y McAllister, T.A. 2017. Repeated inoculation of cattle rumen with bison rumen contents alters the rumen microbiome and improves nitrogen digestibility in cattle. *Scientific Reports*, 7(1), 1276. doi: 10.1038/s41598-017-01269-3
- Russell, J. B., O'Connor, J. D., Fox, D. G., Van Soest, P. J., y Sniffen, C. J. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminant fermentation. *Journal of animal science*, 70(11): 3551-3561.
- San Martín, F. 1991. Nutrición y alimentación. En: Fernández-Baca, S. (Ed.), *Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos*. FAO. Oficina Regional para América Latina y el Caribe. Santiago, Chile.
- San Martín, F. y Bryant, F. C. 1989. Nutrition of domesticated South American llamas and alpacas. *Small Rum Res*, 2: 191–216.
- San Martín, F. 1987. Comparative forage selectivity and nutrition of South American camelids and sheep. Texas Tech Univ., Lubbock, TX {Ph.D. Dissertation}, 146 pp.
- San Martín, F., Farfan, R. y Valdivia, R. 1985. Digestibilidad comparativa entre alpacas y ovinos. (Comparative digestibility between alpacas and sheep) V. Convención Internacional sobre Camelidos Sudamericanos (abstract), Cusco.
- San Martín, F., Huasasquiche, A., Farfan, R., Del Valle, O., Holgado, D., Arbaiza, T., Nava, M. y Villarroel, C. 1982. Consumo y digestibilidad comparativa de pastos cultivados entre alpacas y ovinos. (Comparative intake and digestibility for alpacas and sheep of cultivated grasses during two seasons.) *Resúmenes Proyectos Investigación*. Univ. Nac. Mayor de San Marcos, Lima, Vol. 1-2: 255.
- SAS, Institute. 2014. *SAS User's Guide: Statistics*. SAS Institute Inc., Cary, NC.

- Satter, L. D., y Slyter, L. L. 1974. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production *in vitro*. *British Journal of Nutrition*, 32(2): 199-208.
- Sheehan, W., Fontenot, J. P. y Blaser, R. E. 1985. *In-vitro* dry matter digestibility and chemical composition of autumn-accumulated tall fescue, orchard grass and red clover. *Grass and Forage Science*. Vol. 40: 317-322.
- Singh, K. M., Pandya, P. R., Tripathi, A. K., Patel, G. R., Parnerkar, S., Kothari, R. K., y Joshi, C. G. 2014. Study of rumen metagenome community using qPCR under different diets. *Meta Gene*, 2: 191-199.
- Smith, B. B., Pearson, E. G. y Timm, K. I. 1994. Third compartment ulcers in the llama. *Vet Clin North Am: Food Anim Pract* 10(2): 319-330.
- Smuts, M. M. S. y Bezuidenhout, A. J. 1987. *Anatomy of the Dromedary*. Oxford: Clarendon Press.
- Sponheimer, M., Robinson, T., Roeder, B., Hammer, J., Ayliffe, J., Passey, B., Cerling, T., Dearing, D. y Ehleringer, J. 2003. Digestion and passage rates of grass hays by llamas, alpacas, goats, rabbits y horses. *Small Rum Res*, 48: 149-154.
- St-Pierre, B. y Wright, A-D. G. 2012. Molecular analysis of methanogenic archaea in the forestomach of the alpaca (*Vicugna pacos*). *BMC Microbiol* 12: 1–10.
- Sumar, J. 1988. Present and potential role of South American camelids in the high andes. *Outlook Agric*. 17: 23–29.
- Tajima, K., Aminov, R. I., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M., y Benno, Y. 2001. Diet-Dependent Shifts in the Bacterial Population of the Rumen Revealed with Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6): 2766-2774.
- Vallenas, A., Cummings, J. F. y Munnell, J. F. 1971. A gross study of the compartmentalized stomach of two new-world camelids, the llama and guanaco. *J. Morphol.* 134: 399-423.

