

## Effects of Kikuyu grass (*Pennisetum clandestinum*) age and different forage: concentrate ratios on methanogenesis

### Efecto de la edad del pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) y la relación forraje: concentrado sobre la metanogénesis

John Ramírez,<sup>1</sup> M.Sc, Sandra Posada O,<sup>1\*</sup> Ph.D, Ricardo Noguera,<sup>1</sup> Ph.D.

<sup>1</sup>Universidad de Antioquia, Facultad de Ciencias Agrarias, Grupo de Investigación en Ciencias Agrarias-GRICA, AA 1226, Medellín, Colombia. \*Correspondencia: slposada@gmail.com

Received: September 2014; Accepted: February 2015.

#### ABSTRACT

**Objective.** To evaluate the effect of Kikuyu grass (*Pennisetum clandestinum*) harvested at two different ages and three forage: concentrate supplement ratios (F/C) on methane (CH<sub>4</sub>) production, dry matter digestibility (DMD), and fermentation profile using the *in vitro* gas production technique. **Materials and methods.** six treatments, resulting from the combination of pasture age (30 or 60 days) and F/C (100/0, 75/25, or 50/50) were evaluated using a 2x3 factorial design. The response variables were measured 6, 12, 24 and 48 hours after incubation. A repeated-measure over time design was used to analyze the data, and differences between means were determined with the LSMEANS procedure of SAS. **Results.** the youngest grass (30 days) was more digestible, produced less CH<sub>4</sub> per gram of digestible dry matter (d<sub>4</sub>DM) and more total volatile fatty acids (VFA) compared to the oldest grass (60 days; p <0.05). Reductions of the F/C ratio increased DMD and CH<sub>4</sub> production per gram of d<sub>4</sub>DM (p<0.05) but had no significant effect on VFA concentration (p>0.05). **Conclusions.** under *in vitro* conditions and pH close to neutrality, the older grass reduces DMD and increases CH<sub>4</sub> production per gram of d<sub>4</sub>DM, while a F/C reduction increases DMD and CH<sub>4</sub> production per gram of d<sub>4</sub>DM, which differs with reports conducted *in vivo*.

**Key words:** Carbohydrates, *in vitro* digestibility, grass maturity, methane production (Sources: CAB, USDA).

#### RESUMEN

**Objetivo.** Evaluar el efecto de la edad del pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) y de la relación forraje/suplemento (F/S) sobre la producción de metano (CH<sub>4</sub>), la digestibilidad de la materia seca (DMS) y el perfil de fermentación mediante la técnica *in vitro* de producción de gas. **Materiales y métodos.** Seis tratamientos, resultantes de la combinación de los factores edad del pasto (30 y 60 días) y relación F/S (100/0, 75/25 y 50/50), fueron evaluados bajo un diseño factorial 2x3. Las variables respuesta se midieron a las 6, 12, 24 y 48 horas de incubación. Para el análisis de los datos se empleó un diseño de medidas repetidas en el tiempo y las diferencias entre medias se determinaron con el procedimiento LSMEANS de SAS. **Resultados.** El pasto de menor edad (30 días) fue más digestible, produjo menos CH<sub>4</sub> por gramo de materia seca digestible (MS<sub>d</sub>) y más ácidos grasos volátiles totales (AGV) que el pasto de mayor edad (60 días, p<0.05). La reducción en la relación F/S aumentó la DMS y la producción de CH<sub>4</sub> por gramo de MS<sub>d</sub> (p<0.05), pero no tuvo efecto estadístico

sobre la concentración de AGV ( $p > 0.05$ ). **Conclusiones.** Bajo condiciones *in vitro*, con pH próximo a la neutralidad, la mayor edad del pasto reduce la DMS y aumenta la producción de  $\text{CH}_4$  por gramo de  $\text{MS}_d$ , mientras que la reducción en la relación F/S aumenta la DMS y la producción de  $\text{CH}_4$  por gramo de  $\text{MS}_d$ , último hallazgo que contrasta con los reportes *in vivo*.

**Palabras clave:** Carbohidratos, digestibilidad *in vitro*, estado de madurez, producción de metano (Fuentes: CAB, USDA).

## INTRODUCTION

Methane ( $\text{CH}_4$ ) is one of the main products of ruminal fermentation. It is considered a greenhouse gas (GHG) and represents between 2 and 15% of the energy consumed by ruminants (1).  $\text{CH}_4$  is produced in the rumen by a group of microorganisms of the *Archaea* domain, which use hydrogen ( $\text{H}_2$ ) to reduce carbon dioxide ( $\text{CO}_2$ ) to  $\text{CH}_4$ , maintaining a low  $\text{H}_2$  pressure that favors fermentation processes (2).

Most dairy farms in Colombia are based on Kikuyu grass (*Pennisetum clandestinum*) as the main grazing grass for the animals. Average levels of neutral detergent fiber (NDF), nonstructural carbohydrates (NSC) and crude protein (CP) in Kikuyu are 58.1, 13.4, and 20.5%, respectively (on a dry matter bases (DM)) and fluctuate depending on the agronomic management (3). Because of its composition, Kikuyu grass presents nutritional constraints affecting milk yield and quality. Thus, supplements are commonly offered to improve the availability of NSC and energy in the rumen.

Feeding concentrate supplements to grazing ruminants is associated with a reduction of  $\text{CH}_4$  emissions. A change in the relationship feed: concentrate (DM bases) from 47: 53 to 68: 32 increased  $\text{CH}_4$  emissions from 538 to 648 g/cow/day (4). Different carbohydrates change the volatile fatty acids (VFA) profile and the production of  $\text{CH}_4$ . Cellulose and starch degradation leads to glucose formation, which can be fermented in different pathways resulting in varying amounts of  $\text{H}_2$ . The production of  $\text{CH}_4$  per unit of food digested depends on the amount of  $\text{H}_2$  formed, according to the stoichiometric ratio  $4\text{H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$ . The formation of acetate and butyrate results in 1 and 0.5 moles of  $\text{CH}_4$  per mole of fermented glucose, respectively. On the other hand, propionate formation requires a net input of reduced equivalents, decreasing  $\text{CH}_4$  production. Fiber fermentation results in the preferential production of acetate, while feeding NSC increases the proportion of propionate (2). The objective of this study was to determine the effect of Kikuyu grass (*Pennisetum clandestinum*) harvested at two different ages and three forage: concentrate

## INTRODUCCIÓN

El metano ( $\text{CH}_4$ ) es uno de los principales productos de la fermentación ruminal y además de contribuir a las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) representa entre 2 y 15% de la energía consumida por el rumiante (1). El  $\text{CH}_4$  es producido en el rumen por un grupo particular de microorganismos pertenecientes al dominio *Archaea*, los cuales usan hidrógeno ( $\text{H}_2$ ) para reducir el dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) a  $\text{CH}_4$ , manteniendo una presión baja de  $\text{H}_2$  que favorece la fermentación de los alimentos (2).

