

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

Memoria de Título

**CUANTIFICACIÓN DEL EFECTO DE TRES FITOADITIVOS SOBRE
LA GENERACIÓN DE METANO EN FERMENTACIONES “IN
VITRO”**

MARÍA JOSÉ GABRIELA ESTAY OSSES

Santiago, Chile

2017

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

Memoria de Título

**CUANTIFICACIÓN DEL EFECTO DE TRES FITOADITIVOS SOBRE
LA GENERACIÓN DE METANO EN FERMENTACIONES “IN
VITRO”.**

**QUANTIFICATION OF THE EFFECT OF THE THREE PHYTO
ADDITIVES OVER METHANE GENERATION “IN VITRO”
FERMENTATION.**

MARÍA JOSÉ GABRIELA ESTAY OSSES

Santiago, Chile

2017

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

**CUANTIFICACIÓN DEL EFECTO DE TRES FITOADITIVOS SOBRE
LA GENERACIÓN DE METANO EN FERMENTACIONES
“IN VITRO”.**

Memoria para optar al Título Profesional de: Ingeniero Agrónomo

MARÍA JOSÉ GABRIELA ESTAY OSSES

Profesor Guía	Calificaciones
Sr. Héctor Manterola B. Ingeniero Agrónomo, M.Sc.	6,5
Profesores Evaluadores	
Sr. Jurij Wacyk G. Ingeniero Agrónomo, M.S., Ph.D.	5,8
Sr. Jaime Araya C. Ingeniero Agrónomo, M.S., Ph.D.	6,0

Santiago, Chile
2017

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por el amor, contención y apoyo incondicional brindado durante todo este camino y toda mi vida.

A mi abuelita María por su crianza, apoyo, compañía y amor.

A mi abuelito Heriberto, mi angelito que siempre estará en mi corazón. Por su amor, amabilidad, alegría, cariño.

A mis tios, primas, primos por el apoyo y compañía.

A mi profesor guía Héctor Manterola, por su apoyo, paciencia, disposición entregada en este proceso y por responder a todas mis preguntas e inquietudes.

A todas las personas que trabajan o trabajaron en el Laboratorio de nutrición animal, Carlita, Jp, Loreto, Maricarmen, Wilmer, profesor Giorgio, que me apoyaron para poder realizar mi memoria.

A Don Alfredo Pesce, por considerarme como su pupila, nieta. Por compartir su sabiduría, entregarme consejos, otros puntos de vista, apoyo y motivación.

A Marco por su apoyo incondicional, ayudarme, darme consejos y por quererme.

A mis amigos de Universidad, Pía, Fabián, Macarena, Jazmín, Sergio que me han acompañado, querido y apoyado con los mejores deseos.

A Don Rolando, por motivarme y darme consejos.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
MATERIALES Y MÉTODOS	6
Lugar y duración del estudio	6
Metodología.....	6
Etapa 1: Preparación de animales	6
Etapa 2: Preparación de especies vegetales a evaluar	7
Etapa 3: Preparación de tubos y solución buffer	7
Etapa 4: Extracción de licor ruminal y medición de metano.....	8
Estudios	9
DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO	10
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	11
Estudio 1 romero	11
Estudio 2 ají de color.....	16
Estudio 3 boldo.....	21
Comparación de los tres fitoaditivos	26
CONCLUSIONES	28
BIBLIOGRAFÍA	29
ANEXO Y APÉNDICE	32

RESUMEN

El metano es un gas que tiene un potencial efecto sobre el calentamiento global 23 veces mayor que el CO₂. El metano se genera en fuentes como: pantanos, arrozales y rumiantes, este último constituye uno de los principales aportadores al ambiente, ya que emiten entre un 15-20% de la emisión mundial de metano, el que proviene del proceso de fermentación ruminal. El presente estudio tiene por objetivo cuantificar el efecto de incluir cantidades crecientes de tres fitoaditivos, sobre la concentración de metano en incubaciones “*in vitro*”. Se realizaron 3 estudios, uno para cada fitoaditivo (romero, ají de color y boldo). Cada estudio tiene 5 tratamientos, disponiéndose de 5 tubos de repetición por tratamiento. El tratamiento testigo fue común para todos los tratamientos. Los tratamientos fueron: T0 (testigo): 0,5 gr de afrecho de soya, 0,5 gr de heno de alfalfa, 50 ml de solución buffer y 15 ml de licor ruminal, T1: T0 + 0,125 gr fitoaditivo (F), T2: T0+ 0,250 gr (F), T3: 0,500 gr (F), T4: 0,750 gr (F). El día anterior a la extracción de licor ruminal se dejaron preparados los tubos con los distintos tratamientos, con la excepción del licor ruminal y el buffer, los que fueron agregados a la mañana siguiente. El periodo de fermentación que se utilizó fue de seis horas, realizándose el muestreo cada hora, donde se midió el metano en la fase aérea.

Se concluye que la adición de romero, ají de color o boldo como fitoaditivos individuales generan una significativa reducción de metano, siendo su efecto mayor en la medida que se incrementa la dosis del fitoaditivo. De los tres fitoaditivos utilizados, para las diferentes inclusiones, es el boldo el que provoca los mayores efectos.

Palabras claves: *Rosmarinus officinalis* L, *Capsicum annuum* L, *Peumus boldus* Mol, *Ovis aries*.

ABSTRACT

The objective of this study was to quantify the effect of the inclusion of three phyto-additives on methane concentration in “in vitro” incubations. The three studied phyto-additives were: colored peeper, rosemary and boldo. It can be concluded that the addition of romero, chili peppers or boldo as individual phyto-aditives show significant reductions in the methane concentration, in which the biggest reduction is measured when the dosis of the phyto-aditive is increased. Of the three fito-aditives boldo shows the biggest effect for the different inclusions.

Keywords: *Rosmarinus officinalis* L, *Capsicum annum* L, *Peumus boldus* Mol, *Ovis aries*.

INTRODUCCIÓN

El metano es un gas de alto poder energético, que se genera en distintas fuentes como: pantanos, arrozales y también por animales como los rumiantes. Este gas es uno de los que provoca el efecto invernadero, siendo relevante su contribución al calentamiento global, ya que tiene un potencial de calentamiento global 23 veces superior al del CO₂ (FAO, 2009). Los rumiantes producen entre un 15-20% de la emisión mundial de gas metano, producto del proceso de fermentación ruminal. En el rumen las bacterias anaeróbicas metanogénicas producen metano mediante la reducción de CO₂ con H₂. Dicha producción de metano se considera como una pérdida de energía potencialmente utilizable. Además la disminución de las emisiones de metano a la atmósfera cobra importancia en la protección del medio ambiente (Carmona *et al.*, 2005). Se han estudiado diversos productos para reducir estas emisiones, entre ellos antibióticos promotores de crecimiento y aceites esenciales. Sin embargo, la Unión Europea estableció a partir del año 2006 la prohibición de todos los antibióticos promotores de crecimiento para animales, prohibición que se fundamenta en la capacidad para crear resistencias cruzadas con los antibióticos utilizados en medicina humana (Commission of the European Communities, 1991; Anadon y Martínez-Larrañaga, 1999 citado por Castro y Rodríguez, 2005). Por este motivo se ha intensificado la investigación de productos naturales alternativos que puedan regular la fermentación ruminal. Estos compuestos naturales han sido considerados para reemplazar a los antibióticos como alternativas seguras y sostenibles (Tekeli *et al.*, 2007). Según Calsamiglia *et al.* (2007), los aceites esenciales presentes en las plantas pueden interactuar con las membranas celulares de las bacterias e inhibir el crecimiento de algunas bacterias gram positivas y gram negativas, tal inhibición resulta en bajas concentraciones de amoníaco, metano y acetato y en altas de propionato y butirato. En general, las bacterias gram positivas son más sensibles que las bacterias gram negativas a la inhibición por los aceites esenciales de plantas (Smith-Palmer *et al.*, 1998). Uno de los mecanismos a los que se atribuye la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales está asociado a la presencia de terpenoides y compuestos fenólicos (Helander *et al.*, 1998; Chao *et al.*, 2000, citado por Benchaar *et al.*, 2008).

En Chile no hay estudios del uso de fitoaditivos como mecanismo que haga posible reducir las emisiones de metano. El presente estudio se enmarca en un proyecto financiado por Corfo, Línea 2 de Investigación y Desarrollo, que tiene por objetivo reducir las emisiones de metano y amoníaco en sistemas de producción de carne y leche con rumiantes mayores utilizando aditivos vegetales. En una primera etapa se realizarán estudios *in vitro* para seleccionar los productos vegetales de mayor poder de reducción del metano.

En este estudio se propone determinar la capacidad de reducción de la generación de metano del romero (*Rosmarinus officinalis* L.), ají de color (*Capsicum annuum* L.) y boldo (*Peumus boldus* Mol.). Adentrándose en las características químicas de estos productos, se puede señalar, que los terpenos más importantes que contiene el romero son: β -pineno (12,75%), α -pineno (36,42%) y alcanfor (15,65%) (Viuda-Martos *et al.*, 2007).