- Vallenas, P. A. y Stevens, C. E. 1970. Volatile fatty acid concentrations and pH of llama and guanaco forestomach digesta. *Cornell Vet.* 61: 239-252.
- Van Saun, R. J. 2006. Nutrient requirements of South American camelids: A factorial approach. *Small Ruminant Research*, 61: 165-186
- Van Soest, P. J., Robertson, J. B. y Lewis, B. A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74: 3583-3597.
- Van Soest, P. J. 1982. *Nutritional ecology of the ruminant.* O&B Books, Corvallis, OR, 374 pp.
- Wanapat, M., y Cherdthong, A. 2009. Use of Real-Time PCR Technique in Studying Rumen Cellulolytic Bacteria Population as Affected by Level of Roughage in Swamp Buffalo. *Current Microbiology*, 58(4): 294-299.
- Wanapat, M., Ngarmsang, A., Korkhantot, S., Nontaso, N., Wachirapakorn, C., Beakes, G. y Rowlinson, P. 2000. A comparative study on the rumen microbial population of cattle and swamp buffalo raised under traditional village conditions in the northeast of Thailand. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 13: 478-482.
- Wawrzkievicz, M. y Danelón, J. L. 2004. Mejoramiento de la técnica de evaluación de alimentos para rumiantes mediante la producción de gas *in vitro*. Nuevo recipiente de incubación. *Rev. Agr. Prod. Anim.* (ISSN: 0326-0550). Vol. 24. (3-4). Pag. 187-197.
- Xu, L., He, Z.X., Jiao, P.X., Ribeiro, G.O., Bremer, V., Beauchemin, K.A., y Yang, W. Z. 2016. 1636 Effects of inoculum source and ammoniation on *in vitro* gas production kinetics of barley straw. *J Anim Sc*, 94(supplement5), 796-797.

Anexo

1. Imágenes histológicas de la digestión de la lámina del heno de festuca.

Este ensayo fue elaborado en el periodo final del experimento, y consistió en:

- Las láminas del heno de festuca fueron seccionados en fracciones de aprox. 1 cm de longitud para su estudio mediante microhistología.
- Las muestras de heno fueron incubadas en dos bolsas de dacrón y no menos de 6 trozos de material (vainas o láminas) por bolsa.
- Las bolsas fueron suspendidas en el rumen de los animales experimentales (2 llamas y 3 ovejas) y fueron extraídas a las 12, 24 y 48 h.
- El material vegetal remanente se enjuagó para realizar los transcortes y observó el grado de digestión que presentaba cada tipo de tejido.



Figura 8. Corte histológico (transversal) de la lámina de festuca a tiempo "0" (observada con microscopio óptico a 40×). "

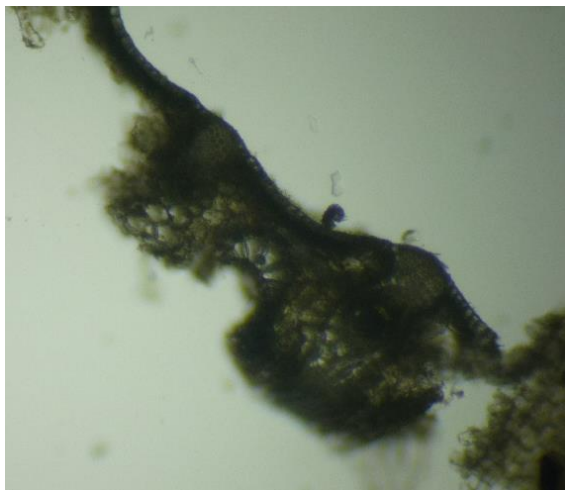


Figura 9. Corte transversal de la lámina de festuca a 12 horas digestión en el C-1 de las llamas (40×).



Figura 10. Corte transversal de la lámina de festuca a 12 horas digestión en el rumen de las ovejas (40×).



Figura 11. Corte transversal de la lámina de festuca a 24 horas digestión en el C-1 de las llamas (40×).