En la mayoría de los sistemas especializados de producción lechera en Colombia se utiliza el pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) como base forrajera para la alimentación de los animales. Correa et al (3), reportaron que el pasto kikuyo posee contenidos medios de fibra detergente neutra (FDN), carbohidratos no estructurales (CNE) y proteína bruta (PB) de 58.1, 13.4 y 20.5% de la materia seca (MS), respectivamente, valores que fluctúan en función del manejo agronómico. Esta composición química hace que el pasto kikuyo presente limitaciones nutricionales que afectan la producción y calidad de la leche, siendo necesaria la utilización de suplementos que mejoren la disponibilidad de CNE y de energía en el rumen.

La utilización de suplementos concentrados en las dietas para rumiantes, las cuales están basadas en forrajes, está asociada con reducción en la emisión de  $\text{CH}_4$ , lo cual fue evidenciado en el trabajo de Aguerre et al (4), donde el cambio en la relación forraje:concentrado (con base en la materia seca) de 47:53 a 68:32 incrementó la emisión de  $\text{CH}_4$  de 538 a 648 g/vaca/día. Diferentes tipos de carbohidratos modifican el perfil de ácidos grasos volátiles (AGV) y, por tanto, la producción de  $\text{CH}_4$ . La degradación de la celulosa y el almidón conduce a la formación de glucosa, la cual se fermenta por diferentes vías, resultando en variable cantidad de  $\text{H}_2$ . La producción de  $\text{CH}_4$  por unidad de alimento digerido depende de la cantidad de  $\text{H}_2$  formado, con base en la relación estequiométrica  $4\text{H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$ . La formación de acetato y butirato resulta en la producción de 1 y 0.5 moles de  $\text{CH}_4$  por mol de glucosa fermentada, respectivamente; mientras que la formación de propionato requiere un ingreso neto de equivalentes reducidos, disminuyendo la producción de  $\text{CH}_4$ . La fermentación de la fibra resulta en la producción preferente de acetato,

supplement ratios (F/C) on methane (CH<sub>4</sub>) production, dry matter digestibility (DMD), and fermentation profile using the *in vitro* gas production technique.

## MATERIALS AND METHODS

**Location.** The study was conducted at the Nutrition and Animal Feeding Laboratory facilities of Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

**Substrates and chemical analysis.** The substrates tested were Kikuyu grass (*Pennisetum clandestinum*) and a commercial concentrate supplement formulated for dairy cows. The grass was harvested at Betania farm, owned by Solla SA Company, during vegetative stage by cutting it 10 cm above the ground at 30 and 60 days of age. This farm is located in Santa Rosa de Osos municipality (Ant., Colombia) at 2460 m.a.s.l., with 18°C average temperature (range: 4 to 27°C), 70% relative humidity and 2400 mm average annual precipitation, corresponding to a lower montane wet forest (LMWF). The pasture was managed under a rotational grazing system with chemical fertilization (190, 54, 16, and 9 kg N, P, K, and S/ha/year).

Grass samples were dried in forced air oven at 65°C for 48 hours. Grass and supplement samples were ground to 1 mm for chemical analysis including DM, CP, ether extract (EE), ash (5), NDF (6), acid detergent fiber (ADF), acid detergent lignin (ADL) (7) and gross energy (GE). The GE was assessed in an adiabatic bomb calorimeter (IKA C5000, Rhys International Ltd., United Kingdom). NSC values were obtained by the equation,  $NSC = 100 - (\%CP + \%EE + \%Ash + \%NDF)$  (8). The chemical description of substrates is presented in table 1.

**Table 1.** Chemical composition of Kikuyu grass (*Pennisetum clandestinum*) concentrate supplement used in the study.

Fraction (% DM)	Kikuyo (30 d)	Kikuyo (60 d)	Supplement
CP	25.4	17.0	16.1
EE	4.1	3.2	3.0
Ash	9.0	12.0	5.1
NDF	53.8	61.6	11.1
ADF	29.7	34.0	6.9
ADL	5.4	6.5	1.3
NSC	7.7	6.2	64.7
NSC/NDF	0.14	0.10	5.83
GE Mcal/kg DM	4.4	4.1	4.3

en tanto la alimentación con CNE aumenta la proporción de propionato (2). El objetivo del presente trabajo fue determinar como la producción de CH<sub>4</sub>, la digestibilidad de la MS (DMS) y el perfil de fermentación son afectados por la edad del pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) y la relación forraje:suplemento (F/S).

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Localización.** Las pruebas se realizaron en el Laboratorio de Investigación en Nutrición y Alimentación Animal de la Universidad de Antioquia, Medellín-Colombia.

**Sustratos incubados y análisis químico.** Los sustratos fueron pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*), y un suplemento comercial para vacas en producción. El pasto fue cosechado en estadio vegetativo, a 10 cm sobre el nivel del suelo, a los 30 y 60 días de edad en la hacienda Betania, propiedad de la empresa SOLLA, S.A. Esta hacienda se encuentra ubicada en el municipio de Santa Rosa de Osos (Ant., Colombia), a 2460 msnm, presenta temperatura promedio de 18°C, variando entre 4°C y 27°C, humedad relativa correspondiente al 70% y precipitación media anual de 2400 mm, características correspondientes a un bosque muy húmedo montano bajo (bmh-MB). El pasto fue manejado bajo un sistema de pastoreo rotacional con fertilización química (190, 54,16 y 9 kg de N, P, K y S/Ha/año).

Las muestras de pasto fueron secadas en estufa de ventilación forzada a 65°C por 48 horas. Estas muestras y las de suplemento fueron molidas a 1 mm para su análisis químico, que incluyó MS, PB, extracto etéreo (EE), cenizas (Ce) (5), FDN (6), fibra detergente ácida (FDA), lignina detergente ácida (LDA) (7) y energía bruta (EB), última determinación realizada en bomba calorimétrica adiabática (IKA C5000, Rhys International, Ltd., United Kingdom). Los valores de CNE fueron obtenidos por la ecuación,  $CNE = 100 - (\%PB + \%EE + \%Ce + \%FDN)$  (8). La descripción química de los sustratos se presenta en la tabla 1.