La hoja de romero tiene como componente principal el cineol, que tiene la propiedad de estimular la digestión, a la vez de ser antiséptico y antioxidante (Kamel, 2000 citado por Tekeli *et al.*, 2007). Por otro lado, para Ouattara *et al.* (1997) el componente activo del romero que actúa sobre los microorganismos es el alcanfor. Según Cobellis *et al.* (2015), la composición de los compuestos activos de romero puede estar influenciado por factores como: especie de planta, estado de crecimiento, partes de la planta usada, composición del suelo, temperatura y método usado para obtener el aceite esencial. Según Viuda-Martos *et al.* (2007) existe una gran variabilidad de los componentes que depende de: temporada, clima y ubicación geográfica. El ají de color por su parte, presenta un compuesto llamado capsaicina, que según Deans *et al.* (1987, citado por Calsamiglia *et al.*, 2007), es el principal componente del ají de color y que además presenta una actividad antimicrobiana para las bacterias metanogénicas, las que pueden ser gram positivas o gram negativas. Cedrón (2013) señala que la capsaicina es un alcaloide que conjuntamente con la dihidrocapsaicina forman el 90% de todos los compuestos responsables del picor del ají y los pimientos. Según Bittner *et al.* (2009) los terpenos más importantes que contiene el boldo son: ascaridol (34,8%), limoneno (16,1%) y el eucaliptol (cineol) (11,95%).

Existe una gran cantidad de aceites esenciales, pero sólo se han evaluado alrededor de 70 y sus componentes activos, a los que se les atribuye la disminución de metano (Polin *et al.*, 2014). Según Vélez-Terranova *et al.* (2014), la eficiencia en la reducción del metano varía dependiendo de la concentración y del tipo de metabolito que estén presentes en la planta. Al disminuir las emisiones de metano se reducen las pérdidas energéticas y aumenta la eficiencia en la alimentación, lo que se ve reflejado en un aumento en la productividad del rebaño (Figueroa *et al.*, 2007). (Beauchemin *et al.*, 2009 citado por Polin *et al.*, 2012) reportaron que una disminución de un 25% del metano en rumiantes, puede resultar en el aumento de 1 Litro de leche al día en vacas de alta producción y en un aumento de peso de 75 g/d en bovinos productores de carne.

Hipótesis

- La inclusión de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) reduce la generación de metano en fermentación “*in vitro*”.
- La inclusión de ají de color (*Capsicum annuum* L.) reduce la generación de metano en fermentación “*in vitro*”.
- La inclusión de boldo (*Peumus boldus* Mol.) reduce la generación de metano en fermentación “*in vitro*”.

Objetivos

- Cuantificar el efecto de la inclusión creciente de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre la concentración de metano en incubaciones “*in vitro*”.
- Cuantificar el efecto de la inclusión creciente de ají de color (*Capsicum annuum* L.) sobre la concentración de metano en incubaciones “*in vitro*”.
- Cuantificar el efecto de la inclusión creciente de boldo (*Peumus boldus* Mol.) sobre la concentración de metano en incubaciones “*in vitro*”.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar y duración del estudio

El estudio se realizó en la Estación Experimental Antumapu. Los análisis químicos del licor ruminal se llevaron a cabo en el Laboratorio de Nutrición Animal, Departamento de Producción Animal, Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile, ubicado en la comuna de La Pintana, Provincia de Santiago, Región Metropolitana. El estudio tuvo una duración de 40 días, durante los meses de noviembre y diciembre del año 2014.

Metodología

Etapa 1: Preparación de animales

Animales

Para la realización del ensayo se utilizaron tres capones de raza Merino fistulados en el rumen y provistos de cánulas ruminales. Estos animales fueron donadores de licor ruminal para las incubaciones “*in vitro*”, que se llevaron a cabo en el Laboratorio de Nutrición Animal. Los animales fueron operados bajo todos los considerandos del Comité de bioética de la Facultad de Ciencias Agronómicas y bajo la supervisión del Médico Veterinario Profesor Héctor Uribe. Certificado N° 2014-2. Además se contó con la infraestructura de corrales con comederos y bebederos individuales y personal capacitado para cumplir las actividades del proyecto.

Alimentación

Los animales fueron alimentados con una dieta compuesta por 800 gramos de heno de alfalfa (*Medicago sativa* L) (de segundo corte) y 100 gramos de afrecho de soya (*Glycine max* L). Esta dieta se suministró con la finalidad de obtener licor ruminal con una actividad fermentativa adecuada.

Etapa 2: Preparación de especies vegetales a evaluar

Las hojas de boldo y romero fueron cosechadas en la Localidad de Chanco, Región del Maule. El ají de color se compró en una bodega de frutos del país. Se compró una cantidad suficiente para asegurar que durante todo el ensayo se usara la misma partida del ingrediente. Tanto los frutos como las hojas fueron secados a 60°C en una estufa de aire forzado (Memmert, Alemania) por 48 horas y molidos con una criba de 1 mm en un molino.

Etapa 3: Preparación de los tubos y de la solución buffer

El día previo a la extracción del licor ruminal, se realizó la preparación de los 65 tubos de incubación en el Laboratorio de Nutrición Animal. Los fitoaditivos fueron pesados en la balanza (Precisa 120 A, Suiza), de acuerdo a los tratamientos (Cuadro 1). A cada tubo de los 5 tratamientos, dentro de cada estudio de fitoaditivo, se le agregó 0,5 g de afrecho de soya y 0,5 g de heno de alfalfa como base. Luego estos tubos de vidrio de 100 cc se taparon con un tapón de goma con válvula bunsen y se dispusieron en la estufa de aire forzado a 39°C.

Posteriormente empleando un agitador magnético (Velp científica, Italia) se prepararon 4 litros de solución buffer, compuesta por PO_4HNa_2 (37,2 g), CO_3HNa (39,2 g), NaCl (1,88 g), KCl (2,28g), CaCl_2 (0,16 g) y MgCl_2 (0,24 g) (González y Tarrago, 2011). Estos 4 litros se dispusieron en un matraz, el que luego se dejó en la estufa de aire forzado a 39°C hasta el día siguiente, para agregar dicha solución en los 65 tubos el día de la extracción del licor ruminal.

Etapa 4: Extracción de licor ruminal y medición de metano

La extracción del licor ruminal en los animales se realizó previo a la ración de la mañana, éste se colectó de los 3 capones donadores, mezclándose en un recipiente y filtrándose posteriormente con una gasa. El licor obtenido se dispuso en dos termos de 1,8 Lt, los que previamente fueron calentados con agua a 40°C, con la finalidad de mantener la temperatura del licor ruminal. Éste fue llevado al Laboratorio y dispuesto en los 65 tubos (Figura 1) en una dosis de 15 ml + 50 ml de solución buffer, la que se dispuso con anterioridad al licor ruminal. Posteriormente los tubos se mantuvieron en la estufa a 39°C. Cada media hora se procedió a agitarlos a fin de lograr una colonización y fermentación adecuada del sustrato y del efecto del fitoaditivo. El periodo de fermentación fue de seis horas y la toma de datos de metano fue cada una hora, en la fase aérea mediante el medidor de gases (RKI Eagle 2, Japón). En cada estudio se realizó una incubación por día.



Figura 1. Tubo con licor ruminal.

Estudios

Se realizaron tres estudios independientes para cada fitoaditivo (romero, ají de color y boldo), los que fueron analizados de manera individual y posteriormente comparados entre sí mediante valores porcentuales obtenidos en cada tratamiento de los estudios (Cuadro 2).

Los tratamientos tuvieron una composición base de: 0,5 gr de heno de alfalfa, 0,5 gr de afrecho de soya, 50 ml de solución buffer y 15 ml de licor ruminal. La diferencia entre ellos fue la dosis del fitoaditivo utilizada (Cuadro 1).

Cuadro 1: Esquema de un estudio con tratamientos y su respectiva composición

Tratamientos	Composición
T0	0,5 gr heno de alfalfa+0,5 gr afrecho de soya + 50 ml buffer + 15 ml licor ruminal
T1	T0 + 0,125 gr fitoaditivo
T2	T0 + 0,250 gr fitoaditivo
T3	T0 + 0,500 gr fitoaditivo
T4	T0 + 0,750 gr fitoaditivo

Como se señala, el estudio de cada fitoaditivo tuvo 5 tratamientos y cada tratamiento a su vez 5 repeticiones. Es importante destacar que el tratamiento testigo fue común para todos los tratamientos de los tres fitoaditivos y es el que da la máxima línea de producción de metano. En consecuencia fueron utilizados 20 tubos para el estudio de cada fitoaditivo. El tiempo de fermentación fue de seis horas y las mediciones de metano se hicieron cada una hora.