Figura 12. Corte transversal de la lámina de festuca a 24 horas digestión en el rumen de las ovejas (40×).

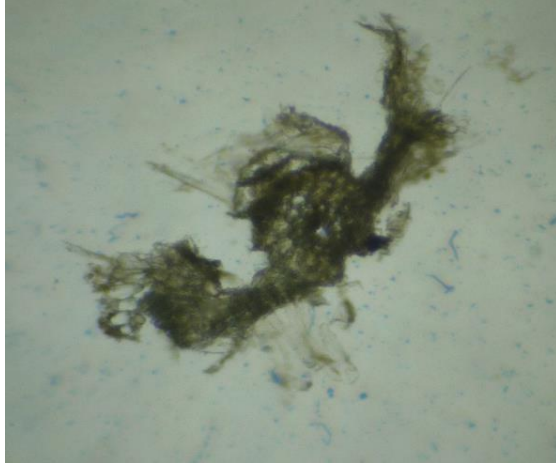


Figura 13. Corte transversal de la lámina de festuca a 48 horas digestión en el C-1 de las llamas (40×).

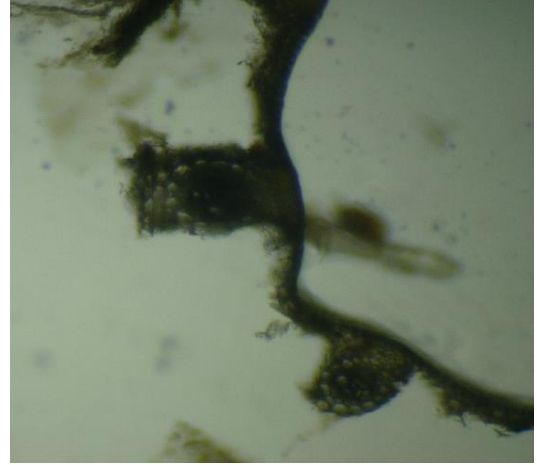


Figura 14. Corte transversal de la lámina de festuca a 48 horas digestión en el C-1 de las llamas (40×).

2. Medio de incubación de buffer carbonato

Se debe preparar el día anterior a ser usado y reservar en heladera. Se detallan las cantidades y el orden en que se deben incorporar las diferentes sustancias en el bidón donde se prepara el medio de incubación. La cantidad de medio a preparar depende de la cantidad de botellas que se deben llenar a razón de 20 mL por botella en caso de 100 mL de volumen de la misma.

Orden	Volumen final sin licor ruminal (mL)		1000
1	Agua	(mL)	742
2	Peptona	(g)	-
3	Sol. Micro	(mL)	-
4	Sol. Buffer	(mL)	212
5	Sol. Macro	(mL)	-
6	Resazurina	(mL)	1.1
Gasear con CO ₂ durante 30 minutos			
7	Ag. Reductor	(mL)	45
	Total	(mL)	1000
Almacenar en heladera hasta su uso			

Cuadro 10. Medio de incubación modificado.

a) Solución buffer

La solución buffer para el ensayo fue modificado utilizando el bicarbonato de sodio (3,5%) como único componente (pH: 8,02), debido a que se desea extraer la fuente de nitrógeno del bicarbonato de amonio (asumiendo que el nitrógeno del licor ruminal posee la limitante de nitrógeno)

Agua destilada	0,18 l.
Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃)	6,30 g

b) Solución de resazurina

Resazurina	0,1 g
Agua destilada c.s.p.	100 mL

c) Solución reductora (se debe preparar en el día y en el orden que se indica)

Volumen final (mL)		100	250	500
Cisteína pura	(g)	0,625	1,563	3,125
Agua destilada	(mL)	95	238	475
Hidróxido de sodio 0,1 M (NaOH)	(mL)	4	10	20
Sulfuro de sodio (Na ₂ S)	(g)	0,625	1,563	3,125

El pH obtenido del medio de incubación modificado (sin macro, micronutrientes, sin bicarbonato de amonio, sin peptona) y saturada con CO₂, fue 6,6.