**Tratamientos experimentales.** Se evaluaron seis tratamientos, resultantes de la combinación de los factores edad del pasto (30 y 60 días) y nivel de inclusión de suplemento concentrado (0, 25 y 50%), en un diseño factorial 2x3. Los tratamientos fueron: K30-100/0, K30-75/25, K30-50/50, K60-100/0, K60-75/25 y K60-50/50. K30 y K60 corresponden a la edad del pasto kikuyo y 100/0, 75/25 y 50/50 a la relación F/S (con base en la materia seca). Cada tratamiento contó con tres repeticiones, correspondientes a tres fuentes de inóculo ruminal, cada uno obtenido de un animal diferente.

**Experimental treatments.** Six treatments, resulting from the combination of pasture age (30 to 60 days) and inclusion level of concentrate supplement (0, 25 and 50%) were evaluated in a 2x3 factorial design. The treatments were: K30-100/0, K30-75/25, K30-50/50, K60-100/0, K60-75/25, and K60-50/50. Descriptors K30 and K60 correspond to Kikuyu age, while 100/0, 75/25 and 50/50 to the F/C ratio (DM basis). Treatments were replicated three times, corresponding to three sources of ruminal inoculum, each obtained from a different animal.

**Gas production technique.** This technique was conducted following protocols by Posada et al (9). Grass and concentrate supplement were ground to 1 mm and added (0.5 g) to each flask (100 ml) according to the percentages set for each treatment.

The inocula were obtained from three Holstein Friesian adult cows from La Montaña farm, owned by Universidad de Antioquia (San Pedro de los Milagros, Ant., Colombia). The cows were grazing on 42 days old Kikuyu and were provided mineralized salt and water *ad libitum*. The inocula were collected in the morning (6:00 AM) and transported in thermos preheated with 40°C water to the laboratory, where they were filtered through a cotton mesh, gassed with CO<sub>2</sub> and kept in a warm water bath during inoculation.

Preparation of the buffer solution followed recommendations by McDougall (10), using a 9/1 (45/5 ml/ml) buffer/inoculum ratio and (1M) citric acid was added to the mixture to obtain pH 6.5 (11). The flasks were sealed with rubber stoppers and stored in a forced-air oven at 39 °C throughout the fermentation process.

**Total gas and CH<sub>4</sub>.** Total gas and CH<sub>4</sub> production was determined at 6, 12, 24 and 48 h of incubation. Gas pressure generated in the incubation flasks was measured with a digital transducer (Ashcroft 2089QG - Precision Digital Test Gauges, Stratford, CT, USA) and the PSI readings were converted to volume (ml) using the equation

$$Y = -0.1833 + 0.0598 X^2 \quad (9).$$

After reading the pressure, the generated gas was removed from the flasks using a plastic syringe and then stored in plastic bags for later CH<sub>4</sub> analysis. For this purpose, gas samples (100 µl) were taken with a gas-tight syringe and manually injected into a gas chromatograph (Thermo TRACE GC Ultra™, Thermo Scientific, USA) equipped with a flame

**Técnica de producción de gases.** La técnica de producción de gases fue realizada siguiendo los protocolos de Posada et al (9). En cada frasco (de 100 ml) se adicionó 0.5 g de sustrato molido a 1 mm (pasto y/o suplemento), de acuerdo con la participación porcentual de cada alimento en los tratamientos experimentales.

Los inóculos fueron obtenidos de tres vacas Holstein Friesian adultas pertenecientes a la hacienda La Montaña, propiedad de la Universidad de Antioquia (San Pedro de los Milagros, Ant., Colombia). La dieta de los animales donadores consistió de pasto kikuyu de 42 días de edad, sal mineralizada y agua a voluntad. Los inóculos se colectaron en la mañana (6:00 am) y su transporte hasta el laboratorio se realizó en termos precalentados con agua a 40°C. En el laboratorio, los inóculos fueron filtrados a través de una malla de algodón, gaseados con CO<sub>2</sub> y conservados en baño maría durante el proceso de inoculación.

La solución tampón (buffer) se preparó de acuerdo con las recomendaciones de McDougall (10), se utilizó una relación buffer/inóculo de 9/1 (45/5 ml/ml) y la mezcla fue acidificada con ácido cítrico (1M) hasta obtener pH 6.5 (11). Los frascos fueron cerrados con tapones de caucho y almacenados en estufa de ventilación forzada a 39°C durante todo el proceso fermentativo.

**Determinación de la producción de gas y de CH<sub>4</sub>.** La producción total de gas y de CH<sub>4</sub> fue determinada luego de 6, 12, 24 y 48 h de incubación. La presión generada en los frascos de incubación se midió con un transductor digital (Ashcroft 2089QG - Precision Digital Test Gauges, USA) y el valor obtenido (psi) fue transformado a volumen (ml) con la ecuación.

$$Y = -0.1833 + 5.2098X + 0.0598X^2 \quad (9).$$

Luego de la lectura de presión, el gas generado fue retirado de los frascos usando jeringa plástica y almacenado en bolsas plásticas para posterior análisis de CH<sub>4</sub>. Para tal efecto, muestras de 100 µl de gas fueron tomadas con una jeringa hermética para gas e inyectadas manualmente en un cromatógrafo de gases (Thermo TRACE GC Ultra™, Thermo Scientific, USA) equipado con un detector de ionización de llama (FID). Las condiciones cromatográficas correspondieron a una columna apolar de 30 m, 0.32 mm y 0.25 µm, temperatura del puerto de inyección 200°C, modo de inyección split (división) 50:1, temperatura del detector 250°C, temperatura del horno 30°C (5 min) hasta alcanzar 200°C (30°C/min) y helio como gas de arrastre (1.0 ml/min). Los datos de concentración de metano fueron procesados de acuerdo con la descripción de López y Newbold (12). La producción de CH<sub>4</sub> (ml) fue calculada a partir del volumen total de gas (ml) y la concentración de CH<sub>4</sub>. La producción de gas y de CH<sub>4</sub> (ml) se expresó por gramo de materia seca incubada (MS<sub>i</sub>) y por gramo de materia seca

ionization detector (FID). The chromatographic conditions corresponded to a 30 m nonpolar column, 0.32 mm and 0.25  $\mu\text{m}$ , 200°C injection port temperature, 50:1 split injection mode, 250°C detector temperature, 30°C (5 min) up to 200°C (30°C/min) oven temperature, and helium as a carrier gas (1.0 ml/min).  $\text{CH}_4$  data were processed according to Lopez and Newbold (12).  $\text{CH}_4$  production (ml) was calculated from total gas volume (ml) and  $\text{CH}_4$  concentration. Gas and  $\text{CH}_4$  production (ml) was expressed per gram of incubated dry matter ( $_i\text{DM}$ ) and per gram of digestible dry matter ( $_d\text{DM}$ ).  $\text{CH}_4$  production was also expressed as a percentage of the incubated GE ( $_i\text{GE}$ ) and incubated digestible energy ( $_d\text{DE}$ ), giving  $\text{CH}_4$  a caloric value of 9.45 kcal/L (13).