Cuadro 2: Tres estudios de fitoaditivos, cada uno con 5 tratamientos

Estudio 1 romero	Estudio 2 ají de color	Estudio 3 boldo
T0 (0 gr)	T0 (0 gr)	T0 (0 gr)
T1 (0,125 gr)	T1 (0,125 gr)	T1 (0,125 gr)
T2 (0,250 gr)	T2 (0,250 gr)	T2 (0,250 gr)
T3 (0,500 gr)	T3 (0,500 gr)	T3 (0,500 gr)
T4 (0,750 gr)	T4 (0,750 gr)	T4 (0,750 gr)

DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con cinco tratamientos y cada uno de estos con cinco repeticiones. Siendo la unidad experimental el tubo de incubación. El modelo estadístico a usar en esta investigación fue:

$$y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

donde:

y_{ij} = es la concentración de metano de la i-ésima muestra perteneciente al j-ésimo tratamiento.

T_i = es el efecto fijo del i-ésimo tratamiento ($i = 1, 2, \dots, 5$)

e_{ij} = error residual aleatorio $\sim N(0, \sigma^2)$

Una vez verificado el cumplimiento de los supuestos del ANDEVA, los datos se analizaron a través de un análisis de varianza por hora y en caso de encontrar diferencias entre los tratamientos se realizó la prueba de comparación múltiple de Tukey.

Para cada estudio se expresó la disminución del metano provocada por la adición del fitoaditivo en relación al testigo (100%).

Adicionalmente se determinaron ecuaciones de regresión lineal que relacionen las cantidades de fitoaditivo con las concentraciones de metano para la hora de mayor importancia, que de acuerdo al estudio resultó ser la hora cuatro, hora donde existe un mayor efecto de los tratamientos respecto al testigo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio 1. Efecto del romero sobre la producción de metano

Cuadro 3: Efecto de la adición de romero, sobre la emisión de metano, bajo condiciones “in vitro” (ppm), durante 6 horas.

Tratamientos	1	2	3	4	5	6
T0 (0 gr)	3342 b ±567	2599 a ±320	5187 b±537	5790 c±178	5687 d ±590	6403 c±251
T1 (0,125 gr)	2270 ab±450	2537 a ±173	4513 ab±509	4807 b ±470	4423 c±190	6323 c±363
T2 (0,250 gr)	1694 a±234	2577 a ±247	4967 ab±306	3583 a±442	4187 bc±297	6167 bc±145
T3 (0,500 gr)	1727 a ±186	2367 a ±208	4270 a±339	3550 a±398	3540 ab±410	5520 ab±460
T4 (0,750 gr)	2001 a ±366	2363 a ±254	4260 a±491	3250 a ±316	3312 a± 440	5215 a±429

Promedios (± desviación estándar) de los niveles de metano (ppm) medidos para cada tratamiento durante seis horas. Letras distintas verticales sobre cada barra indican diferencias significativas ($P < 0,05$), según Test Tukey para experimentos de laboratorio.

Durante la primera hora todos los tratamientos con romero, a excepción de T1 presentaron valores significativamente inferiores a los del testigo. Para la segunda hora de incubación no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos con romero y el testigo. En la tercera hora T3 y T4 presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto al testigo. Por otra parte, no se presentaron diferencias entre T1, T2 y el testigo. Para la cuarta hora todos los tratamientos con romero presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto al testigo. Sin embargo, dosis de 250, 500 y 750 mg no tuvieron diferencias estadísticamente significativas entre sí. Resulta de interés destacar que en la cuarta hora se presenta el mayor incremento de metano a nivel del testigo y los mayores efectos de reducción en los tratamientos. En la quinta hora se presenta un comportamiento similar a la hora anterior, donde las dosis con romero difieren significativamente del testigo. En la sexta hora T3 y T4 presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto al testigo, no así entre T1, T2 y el testigo. Como se aprecia en el Cuadro 3, a medida que se incrementó la cantidad de romero, los efectos fueron significativamente mayores.

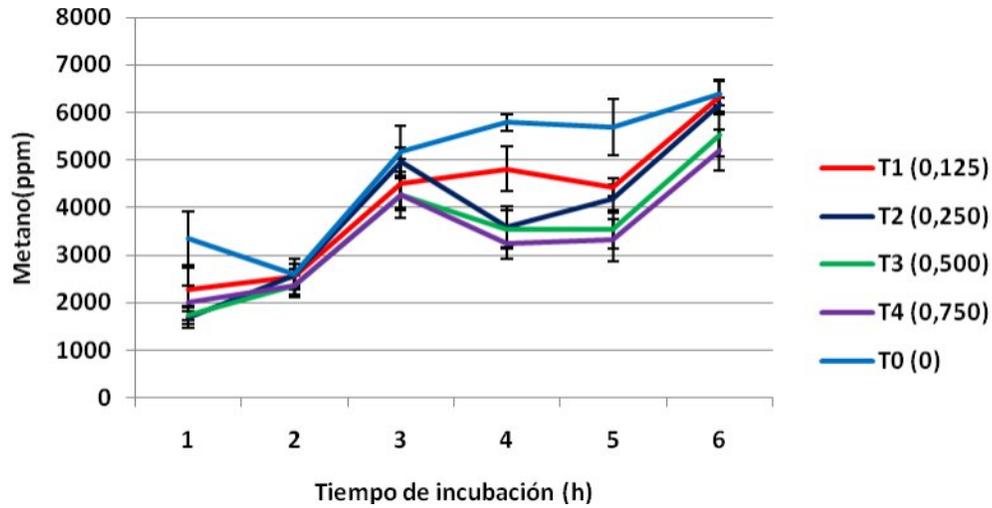


Figura 2. Efecto de la adición de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre la producción de metano en fermentaciones “in vitro”.

A partir de la hora 3, todos los tratamientos con romero disminuyeron la concentración de metano hasta la quinta hora respecto al testigo, el cual tuvo un incremento permanente en el tiempo. Para todos los tratamientos después de la quinta hora se observa un incremento de metano. A lo largo de las seis horas de incubación, los tratamientos que presentaron una disminución más efectiva fueron T3 y T4 (Figura 2).

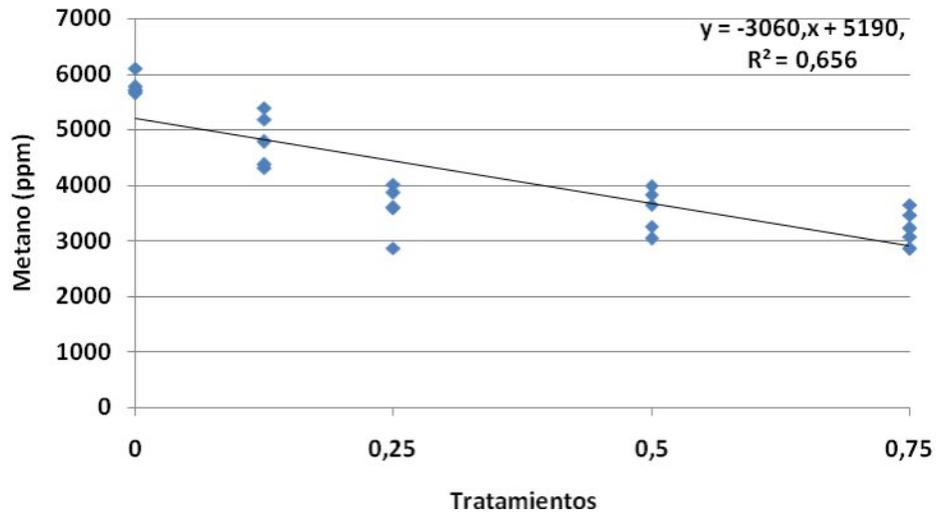


Figura 3. Efecto de las dosis de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre la producción de metano en fermentaciones “in vitro” en la hora 4.

Las respuestas de reducción de metano al incrementar las dosis de romero, a la hora 4, se ajustaron a una ecuación de regresión de tipo lineal. Ecuación que alcanzó significancia ($P < 0,0001$) con un coeficiente de regresión de 0,656 (Figura 3).

Efecto de la adición de romero, sobre las concentraciones de metano en la hora 4.

Los resultados del análisis estadístico de las emisiones de metano obtenidas en la cuarta hora de incubación utilizando el fitoaditivo romero se presentan en la Figura 4.

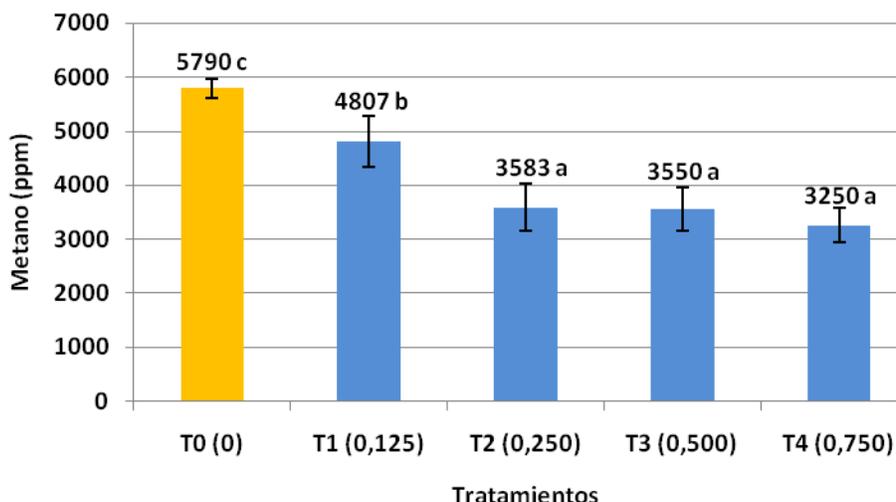


Figura 4. Promedios de los niveles de metano (ppm) medidos para cada tratamiento en la hora 4. Letras distintas sobre cada barra indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

A la hora 4 de fermentación, se observó que todos los tratamientos con romero Figura 4, presentaron diferencias estadísticamente significativas en la reducción de la concentración de metano respecto al testigo. A su vez, los tratamientos que redujeron en mayor cantidad la producción de metano fueron los tratamientos T2, T3 y T4, sin presentar diferencias estadísticamente significativas entre ellos.