4. Observación de protozoos ciliados del rumen

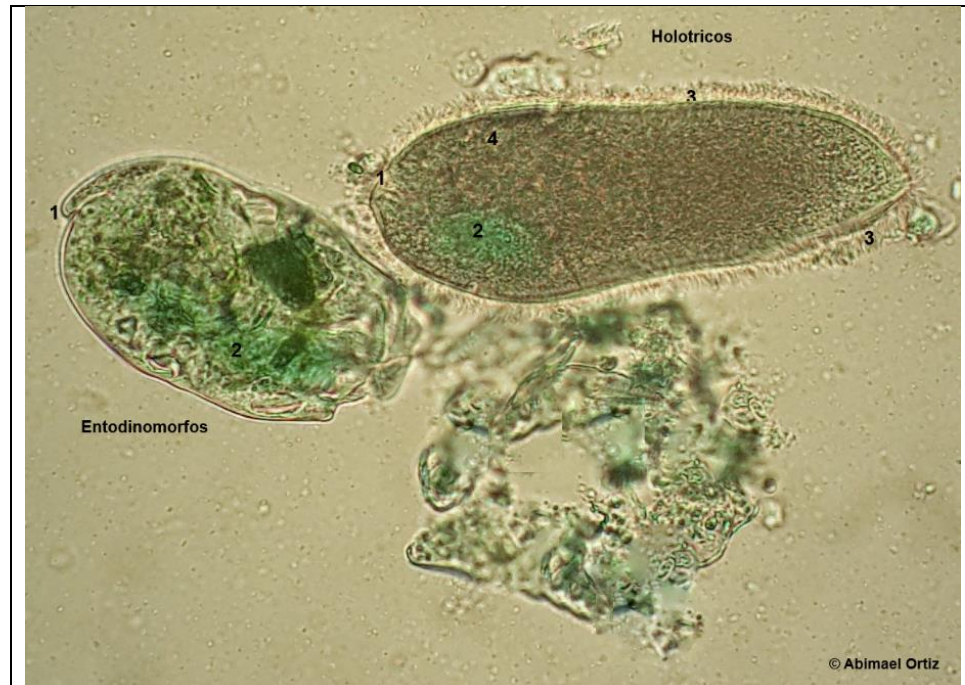


Figura 15. Protozoos entodiniomorfos y holotricos del rumen de la oveja.
 1: vestíbulo (holotricos), citoprocto o recto (entodiniomorfo); 2: macronúcleo; 3: cilios somáticos (holotricos); 4: vacuola contráctil.

4. Presentación de resúmenes en congresos, simposios y jornadas

Ortiz, A., Wawrzkievicz, M., Cerón Cucchi, M. E, Iorio, J. D. y Jaurena, G. 2015. Características de la fermentación ruminal de ovejas y llamas alimentadas con forrajes de baja calidad. Congreso Argentino de Producción Animal. RAPA Vol. 35 Supl. 1: 260.

Ortiz, A., Wawrzkievicz, M., Cerón Cuchi, M. E., Iorio J. y Jaurena, G. 2015. Parámetros de producción de gas y digestibilidad *in vitro* del “licor ruminal” de las llamas y ovejas alimentados con forrajes de baja calidad. 7° Congreso mundial en camélidos sudamericanos. Vol 7. Pag. 51.

Ortiz, A., Wawrzkievicz, M. Cerón Cucchi, M. E., Fernández Pepi, M. G. y Jaurena, G. 2016. Composición microbiana y características fermentativas del rumen de ovejas y llamas alimentadas con forrajes de baja calidad. VI Jornadas de jóvenes investigadores, FCV-UBA. Pp. 119.

Ortiz, A., Fernandez-Pepi M. G., Ceron Cucchi, M. E. y Jaurena, G. 2016. Composition of bacterial and protozoa of sheep rumen and llama forestomach fed low quality forage. 10th Joint Symposium: Gut Microbiology. Clermont-Ferrand. France.