**Dry matter digestibility.** DMD was determined gravimetrically at the times of gas pressure readings by filtering the incubation flasks contents using glass crucibles (porosity 1, 100-160  $\mu\text{m}$ ) and a vacuum pump. The residues were dried in the crucibles at 60°C for 48 hours in a forced-air oven and weighed.

**Fermentation profile and pH.** The pH and concentration of acetic, propionic and butyric acids were determined in the liquid after filtration. This liquid was preserved by adding sulfuric acid (98% v/v) until pH 2 was reached. The pH was determined with digital pH meter (Handylab pH 1, Schott® Instruments, SI Analytics GmbH, Germany) before acidification.

To determine VFA, liquid samples (1  $\mu\text{l}$ ) were injected into a gas chromatograph (Thermo TRACE GC Ultra™, Thermo Scientific, USA) equipped with a 30 m, 0.32 mm and 0.25 microns column. Temperatures were 300°C (FID), 210°C (inlet), and 68°C (1 min), ramp 10°C/min until reaching 140°C (1 min), ramp 40°C/min until reaching 200°C (1 min) (oven). The mode of injection was split and helium was used as a carrier gas (2.5 ml/min).

**Statistical analysis.** A repeated measures analysis was performed using PROC MIXED of SAS (14). The fixed effects of the model were grass, F/C, and incubation time; the random effect was the ruminal inoculum. Treatment means were compared using PROC LSMEANS of SAS (14).

## RESULTS

Table 2 shows the chemical composition of the treatments. The 30 days-old grass had higher CP and NSC content, but lower NDF, ADF and ADL compared to 60 days. The NSC/NDF ratio increased as concentrate increased in the mix.

digestible ( $\text{MS}_d$ ). La producción de  $\text{CH}_4$  fue también expresada como porcentaje de la EB incubada (EB<sub>i</sub>) y energía digestible incubada (ED<sub>i</sub>), asignando al  $\text{CH}_4$  un valor calórico de 9.45 Kcal/L (13).

**Determinación de la digestibilidad de la materia seca.** En los horarios definidos para las lecturas de presión de gas, se determinó la DMS por gravimetría. Para esto, el contenido de los frascos de incubación se filtró utilizando crisoles de vidrio (porosidad 1, 100 – 160  $\mu\text{m}$ ) con ayuda de bomba de vacío. El conjunto crisol-residuo fue secado a 60°C durante 48 horas en estufa de ventilación forzada y posteriormente pesado.

**Determinación del perfil de fermentación y pH.** El valor de pH y la concentración de los ácidos acético, propiónico y butírico se determinaron en el líquido resultante de la filtración. Este líquido se preservó mediante la adición de ácido sulfúrico (98% v/v) hasta alcanzar un pH 2. Antes de la acidificación, se determinó el pH con pH-metro digital (Handylab pH 1, Schott® Instruments, SI Analytics GmbH, Germany).

Para la determinación de AGV, muestras de 1  $\mu\text{l}$  de líquido se inyectaron en un cromatógrafo de gases (Thermo TRACE GC Ultra™, Thermo Scientific, USA) equipado con una columna de 30 m, 0.32 mm y 0.25  $\mu\text{m}$ . La temperaturas fueron 300°C (detector FID), 210°C (inyector) y 68°C (1 min), rampa de 10°C/min hasta 140°C (1 min), rampa de 40°C/min hasta 200°C (1 min) (horno). El modo de inyección fue split y como gas de arrastre se utilizó helio (2.5 ml/min).

**Análisis estadístico.** Se realizó un análisis de medidas repetidas en el tiempo a través de PROC MIXED de SAS (14). Los efectos fijos en el modelo correspondieron a la edad del pasto, la relación F/S y el tiempo de incubación; el efecto aleatorio estuvo representado por el inóculo ruminal. Las medias de tratamientos fueron comparadas con el procedimiento PROC LSMEANS de SAS (14).

## RESULTADOS

En la tabla 2 se presenta la composición química de los diferentes tratamientos. Aquellos que incluyeron el pasto de 30 días de edad, respecto al de 60 días, presentaron mayor contenido de PB y CNE y menor porcentaje de FDN, FDA y LDA. A medida que se incrementó la participación de suplemento en la mezcla, aumentó la relación CNE/FDN.

En las tablas 3 y 4 se observa que la edad del pasto afectó significativamente ( $p < 0.05$ ) la DMS, la producción acumulada de gas y de  $\text{CH}_4$  por gramo de  $\text{MS}_d$  y el porcentaje de ED

**Table 2.** Chemical composition of kikuyo grass (*Pennisetum clandestinum*) aged 30 or 60 days and mixed with a concentrate supplement<sup>1</sup>.

Fraction (% DM)	K30			K60		
	100/0	75/25	50/50	100/0	75/25	50/50
CP	25.4	23.1	20.6	17.0	16.7	16.5
EE	4.1	3.8	3.6	3.2	3.2	3.1
Ash	9.0	8.0	7.1	12.0	10.3	8.6
NDF	53.8	43.1	32.5	61.6	49.0	36.4
ADF	29.7	24.0	18.3	34.0	27.2	20.5
ADL	5.4	4.4	3.4	6.5	5.2	3.9
NSC	7.7	22.0	36.2	6.2	20.8	35.4
NSC/NDF	0.14	0.51	1.11	0.10	0.42	0.97
GE Mcal/kg DM	4.4	4.4	4.4	4.1	4.2	4.2

<sup>1</sup>Ingredients: Corn, malt germ, wheat bran, rice flour, sunflower meal, soybean meal, molasses, salt, premix, and calcium carbonate.