Roy *et al.* (2014), utilizando aceites esenciales de romero en dosis de: 0, 30, 300 y 600 mg L⁻¹ de licor ruminal, obtuvieron reducciones de metano respecto al testigo tras 24 horas de incubación *in vitro*. Éstas fueron de un 16,2%, 18,2% y 24% respectivamente, reducciones estadísticamente significativas ($P < 0,001$).

Por otra parte Pinsky *et al.* (2015), utilizando 5 tipos de aceites esenciales en dosis de 500 mg L⁻¹ de licor ruminal, observaron tras 24 horas de incubación *in vitro*, que el aceite de romero presentó una reducción de metano de un 10,6%, la cual no es estadísticamente significativa.

Otros autores, como Bamikole *et al.* (2015b), realizaron estudios *in vitro* en rumiantes, utilizando cuatro niveles de aceite de romero en dosis: 0 (control), 10, 20 y 30 µl/50 ml de licor ruminal, y uno con monensina (0,6 mg/50 ml) como control positivo. La producción de metano disminuyó en un 21,7% con la dosis más alta de aceite de romero. Reducción estadísticamente significativa ($P < 0,001$).

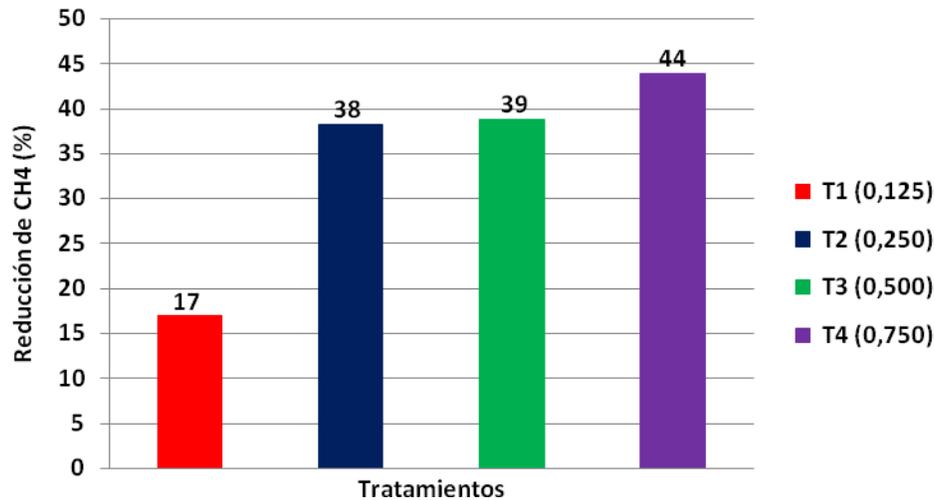


Figura 5. Porcentaje de reducción en la concentración de metano en función del aumento de la cantidad adicionada de romero a la hora 4 de fermentación “in vitro”.

Al expresar en porcentaje las disminuciones provocadas por la adición de romero en relación al Testigo (100%), se observa en la Figura 5 que el tratamiento T4 provocó el mayor porcentaje de reducción del metano (44%), seguido por los dos intermedios. El tratamiento con 125 mg provocó sólo un 17% de reducción, valor que es similar a los obtenidos por Jahani-Azizabadi *et al.* (2009), quienes utilizando licor ruminal de ovejas y romero en polvo en dosis de 12 mg, tras 24 horas de incubación, obtuvieron reducciones de un 15%, respecto al testigo. Reducción estadísticamente significativa ($P < 0,05$).

Al respecto, Orellana *et al.* (2014) realizaron estudios in vitro utilizando licor ruminal de ovejas y una dosis de romero en polvo de 70 mg. Tras 24 horas de incubación, el romero tuvo una reducción de un 72,5%, respecto al control, sin modificar otros parámetros de fermentación. Sin embargo, estos resultados no fueron estadísticamente significativos ($P > 0,05$).

Cobellis *et al.* (2015) utilizaron aceite esencial de romero en dosis: 0; 0,5; 1,0; 1,5 y 2,0 g L⁻¹ de licor ruminal. Tras 24 horas de incubación, la dosis mayor de romero obtuvo una reducción de un 9%. Reducción estadísticamente significativa ($P < 0,001$).

Estudio 2. Efecto del ají de color sobre la producción de metano

Cuadro 4. Efecto de la adición de ají de color, sobre la emisión de metano, bajo condiciones “in vitro” (ppm), durante 6 horas.

Tratamientos	1	2	3	4	5	6
T0 (0 gr)	3342ab±567	2599 a±320	5187 b±537	5790 cd±178	5687 c±590	6403 c±251
T1 (0,125 gr)	3460 ab±243	4480 bc±256	6540 c± 385	5903 d±271	5263bc±386	6973 c±329
T2 (0,250 gr)	3640 b±198	4757 c±498	6543 c±635	5250 c±409	4773b±270	6610 c±401
T3 (0,500 gr)	2920 ab±376	3830 b±270	4933 b± 575	3770 b±319	3387 a±407	4710 b±512
T4 (0,750 gr)	2633 a±363	2989 a±330	3730 a±350	2834 a±200	2597 a±341	3590 a±234

Promedios (\pm desviación estándar) de los niveles de metano (ppm) medidos para cada tratamiento durante seis horas. Letras distintas verticales sobre cada barra indican diferencias significativas ($P < 0,05$), según Test Tukey para experimentos de laboratorio.

Durante la primera hora, los distintos tratamientos con ají de color no presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto al testigo. Sin embargo, existen diferencias estadísticamente significativas entre T2 y T4. En la segunda hora T1, T2 y T3 presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto al testigo. Por otro lado entre T4 y el testigo no se presentaron diferencias estadísticas significativas. En la tercera hora los tratamientos T1, T2 y T4 presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto al testigo. Pero no hubo diferencias entre T3 y el testigo. Para la cuarta hora T3 y T4 presentaron una reducción de metano estadísticamente significativa respecto al testigo, siendo T4 el que produjo una menor concentración de metano. Para la quinta hora T2, T3 y T4 presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto al testigo, no pudiéndose establecer diferencias estadísticamente significativas entre T1 y el testigo. En la hora 6, los tratamientos T3 y T4 presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto al testigo. Sin embargo, T1 y T2 no presentan diferencias respecto al testigo. Al comparar los distintos niveles de adición se observó en el Cuadro 4 que el tratamiento con 750 mg provocó la mayor respuesta en términos de reducir el metano desde la tercera hora en adelante.

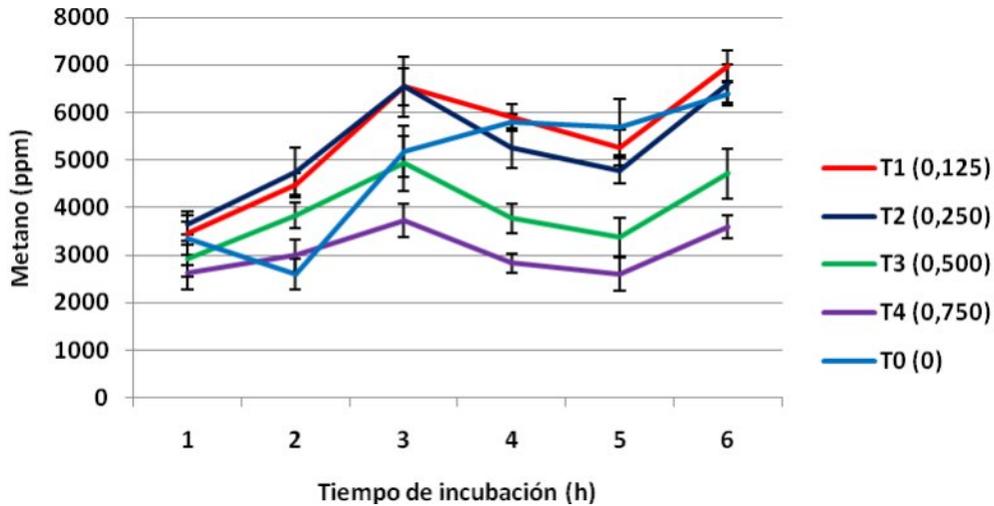


Figura 6. Efecto de la adición de ají de color (*Capsicum annum* L.) sobre la producción de metano en fermentaciones “in vitro”.