Tables 3 and 4 show that grass age significantly ( $p < 0.05$ ) affected DMD, cumulative production of gas and CH<sub>4</sub> per gram of <sub>d</sub>DM, and the percentage of <sub>i</sub>DE transformed into CH<sub>4</sub>. Following 48 hours of incubation, the 30 days old grass showed greater DMD (68.97 vs. 65.30%), decreased production of gas (463.56 vs. 499.27 ml) and CH<sub>4</sub> (101.37 ml vs. 109.97) per gram of <sub>d</sub>DM, and lower production of CH<sub>4</sub> as a percentage of <sub>i</sub>DE (22.83 vs. 24.70%) compared with the 60 days grass.

The F/C ratio significantly affected all variables ( $p < 0.05$ ). The F/C presented a growing trend as grass was reduced and concentrate increased between 0 and 48 hours of incubation. The average

incubada que se transformó en CH<sub>4</sub>. Al término de las 48 horas de incubación, el pasto de 30 días de edad, respecto el de 60 días, presentó mayor DMS (68.97 vs. 65.30%), menor producción de gas (463.56 vs. 499.27 ml) y de CH<sub>4</sub> (101.37 vs. 109.97 ml) por gramo de MS<sub>d</sub> y menor producción de CH<sub>4</sub> como porcentaje de la ED incubada (22.83 vs. 24.70%).

La relación F/S afectó significativamente ( $p < 0.05$ ) todas las variables analizadas. En el intervalo entre 0 y 48 horas de incubación el factor relación F/S presentó un comportamiento creciente en las medias conforme se redujo la participación de forraje y se aumentó la de suplemento. La producción media de CH<sub>4</sub> en este intervalo (con independencia de la edad del pasto) fue 57.40, 73.70 y 81.85 ml (por cada gramo de MS<sub>d</sub>) y 96.15, 107.15 y 113.70 ml (por cada gramo de MS<sub>d</sub>) para relaciones F/S de 100/0, 75/25 y 50/50, respectivamente. Para estas mismas proporciones, la producción media de CH<sub>4</sub> correspondió a 12.50, 16.50 y 18.80% de la EB incubada y, 21.30, 23.80 y 26.20% de la ED incubada, respectivamente. Al término de la incubación la DMS fue 60.55, 68.85 y 72.00% para las relaciones F/S 100/0, 75/25 y 50/50, respectivamente. El comportamiento expresado por estas variables también se observó cuando se contrastaron las medias correspondientes a las diferentes proporciones F/S al interior del factor edad del pasto (pasto de la misma edad).

En la tabla 5 se observa que la edad del pasto afectó significativamente ( $p < 0.05$ ) la concentración de acético, propiónico y butírico,

**Table 3.** Cumulative gas production (hours post-incubation) and dry matter digestibility of mixtures between 30 or 60 days old Kikuyu grass (*Pennisetum clandestinum*) with concentrate for three forage: concentrate proportions. Values in parentheses are standard deviations.

Variable	Interval (hours)	K30			K60		
		100/0	75/25	50/50	100/0	75/25	50/50
Gas production (ml/g <sub>d</sub> DM)	0-6	48.7 (2.3) <sup>b</sup>	61.4 (4.8) <sup>a</sup>	69.5 (2.5) <sup>a</sup>	52.9 (1.6) <sup>b</sup>	64.3 (1.4) <sup>ab</sup>	71.1 (4.1) <sup>a</sup>
	0-12	104.9 (8.2) <sup>c</sup>	126.1 (8.9) <sup>b</sup>	151.8 (6.5) <sup>a</sup>	99.7 (2.4) <sup>c</sup>	123.7 (4.1) <sup>b</sup>	145.9 (3.2) <sup>a</sup>
	0-24	197.8 (10.9) <sup>c</sup>	240.1 (5.7) <sup>b</sup>	275.4 (10) <sup>a</sup>	188.4 (8.1) <sup>c</sup>	232.1 (5) <sup>b</sup>	269.1 (5.5) <sup>a</sup>
	0-48	281 (14) <sup>c</sup>	325 (2.1) <sup>b</sup>	354.3 (6) <sup>a</sup>	283 (17.4) <sup>c</sup>	332.2 (9.8) <sup>b</sup>	358.2 (3.3) <sup>a</sup>
Dry matter digestibility (%)	0-6	20.5 (0.6)	23.0 (5.4)	25.6 (2,8)	20,3 (1,5)	20,9 (2,3)	25.7 (5.6)
	0-12	30.8 (1.7) <sup>ba</sup>	35,9 (1,8) <sup>ab</sup>	40.1 (1,4) <sup>a</sup>	25 (0,4) <sup>bb</sup>	31.4 (2,4) <sup>a</sup>	35.9 (2,5) <sup>a</sup>
	0-24	52.4 (5.9) <sup>ba</sup>	61.6 (4.9) <sup>aA</sup>	66 (3.9) <sup>a</sup>	42.2 (2.8) <sup>eb</sup>	52.5 (1.3) <sup>bb</sup>	61.9 (1.7) <sup>a</sup>
	0-48	65.9 (0.5) <sup>ba</sup>	69.1 (3.2) <sup>ab</sup>	71.9 (3.7) <sup>a</sup>	55.2 (7.2) <sup>bb</sup>	68.6 (1.2) <sup>a</sup>	72.1 (1.7) <sup>a</sup>
Gas production (ml/g <sub>d</sub> DM)	0-6	237.7 (18.1)	275.3 (54.6)	273.5 (29.2)	261.0 (12)	309.4 (30.3)	288.1 (78.1)
	0-12	342.4 (46.3) <sup>b</sup>	351.9 (34.3)	379.6 (26.6)	398.4 (15) <sup>a</sup>	394.9 (23.2)	408.0 (33.9)
	0-24	380.7 (48.8) <sup>b</sup>	390.9 (22.5)	417.6 (14.4)	447.4 (19.5) <sup>a</sup>	442.5 (20.4)	434.5 (9.6)
	0-48	426.1 (21.6) <sup>bb</sup>	471.1 (20.6) <sup>a</sup>	493.5 (21) <sup>a</sup>	516.5 (39.1) <sup>a</sup>	484.4 (21.2)	496.9 (16.1)

abc, lowercase letters in the same row indicate significant difference between means of different F/S ratio for a same grass age ( $p < 0.05$ ).

AB, capital letters in the same row indicate significant difference between grass age means for the same F/S ratio ( $p < 0.05$ ).

<sub>i</sub>DM= incubated dry matter; <sub>d</sub>DM = digestible dry matter.

**Table 4.** Cumulative production of methane (hours post-incubation) from mixtures of 30 and 60 days old Kikuyo grass (*Pennisetum clandestinum*) with concentrate supplement in three forage/supplement proportions. Values in parentheses are standard deviations.

Variable	Interval (hours)	K30			K60		
		100/0	75/25	50/50	100/0	75/25	50/50
CH <sub>4</sub> Production (ml/g DM <sub>i</sub> )	0-6	5.6 (0.5) <sup>b</sup>	8.3 (1.1) <sup>ab</sup>	10.4 (0.4) <sup>a</sup>	7.0 (1.6) <sup>b</sup>	10.1 (1.3) <sup>ab</sup>	11.4 (1.8) <sup>a</sup>
	0-12	18.9 (2.3) <sup>b</sup>	25.4 (1.2) <sup>a</sup>	29.0 (3.3) <sup>a</sup>	17.0 (1.8) <sup>c</sup>	25.9 (1.2) <sup>b</sup>	32.1 (2.6) <sup>a</sup>
	0-24	41.1 (1.9) <sup>c</sup>	53.9 (1.3) <sup>b</sup>	60.4 (2.8) <sup>ab</sup>	40.2 (3.4) <sup>c</sup>	54.3 (1.8) <sup>b</sup>	65.6 (2.4) <sup>aA</sup>
	0-48	57.8 (2.8) <sup>c</sup>	73.2 (1.6) <sup>b</sup>	79.2 (3.2) <sup>a</sup>	57.0 (3.5) <sup>c</sup>	74.2 (2) <sup>b</sup>	84.5 (4.6) <sup>a</sup>
CH <sub>4</sub> production (ml/g DM <sub>d</sub> )	0-6	27.5 (1.5) <sup>b</sup>	36.6 (3.3) <sup>ab</sup>	40.9 (3.7) <sup>a</sup>	34.0 (5.9) <sup>b</sup>	48.7 (7.2) <sup>a</sup>	46.2 (13.8) <sup>ab</sup>
	0-12	61.9 (11.2)	71.0 (6.6)	72.2 (7.3) <sup>B</sup>	68.0 (8) <sup>b</sup>	82.6 (2.5) <sup>a</sup>	89.5 (7.6) <sup>aA</sup>
	0-24	79.2 (9.9) <sup>B</sup>	87.8 (5.4) <sup>B</sup>	91.8 (8.1) <sup>B</sup>	95.3 (4.9) <sup>A</sup>	103.5 (5.6) <sup>A</sup>	105.9 (5.2) <sup>A</sup>
	0-48	87.6 (4.6) <sup>BB</sup>	106.2 (6.6) <sup>a</sup>	110.3 (7.9) <sup>a</sup>	104.7 (17.6) <sup>A</sup>	108.1 (3.7)	117.1 (6.3)
iGE transformed into CH <sub>4</sub> (%)	0-6	1.2 (0.1) <sup>b</sup>	1.9 (0.3) <sup>ab</sup>	2.4 (0.1) <sup>a</sup>	1.5 (0.4) <sup>b</sup>	2.3 (0.3) <sup>ab</sup>	2.6 (0.4) <sup>a</sup>
	0-12	4.1 (0.5) <sup>c</sup>	5.7 (0.3) <sup>b</sup>	6.7 (0.8) <sup>a</sup>	3.7 (0.4) <sup>c</sup>	5.8 (0.3) <sup>b</sup>	7.4 (0.6) <sup>a</sup>
	0-24	8.9 (0.4) <sup>c</sup>	12.0 (0.3) <sup>b</sup>	13.9 (0.6) <sup>ab</sup>	8.8 (0.7) <sup>c</sup>	12.2 (0.4) <sup>b</sup>	15.1 (0.6) <sup>aA</sup>
	0-48	12.6 (0.6) <sup>c</sup>	16.4 (0.4) <sup>b</sup>	18.2 (0.7) <sup>ab</sup>	12.4 (0.8) <sup>c</sup>	16.6 (0.4) <sup>b</sup>	19.4 (1.1) <sup>aA</sup>
iDE transformed into CH <sub>4</sub> (%)	0-6	5.8 (0.3)	8.2 (0.9)	9.7 (0.8)	7.4 (1.1)	11.1 (2)	10.5 (2.8)
	0-12	13.3 (2.9)	16.0 (1.7)	13.2 (5.9) <sup>B</sup>	15 (2) <sup>b</sup>	17.8 (0.3) <sup>ab</sup>	20.6 (2.6) <sup>aA</sup>
	0-24	17.5 (2.5) <sup>b</sup>	19.9 (1.6) <sup>ab</sup>	22.1 (3.2) <sup>a</sup>	20.6 (1.7)	23.0 (1.6)	23.8 (0.8)
	0-48	19.7 (0.9) <sup>b</sup>	23.5 (0.9) <sup>ab</sup>	25.3 (1.9) <sup>a</sup>	22.9 (4.8) <sup>b</sup>	24.1 (1.4) <sup>ab</sup>	27.1 (1.9) <sup>a</sup>

abc, lowercase letters in the same row indicate significant difference between means of different F/S ratios for a same grass age ( $p < 0.05$ ).

AB, capital letters in the same row indicate significant difference between grass age means for the same F/S ratio ( $p < 0.05$ ).

iDM= incubated dry matter; dDM = digestible dry matter; iGE= incubated gross energy; iDE= incubated digestible energy.

CH<sub>4</sub> production in this time frame, regardless of grass age, was 57.40, 73.70, and 81.85 ml (per gram of DM<sub>i</sub>) and 96.15, 107.15 and 113.70 ml (per gram of DM<sub>d</sub>) for 100/0, 75/25, and 50/50 F/C ratios, respectively. For the same ratios, the average CH<sub>4</sub> production corresponded to 12.50, 16.50 and 18.80% of the iGE, and 21.30, 23.80 and 26.20% of the iDE, respectively. After incubation, DMD was 60.55, 68.85 and 72.00% for 100/0, 75/25 and 50/50 F/C ratios, respectively. Results behaved in a similar way when the means of different F/C rates were compared inside each grass age.