En todos los tratamientos con ají, se observó un aumento sostenido de la concentración de metano, desde la hora 1 (Figura 6) hasta la hora 3. A partir de ese momento, todos los tratamientos, a excepción del testigo, disminuyeron la concentración hasta la quinta hora, en que la concentración de metano aumenta.

Los tratamientos con menor nivel de inclusión T1 y T2, presentaron una concentración de metano mayor que el testigo a lo largo de las seis horas de incubación, a excepción de la quinta hora, donde ambos tratamientos presentaron una disminución respecto al testigo. Los tratamientos T3 y T4, presentaron una disminución desde la tercera hasta la sexta hora de incubación con respecto al testigo. El tratamiento T4, fue el que presentó una menor producción de metano, seguido por T3.

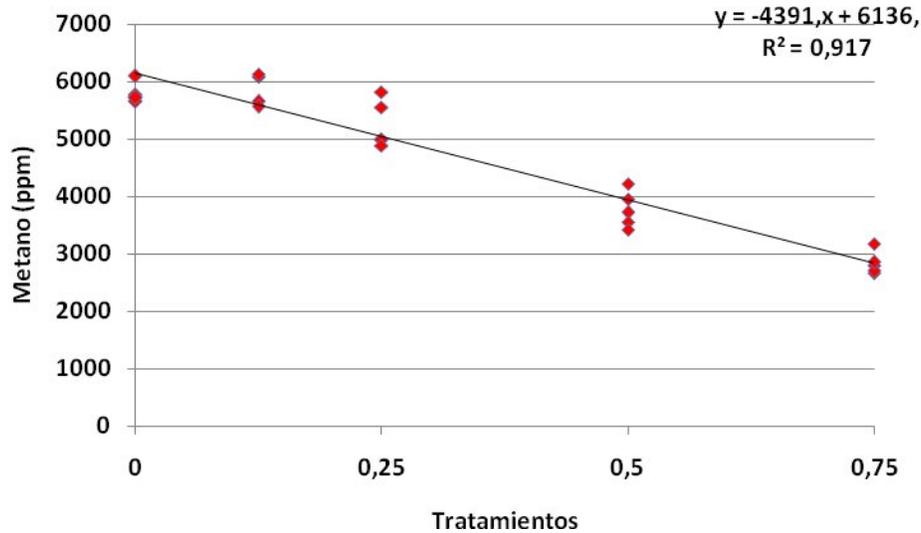


Figura 7. Efecto de las dosis de ají de color (*Capsicum annuum* L.) sobre la producción de metano en fermentaciones “in vitro” en la hora 4.

Al efectuar una regresión lineal entre los niveles de aditivo y las concentraciones de metano a la hora 4, se obtuvo una ecuación que resultó estadísticamente significativa ($P < 0,0001$) (Figura 7). Con un alto valor de $R^2 = 0,917$, el cual indica que el 91.7% de las variaciones que ocurren en las concentraciones de metano se explicarían por las variaciones en las dosis del fitoaditivo.

Efecto de la adición de ají de color, sobre la concentración de metano en la hora 4

Durante la cuarta hora de fermentación, se observó que con dosis de 500 y 750 mg de ají de color (Figura 8), se produjeron efectos significativos en la reducción de la concentración de metano respecto al testigo.

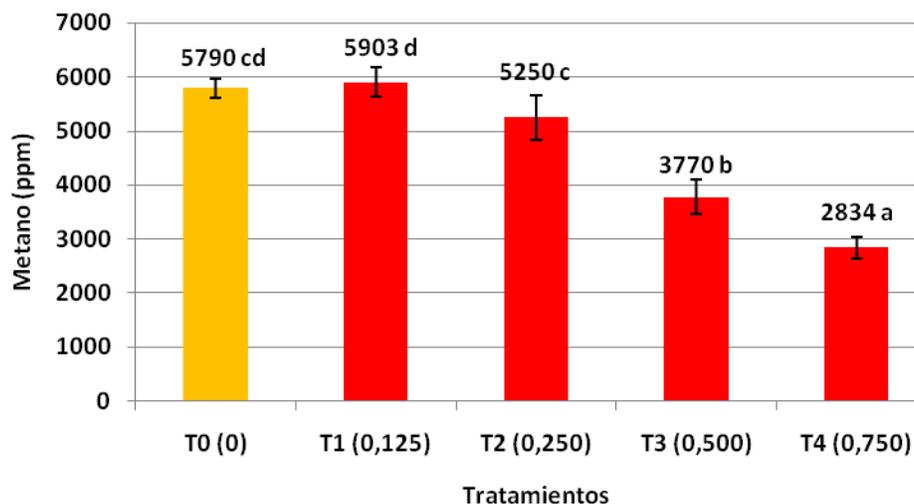


Figura 8. Promedios de los niveles de metano (ppm) medidos para cada tratamiento en la hora 4. Letras distintas sobre cada barra indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Al respecto, Calsamiglia *et al.* (2007), reportaron resultados similares, atribuyendo el efecto de reducción de la metanogénesis y el incremento en la proporción de ácido propiónico, provocado por la capsaicina, el cual es un componente activo del ají de color. Al potenciarse las vías de generación de ácido propiónico por las bacterias, se establece una competencia por los iones H^+ , ya que estas vías reducen el ácido pirúvico, por lo que hay menor disponibilidad de H^+ para las bacterias metanogénicas.

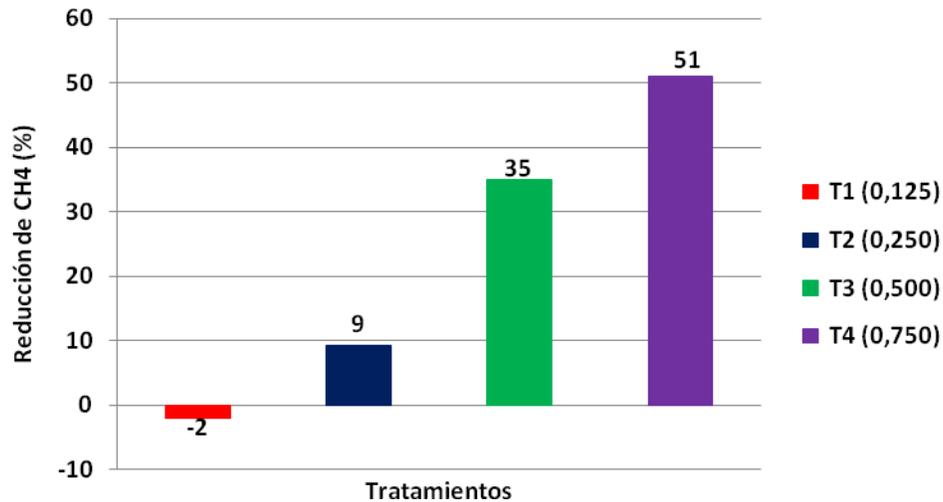


Figura 9. Porcentaje de reducción de la concentración de metano en función del aumento de la cantidad adicionada de ají de color. hora 4 de fermentación “in vitro”.

Al expresar en porcentaje las disminuciones provocadas por la adición de ají de color, en relación al testigo (100%), se observó que a medida que se aumentó la cantidad de ají de color agregada (Figura 9) hubo una respuesta incremental en el porcentaje de reducción de metano. Situación que ocurrió a partir de 250 mg, ya que el tratamiento T1 presentó un porcentaje negativo, aumentando el metano en un 2%. El tratamiento T2 redujo en 9%, T3 en 35% y T4 en un 51%. Estos porcentajes de reducción son comparables a los citados por Orellana *et al.* (2014), quienes realizaron estudios in vitro, donde el tiempo de fermentación fue de seis horas y el metano se midió cada hora. En la hora 3, al utilizar ají de color en polvo en dosis de 0,5 gr y 0,75 gr, se presentó una reducción de un 39% y 72% respectivamente. Reducciones estadísticamente significativas ($P < 0,05$). Estos valores son superiores a los obtenidos por Sirohi *et al.* (2012), quienes utilizando extracto de ají en dosis de 1 ml/30 ml de licor ruminal, tras 24 horas de incubación, presentó una reducción de un 6,8%, valor que no es estadísticamente significativo ($P > 0,05$).

Estudio 3. Efecto de adicionar hojas de Boldo secas, sobre la producción de metano

Cuadro 5. Efecto de la adición de hojas de boldo, sobre la emisión de metano, bajo condiciones “in vitro”(ppm), durante 6 horas.

Tratamientos	1	2	3	4	5	6
T0 (0 gr)	3342 c± 567	2599 c±320	5187 c±537	5790 d±178	5687 d±590	6403 e±251
T1 (0,125 gr)	1463 b± 129	2975 c± 231	5220 c± 580	4013 c± 422	3323 c±254	5697 d± 310
T2 (0,250 gr)	879 ab±117	1817 b±107	3033 b±364	2867 b± 161	2570 b±156	3753 c± 508
T3 (0,500 gr)	965 ab±294	1529 b±188	2570 b± 120	2418 b± 267	2427 b± 215	2699 b± 304
T4 (0,750 gr)	596 a±66	940 a± 119	1454 a±138	1575 a± 139	1496 a± 63	1721 a± 106

Promedios (\pm desviación estándar) de los niveles de metano (ppm) medidos para cada tratamiento durante seis horas. Letras distintas verticales sobre cada barra indican diferencias significativas ($P<0,05$), según Test Tukey para experimentos de laboratorio.

En la primera hora, todos los tratamientos con boldo produjeron diferencias estadísticamente significativas respecto al testigo (Cuadro 5). En la segunda hora las concentraciones de metano aumentaron, a excepción del testigo. Los tratamientos T2, T3 y T4 presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto al testigo. Sin embargo, no hubo diferencias entre T1 y el testigo. En la tercera hora de incubación, los tratamientos con 250, 500 y 750 mg presentaron concentraciones de metano significativamente menores al testigo y T1. Cabe señalar que al igual que en la hora anterior no hubo diferencias entre T1 y el testigo. Tampoco hubo diferencias entre T2 y T3. En la cuarta y quinta hora todos los tratamientos con hojas de boldo presentaron concentraciones de metano significativamente inferiores al testigo. Siendo T4 el que presentó una menor producción de metano. Cabe señalar que entre T2 y T3, no hubo diferencias estadísticamente significativas. En la hora 6, todos los tratamientos presentaron concentraciones de metano significativamente inferiores a la del testigo. Donde T4 fue el que presentó la menor producción de metano. A lo largo de las seis horas, se observó una tendencia a disminuir las concentraciones de metano a medida que se incrementó la adición de hojas de boldo.

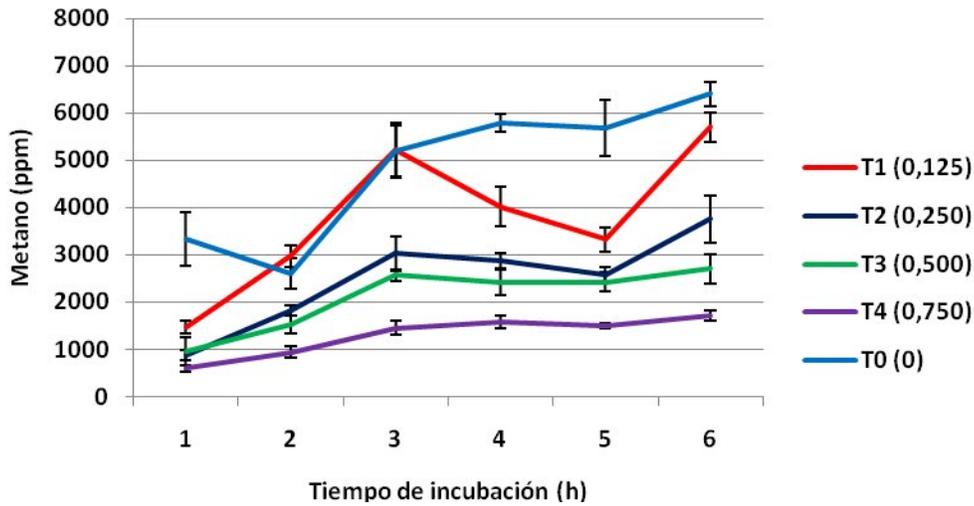


Figura 10. Efecto de la adición de boldo (*Peumus boldus* Mol.) sobre la producción de metano en fermentaciones “in vitro”.

Durante las dos primeras horas, los efectos de tratamiento con boldo fueron relativamente bajos, lográndose la máxima respuesta a partir de la hora 3 (Figura 10), en la que se observa que a medida que se incrementa la adición de hojas de boldo, los peaks de metano son más bajos. Los tratamientos T2, T3 y T4 presentaron una disminución de metano a lo largo de las seis horas, respecto al testigo. En cambio el tratamiento T1 presentó un comportamiento similar al testigo hasta la tercera hora y luego disminuyó hasta la quinta hora para luego aumentar.

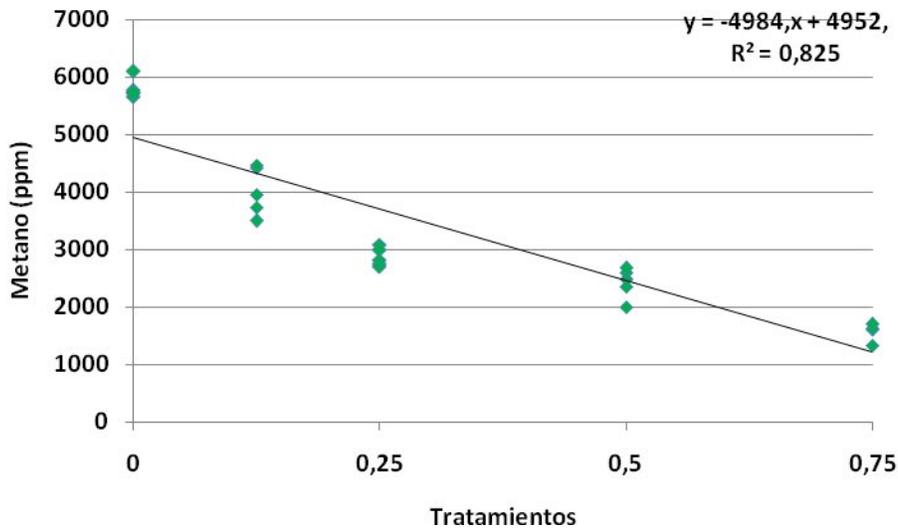


Figura 11. Efecto de las dosis de boldo (*Peumus boldus* Mol.) sobre la producción de metano en fermentaciones “in vitro” en la hora 4.

Al efectuar una regresión lineal entre las cantidades de aditivo y las concentraciones de metano a la cuarta hora, que es el tiempo en que se registran los mayores efectos de reducción, se obtuvo una ecuación que resultó estadísticamente significativa ($P < 0,0001$) (Figura 11). El valor de $R^2 = 0,825$ que es alto, indica que el 82,5% de las variaciones que ocurren en las concentraciones de metano se explicarían por las variaciones en las dosis del fitoaditivo.

Efecto de la adición de boldo sobre la reducción de metano en la 4 hora de incubación

Durante la cuarta hora de fermentación todos los tratamientos con hojas de boldo presentaron una reducción de metano estadísticamente significativa con respecto al testigo ($P < 0,05$).

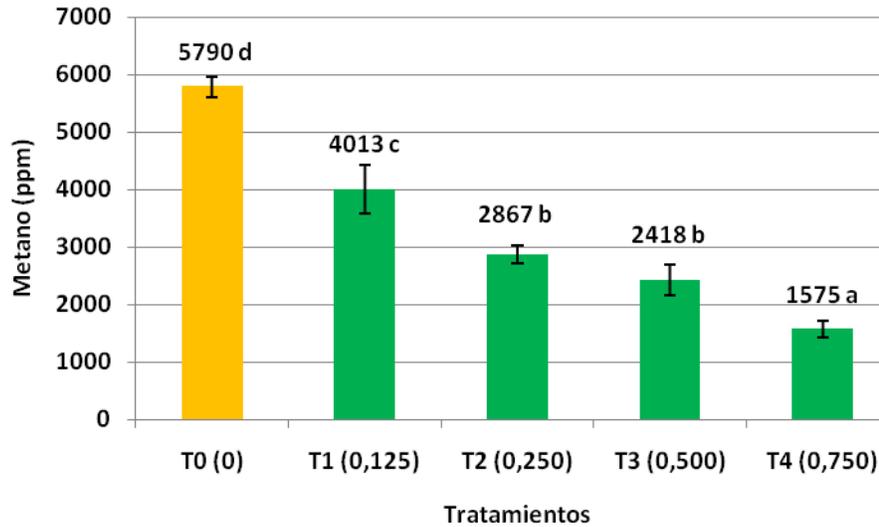


Figura 12. Promedios de los niveles de metano (ppm) medidos para cada tratamiento en la hora 4. Letras distintas sobre cada barra indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Todos los tratamientos con boldo presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto al testigo. Sin embargo, se observa que el tratamiento T4 presenta una mayor reducción de metano, seguido por T3, T2 y T1. Por lo que a mayor nivel de inclusión del fitoaditivo, mayor es el efecto en la reducción de metano. Entre T2 y T3 no existen diferencias estadísticamente significativas (Figura 12).

El principio activo del boldo es la boldina, un alcaloide que está presente en las hojas (Cassels *et al.*, 1994) la cual sería la responsable de las reducciones de metano.