Table 5 shows that grass age significantly affected ( $p < 0.05$ ) acetic, propionic and butyric acid concentration, with the highest values for the young (30 days) compared with the 60 days old grass (117.87, 36.83 and 23.60 vs. 104.67, 33.40 and 22.47 mmol/L, respectively). The F/C ratio had no statistical effect on VFA concentration or the acetate/propionate ratio (A/P) ( $p > 0.05$ ), but it significantly affected pH ( $p < 0.05$ ). Treatments including more concentrate had lower pH values (6.50 and 6.52 for 50/50 and 75/25 ratios, respectively, compared with 6.58 for the 100/0 ratio). The grass age\*F/C interaction was not significant ( $p > 0.05$ ) for the variables presented in tables 3, 4 and 5.

## DISCUSSION

**Effect of grass age on production of gas, CH<sub>4</sub>, and DMD.** Caro and Correa (15) reported a 7.8% increase in NDF and 2.7% reduction

con valores más altos para el pasto de 30 días de edad, 117.87, 36.83 y 23.60 mmol/L, respectivamente, comparado con el pasto de 60 días, 104.67, 33.40 y 22.47 mmol/L, respectivamente. La relación F/S no tuvo efecto estadístico ( $p > 0.05$ ) sobre la concentración de AGV y la relación acetato/propionato (A/P), pero sí afectó significativamente el pH ( $p < 0.05$ ). Se observó que los tratamientos con mayor adición de suplemento presentaron menores valores de pH, 6.50 y 6.52 para relaciones 50/50 y 75/25, respectivamente, en contraste con 6.58 para la relación 100/0. Para las variables que se presentan en las tablas 3, 4 y 5, la interacción E\*F/S no fue significativa ( $p > 0.05$ ).

## DISCUSIÓN

**Efecto de la edad del pasto sobre la DMS y la producción de gas y de CH<sub>4</sub>.** Caro y Correa (15) reportaron un incremento de 7.8% en la concentración de FDN y una reducción de 2.7% en el contenido de CNE cuando compararon pasto kikuyo cosechado a los 32 y 58 días de rebrote. En el pasto del presente estudio, el aumento en la concentración de FDN y la reducción en el contenido de CNE superó el reporte de los autores (Tabla 1). Es de esperarse que la calidad de los forrajes disminuya con la madurez, lo cual fue verificado por Caro y Correa (15), quienes encontraron que los cambios en la composición química afectaron la digestibilidad *in situ* a las 24h de incubación; siendo 6.7% más alta para el pasto

**Table 5.** Fermentation profile and pH from mixtures of 30 and 60 days old Kikuyu grass (*Pennisetum clandestinum*) with concentrate supplement in three forage/supplement proportions. Values in parentheses are standard deviations.

	Interval (hours)	K30			K60		
		100/0	75/25	50/50	100/0	75/25	50/50
Acetate (mmol/L)	0-6	110.7 (7) <sup>a</sup>	94.9 (6.2)	102.8 (12.7) <sup>a</sup>	86.6 (14.9) <sup>b</sup>	92.7 (4.6)	76.5 (14.9) <sup>b</sup>
	0-12	102.1 (4.6)	99.8 (7.1)	86.7 (15.6)	84.2 (25.7)	79.0 (16.2)	87.2 (6.4)
	0-24	96.6 (13)	90.6 (27.6)	108.8 (14.5)	92.7 (9.8)	83.2 (20.4)	98.2 (10)
	0-48	121.1 (6)	101.8 (21.3)	120.7 (20.4)	108.2 (17.1)	107.4 (7.7)	98.4 (8)
Propionate (mmol/L)	0-6	33.4 (0.5)	31 (1.8)	32.1 (2.9) <sup>a</sup>	29.7 (3.7)	29.0 (0.2)	27.5 (3.1) <sup>b</sup>
	0-12	32.8 (0.5)	32.6 (1.5) <sup>a</sup>	30.1 (3.5)	28.6 (4.2)	27.2 (1.8) <sup>b</sup>	29.1 (1.4)
	0-24	32.6 (2.2)	32.0 (4.7)	35.5 (2.8)	30.7 (2.1)	29.2 (3)	33.1 (1.9)
	0-48	39.2 (0.6) <sup>a</sup>	33.7 (4)	37.6 (3.8) <sup>a</sup>	34.3 (3.8) <sup>b</sup>	32.9 (1.7)	33 (0.7) <sup>b</sup>
Butyrate (mmol/L)	0-6	22.1 (0.5)	21.0 (0.9)	22.3 (1.5) <sup>a</sup>	20.9 (2.4)	20.9 (0.1)	19.6 (1.5) <sup>b</sup>
	0-12	22.6 (0.8)	22.3 (0.4) <sup>a</sup>	20.0 (1)	20.3 (2.5)	19.8 (1.2) <sup>b</sup>	20.6 (1)
	0-24	21.6 (2.2)	22.3 (2.7)	23.5 (1.3)	20.4 (1.1)	20.6 (1.6)	22.9 (1.5)
	0-48	23.1 (0.5)	22.0 (1.4)	25.7 (1.9) <sup>a</sup>	22.2 (1.7)	22.3 (0.7)	22.9 (0.8) <sup>b</sup>
Acetate/Propionate	0-6	3.3 (0.2)	3.1 (0)	3.2 (0.1)	2.9 (0.1)	3.2 (0.1)	2.8 (0.2)
	0-12	3.1 (0.1)	3.1 (0.2)	2.9 (0.2)	2.9 (0.6)	2.9 (0.4)	3.0 (0.1)
	0-24	3.0 (0.2)	2.8 (0.5)	3.1 (0.2)	3.0 (0.2)	2.8 (0.4)	3.0 (0.2)
	0-48	3.3 (0.1)	3.0 (0.3)	3.2 (0.2)	3.1 (0.2)	3.3 (0.1)	3.0 (0.2)
pH	0-6	7.04 (0.03)	7 (0.04)	7.02 (0.05) <sup>a</sup>	6.99 (0.02)	6.99 (0.04)	6.95 (0.08) <sup>b</sup>
	0-12	6.75 (0.02) <sup>a</sup>	6.71 (0.03) <sup>ab</sup>	6.67 (0.02) <sup>b</sup>	6.75 (0.03) <sup>a</sup>	6.72 (0.02) <sup>ab</sup>	6.67 (0.02) <sup>b</sup>
	0-24	6.67 (0.06) <sup>a</sup>	6.58 (0.01) <sup>b</sup>	6.53 (0.01) <sup>b</sup>	6.64 (0.03) <sup>a</sup>	6.57 (0.03) <sup>b</sup>	6.52 (0.03) <sup>b</sup>
	0-48	6.59 (0.02) <sup>a</sup>	6.54 (0.02) <sup>ab</sup>	6.51 (0.02) <sup>b</sup>	6.57 (0.03) <sup>a</sup>	6.5 (0.01) <sup>b</sup>	6.48 (0.01) <sup>b</sup>

abc, lowercase letters in the same row indicate significant difference between means of different F/S ratios for a same grass age ( $p < 0.05$ ). AB, capital letters in the same row indicate significant difference between grass age means for the same F/S ratio ( $p < 0.05$ ).