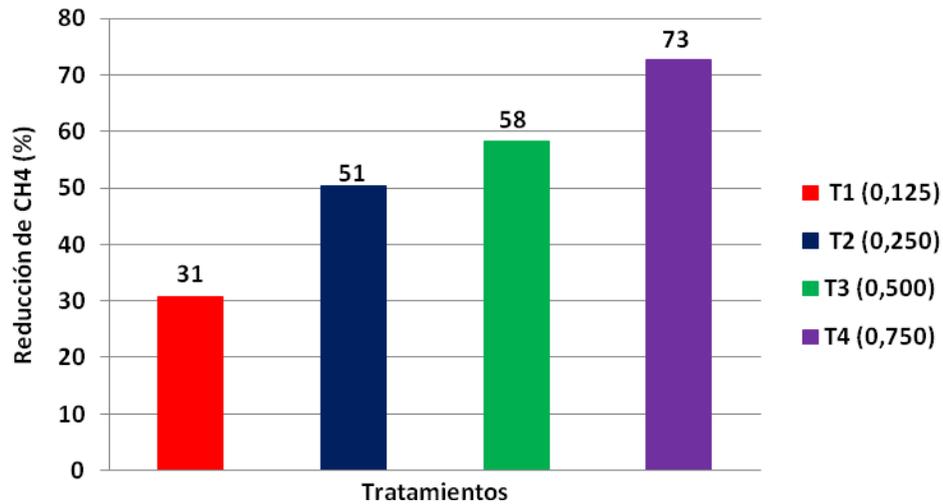


Figura 13. Porcentaje de reducción en la concentración de metano en función del aumento de la cantidad adicionada de boldo a la hora 4 de fermentación “in vitro”.

Al expresar los efectos de reducción como porcentaje en relación al testigo (100%), a la cuarta hora de fermentación (Figura 13) se observó una respuesta proporcional al incremento en las cantidades agregadas de hojas de boldo.

Todos los tratamientos presentaron una disminución de metano respecto al testigo. El tratamiento T1 presentó una reducción de un 31% y los otros tratamientos T2, T3 y T4, presentaron una reducción de un 51%, 58% y 73%, respectivamente.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Orellana *et al.* (2014), quienes utilizando licor ruminal de ovejas y boldo en polvo en dosis de 0,5 y 0,75 gr, en la tercera hora de incubación presentaron una reducción de un 26% y 49% respecto al testigo. Reducciones estadísticamente significativas ($P < 0,05$). En el presente estudio, para los 500 y 750 mg, detallados en la Figura 13 y Cuadro 5, se observó para la cuarta hora una reducción de un 58% y 73%.

Comparación de los tres fitoaditivos estudiados en su efecto sobre la reducción de metano, a la cuarta hora de fermentación “in vitro”

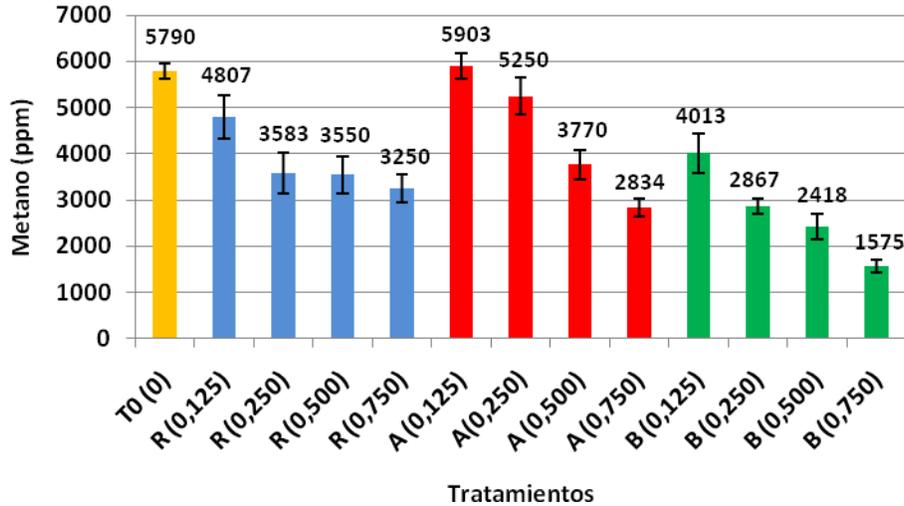


Figura 14. Promedios de los niveles de metano (ppm) medidos para cada tratamiento en la hora 4. R= romero, A= ají de color, B= boldo.

En la Figura 14 se observa un comportamiento similar entre los tres fitoaditivos, al incluirlos en cantidades crecientes en los tubos de fermentación “in vitro”, ya que los tres presentaron reducciones significativas de metano a medida que se incrementó la cantidad adicionada de fitoaditivo. Se observa que el tratamiento que tuvo el mayor efecto en reducir el metano fue el boldo T4 (0,750) seguido por boldo T3 (0,500) y el ají de color T4 (0,750).

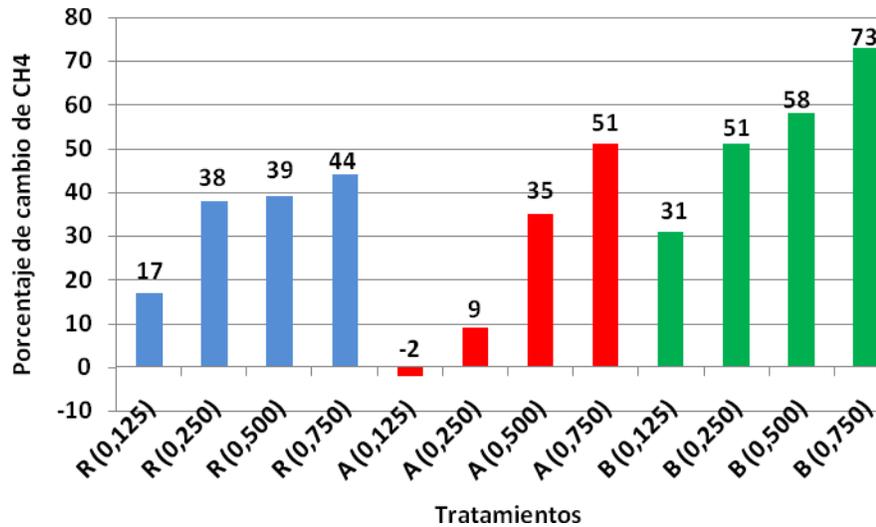


Figura 15. Porcentajes de reducción de la concentración de metano, respecto al testigo, por efecto de la adición de cantidades crecientes de romero (R), ají de color (A) y boldo (B).

Al expresar los valores de reducción del metano por efecto de las adiciones de los tres fitoaditivos, se observa que las hojas de boldo presentaron porcentajes mayores de disminución para cualquiera de los niveles de adición del fitoaditivo (Figura 15). Se observa en ají y boldo, una respuesta proporcional al incremento en el fitoaditivo, respuesta que en el caso del romero fue diferente, ya que tendió a estabilizarse sobre los 250 mg de adición.

La inclusión de 750 mg de boldo provoca reducciones de 73% en metano, a las 4 horas, comparado con la adición de ají de color que en la misma dosis provoca reducciones de 51% y el romero con 44%.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten concluir lo siguiente:

- La adición de romero genera una significativa reducción de metano.
- La adición de ají de color genera una significativa reducción de metano.
- La adición de boldo genera una significativa reducción de metano.
- El efecto de la disminución del metano es mayor al ir incrementando las dosis.
- De los tres fitoaditivos para las diferentes inclusiones, es el boldo el que provoca los mayores efectos.

BIBLIOGRAFÍA

- Bamikole, M.A. 2015. Exploring tropical medicinal plants for reducing methane emission from ruminant: the potential of some essential oils from Nigeria. (Chap.9, pp.185-206). In: Proceedings of the International Conference on Forages in Warm Climates. (1st June 1-3, 2015 Lavras, Brazil). International Conference on Forages in Warm Climates. A.R. Evangelista. C.L.S. Avila. D.R. Casagrande. M.A.S. Lara. (eds.). Lavras, Brazil: University of Lavras. 393p.
- Benchaar, C.; S. Calsamiglia.; A.V. Chaves.; G.R. Fraser.; D. Colombatto.; T.A. Mcallister ., et al.& . 2008. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal feed science and technology*, 145(1): 209-228.
- Bittner, M.; M. Aguilera.; V. Hernández.; C. Arbert.; J. Becerra and M. Casanueva. (2009). Fungistatic activity of essential oils extracted from *Peumus boldus* Mol., *Laureliopsis philippiana* (Looser) Schodde and *Laurelia sempervirens* (Ruiz & Pav.) Tul. (Chilean Monimiaceae). *Chilean journal of agricultural research*, 69(1): 30-37.
- Calandra, P.; D. Ortiz.; G. Pozo y B. Noziglia. 2014. Manual para la redacción de referencias bibliográficas. G. Reginato (Ed). Santiago, Chile: Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. 72p.
- Calsamiglia, S.; M. Busquet.; P.W Cardozo.; L. Castillejos and A. Ferret. 2007. Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, (90):2580–2595.
- Carmona, J.C.; D.M. Bolívar.; y Giraldo, L.A. 2005. El gas metano en la producción ganadera y alternativas para medir sus emisiones y aminorar su impacto ambiental y productivo. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 18(1): 49- 63.
- Castro, M. y F. Rodríguez. 2005, ene-jun. Levaduras: probióticos y prebióticos que mejoran la producción animal. *Revista Corpoica*, 6 (1): 26-38.
- Cedrón, J.C. 2013. La capsaicina. *Revista de Química PUCP*. 27(1-2): 7-8
- Cobellis, G.; A. Petrozzi.; C. Forte.; G. Acuti.; M. Orrù.; M. Marcotullio.; A. Aquino et al. 2015. Evaluation of the effects of mitigation on methane and ammonia production by using *Origanum vulgare* L. and *Rosmarinus officinalis* L. Essential oils on in vitro rumen fermentation systems. *Sustainability*, (7): 12856-12869.

Figuroa, M y S. Gómez. 2007. Los sumideros naturales de CO₂: Una estrategia sostenible entre el cambio climático y el protocolo de Kioto desde las perspectivas urbana y territorial. Sevilla, España: Muñoz Moya editores extremeños, Universidad de Sevilla; Secretariado de Publicaciones. 221p. (Serie Ciencias N° 77).

Gerber, P.J.; H. Steinfeld.; T. Wassenaar.; V. Castel.; M. Rosales Y C. de Haan. 2009. La larga sombra del ganado: problemas ambientales y opciones. Roma, Italia. Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura. (FAO). 465p.

González, V.; y J. R. Tarragó. 1971. La digestibilidad “in vitro” como método para determinar el valor nutritivo de los forrajes. *Pastos: Revista de la sociedad española para el estudio de los pastos*, 1 (1):110-119.

Jahani-Azizabadi, H.; M Danesh-Mesgaran.; A. R. Vakili, and A. R. Heravi-Moussavi. 2009. Screening the Activity of Medicinal Plants or Spices on In vitro Ruminant Methane Production. *Journal of Animal Science*, 87 (E- suppl.2) and *Journal of Dairy Science*, 92 (E-suppl 1): 277-278.

Orellana, C.; H. Manterola y D. Cerda. 2014. Efecto de adicionar pimentón (*Capsicum annuum*) o hojas de boldo (*Peumus boldus*) sobre la emisión de metano en condiciones *in vitro*. *Revista Argentina de Producción Animal*, 34 (Supl. 1): 532

Orellana, C.; F. J. Giraldez.; H. Manterola.; S. López y M.L Tejado. 2014. Estudio de la fermentación ruminal de 9 fitoaditivos como reductores de la generación de metano. *Revista Argentina de Producción Animal*, 34 (Supl. 1): 546.

Ouattara, B.; R. E. Simard.; R. A. Holley.; G. J.-P. Piette and A. Bégin. 1997. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *International Journal of Food Microbiology*, (37):155–162.

Pinski, B.; M. Günal and A. AbuGhazaleh. 2015 .The effects of essential oil and condensed tannin on fermentation and methane production under *in vitro* conditions. *Animal Production Science*.

Polin, L.; A. Muro y L. Díaz. 2014. Aceites esenciales modificadores de perfiles de fermentación ruminal y mitigación de metano en rumiantes. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 5(1):25-47.

Roy, D.; S.K Tomar.; S K. Sirohi.; V. Kumar and M. Kumar. 2014. Efficacy of different essential oils in modulating rumen fermentation *in vitro* using buffalo rumen liquor. *Veterinary World*, 7(4): 213-218.

Sirohi, S. K.; N. Goel and P. Pandey. 2012. Efficacy of different methanolic plant extracts on anti-methanogenesis, rumen fermentation and gas production kinetics *in vitro*. *Open Veterinary Journal*., 2(1): 72-77.

Smith-Palmer, A.; J. Stewart and L. Fyfe. 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in applied microbiology*, 26(2): 118-122.

Speisky, H and B. K. Cassels. 1994. Boldo and Boldine: an emerging case of a: natural drug development. *Pharmacological research*, 29(1):1-12.

Tekelli, A.; L. Çelik and H.R. Kutlu. 2007. Plant Extracts; a new Rumen Moderator in Ruminant Diets. *Journal of Tekirdag Agricultural Faculty*, 4(1): 71-79.

Vélez-Terranova, M.; R. Campos Gaona y H. Sánchez-Guerrero. 2014. Uso de metabolitos secundarios de las plantas para reducir la metanogénesis ruminal. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 17 (3):489-499.

Viuda, M.; Y. Ruiz.; J. Fernández and J. Pérez. 2007. Chemical composition of the essential oils obtained from some spices widely used in mediterranean region. *Acta Chimica. Slovenica*, (54): 921–926.

ANEXO Y APÉNDICE

Cuadro 6: Peso de sustrato para tubos de testigo y romero

Tratamiento	Repetición	Heno alfalfa(g)	Afrecho soya(g)	Peso aditivo (g)
testigo	1	0,5016	0,5022	
	2	0,5020	0,5015	
	3	0,5001	0,5043	
	4	0,5003	0,5022	
	5	0,5013	0,5017	
romero (0,125)	1	0,5010	0,5095	0,1253
romero (0,125)	2	0,5001	0,5060	0,1256
romero (0,125)	3	0,5032	0,5014	0,1251
romero (0,125)	4	0,5017	0,5001	0,1252
romero (0,125)	5	0,5002	0,5027	0,1251
romero (0,250)	1	0,5040	0,5055	0,2502
romero (0,250)	2	0,5034	0,5017	0,2507
romero (0,250)	3	0,5023	0,5005	0,2506
romero (0,250)	4	0,5015	0,5019	0,2508
romero (0,250)	5	0,5001	0,5023	0,2547
romero (0,500)	1	0,5040	0,5042	0,5037
romero (0,500)	2	0,5011	0,5026	0,5015
romero (0,500)	3	0,5037	0,5082	0,5001
romero (0,500)	4	0,5019	0,5000	0,5055
romero (0,500)	5	0,5008	0,5010	0,5063
romero (0,750)	1	0,5037	0,5076	0,7501
romero (0,750)	2	0,5000	0,5023	0,7501
romero (0,750)	3	0,5005	0,5035	0,7505
romero (0,750)	4	0,5012	0,5086	0,7501
romero (0,750)	5	0,5005	0,5076	0,7587

Cuadro 7: Peso de sustratos para tubo de ají de color

Tratamiento	Repetición	Heno alfalfa(g)	Afrecho soya(g)	Peso aditivo (g)
ají (0,125)	1	0,5003	0,5069	0,1255
ají (0,125)	2	0,5022	0,5027	0,1257
ají (0,125)	3	0,5030	0,5001	0,1254
ají (0,125)	4	0,5005	0,5073	0,1256
ají (0,125)	5	0,5030	0,5032	0,1263
ají (0,250)	1	0,5023	0,5043	0,2510
ají (0,250)	2	0,5030	0,5070	0,2563
ají (0,250)	3	0,5005	0,5074	0,2521
ají (0,250)	4	0,5034	0,5054	0,2512
ají (0,250)	5	0,5017	0,5007	0,2596
ají (0,500)	1	0,5005	0,5002	0,5026
ají (0,500)	2	0,5010	0,5017	0,5007
ají (0,500)	3	0,5020	0,5011	0,5007
ají (0,500)	4	0,5028	0,5015	0,5018
ají (0,500)	5	0,5032	0,5072	0,5004
ají (0,750)	1	0,5008	0,5084	0,7526
ají (0,750)	2	0,5026	0,5050	0,7572
ají (0,750)	3	0,5034	0,5074	0,7551
ají (0,750)	4	0,5002	0,5001	0,7575
ají (0,750)	5	0,5024	0,5026	0,7579

Cuadro 8: Peso de sustratos para tubo de boldo

Tratamiento	Repetición	Heno alfalfa(g)	Afrecho soya(g)	Peso aditivo(g)
boldo (0,125)	1	0,5030	0,5062	0,1253
boldo (0,125)	2	0,5017	0,5007	0,1256
boldo (0,125)	3	0,5026	0,5051	0,1258
boldo (0,125)	4	0,5003	0,5062	0,1250
boldo (0,125)	5	0,5017	0,5036	0,1253
boldo (0,250)	1	0,5040	0,5042	0,2517
boldo (0,250)	2	0,5028	0,5003	0,2589
boldo (0,250)	3	0,5018	0,5046	0,2513
boldo (0,250)	4	0,5037	0,5042	0,2592
boldo (0,250)	5	0,5003	0,5015	0,2568
boldo (0,500)	1	0,5007	0,5055	0,5011
boldo (0,500)	2	0,5011	0,5054	0,5009
boldo (0,500)	3	0,5022	0,5078	0,5021
boldo (0,500)	4	0,5015	0,5036	0,5028
boldo (0,500)	5	0,5006	0,5026	0,5022
boldo (0,750)	1	0,5073	0,5014	0,7564
boldo (0,750)	2	0,5033	0,5068	0,7583
boldo (0,750)	3	0,5040	0,5054	0,7521
boldo (0,750)	4	0,5022	0,5015	0,7504
boldo (0,750)	5	0,5020	0,5029	0,7564