in NSC for Kikuyu grass harvested at 32 vs. 58 days of regrowth. In the present study, NDF increase and NSC reduction exceeded the figures reported by those researchers (Table 1). It is expected that forage quality decrease with maturity, which was verified by Caro and Correa (15), who found that changes in the chemical composition affect *in situ* digestibility at 24h incubation. They reported a 6.7% increase in grass digestibility after 32 days of regrowth compared to 58 days. This is in agreement with the present study, where DMD at 24 hours of incubation was higher for the younger grass (Table 3). Within species, increased harvest age is associated with higher NDF, ADF and ADL levels, and lower CP content (Table 1) as well as DMD reduction.

Chaves et al (16) concluded that CH<sub>4</sub> produced by grazing heifers was significantly affected by the type of grass, reflecting differences in maturity and chemical composition and confirming that CH<sub>4</sub> production is primarily a function of the amount of cell wall digested in the rumen. In the present study, pasture age significantly affected gas and CH<sub>4</sub> production (per gram of <sub>d</sub>DM) and CH<sub>4</sub> (as percent of <sub>i</sub>DE) (Tables 3 and 4). According to Sun et al (17), CH<sub>4</sub> production should be expressed in relation to <sub>d</sub>DM, instead of <sub>i</sub>DM. They reported that *Cichorium intybus* and *Lolium perenne* fodder had similar CH<sub>4</sub> production on <sub>i</sub>DM basis despite their differences in NDF (28.1

de 32 días de rebrote en comparación con el de 58 días. Los resultados del presente trabajo confirman los hallazgos de los autores, toda vez que a las 24 horas de incubación la DMS fue superior para el pasto de menor edad (Tabla 3). Dentro de una misma especie, el aumento en la edad de cosecha se asocia con mayor contenido de FDN, FDA y LDA, menor contenido de PB (Tabla 1) y reducción en la DMS.

Chaves et al (16) concluyeron que la producción de CH<sub>4</sub> de novillas en pastoreo fue afectada significativamente por el tipo de pasto, como reflejo de las diferencias en madurez y composición química de los forrajes analizados, confirmando el concepto que la producción de CH<sub>4</sub> es, principalmente, una función de la cantidad de pared celular digerida en el rumen. En el presente trabajo, la edad del pasto afectó significativamente la producción de gas y de CH<sub>4</sub> cuando estas variables fueron expresadas por gramo de MS<sub>d</sub> y el CH<sub>4</sub> como porcentaje de la ED<sub>i</sub> (Tabla 3 y 4). La importancia de expresar la producción de CH<sub>4</sub> en relación con la MS<sub>d</sub> y no con la MS<sub>i</sub>, se confirmó en el trabajo de Sun et al (17), quienes reportaron que los forrajes *Cichorium intybus* y *Lolium perenne* tuvieron similar producción de CH<sub>4</sub> en función de la MS<sub>d</sub>, a pesar de sus diferencias en el contenido de FDN, 28.1 y 49.9% respectivamente, y la mayor digestibilidad del primero. En el presente trabajo, el tratamiento K30-100/0 tuvo menor FDN, FDA y LDA (Tabla 2), mayor digestibilidad acumulada a las 48 horas ( $p < 0.05$ ), e igual producción de gas y CH<sub>4</sub> por



and 49.9%, respectively) and the higher digestibility of *Cichorium intybus*. In the present study, treatment K30-100/0 resulted in lower NDF, ADF and ADL (Table 2), higher accumulated digestibility at 48 hours ( $p < 0.05$ ), and similar gas and  $\text{CH}_4$  production (per gram of  $\text{DM}_i$ ) compared to treatment K60-100/0. However, when gas production and  $\text{CH}_4$  were expressed per gram of  $\text{DM}_d$  (Tables 3 and 4) the values were statistically higher for the older grass (60 days) ( $p < 0.05$ ). Accordingly, highly digestible forage can produce the same gas and  $\text{CH}_4$  per gram of  $\text{DM}_i$ ; which switches when production of both is expressed as per gram of  $\text{DM}_d$ . The higher digestibility of the substrate mathematically reduces gas and  $\text{CH}_4$  production and biologically increases  $Y_{\text{ATP}}$ . Van Soest et al (18) defined microbial efficiency as the proportion of the substrate energy fixed by the cells and, thus, it is inversely related to VFA and  $\text{CH}_4$  production.

**Effect of F/C ratio on DMD,  $\text{CH}_4$ , and gas production.** The increase in gas production and  $\text{CH}_4$  per gram of  $\text{DM}_i$  observed with decreasing F/C ratios (Tables 3 and 4) can be attributed to higher NSC vs. NDF in the incubated substrate (Table 2). The high NSC proportion in the concentrate supplement (Table 1) explains its upward trend as F/C decreased, resulting in a higher NSC/NDF ratio (Table 2). Pellikaan et al (19) also found increased *in vitro*  $\text{CH}_4$  and gas production from substrates with low NDF and high starch content. They obtained 399.9 and 66.8 ml for gas and  $\text{CH}_4$ , respectively, from potato starch (per gram of incubated organic matter); while values were 273.3 and 47.6 ml, respectively, from grass silage. Navarro-Villa et al (11) also reported increased production of gas and  $\text{CH}_4$  for incubated barley grain compared with barley straw and grass silage. In the present study, the increased gas and  $\text{CH}_4$  production from substrates with concentrate supplement can be explained by their higher DMD (Table 3). However, it is important to note that this increased digestibility was not sufficient to generate a downward trend in gas and  $\text{CH}_4$  output (at 48 hours of incubation) as F/C decreased when they were expressed as per gram of  $\text{DM}_d$ . The only exception to this was gas production per gram of  $\text{DM}_d$  from grass harvested at 60 days (Tables 3 and 4). Lower levels of incubated protein as F/C decreased -especially for 30 days grass- may be associated with reductions in  $\text{CH}_4$ . According to Inthapanya and Preston (20), less protein degradation in the incubated substrate decreases  $\text{CH}_4$  production. However, this

gramo de  $\text{MS}_i$  que el tratamiento K60-100/0. No obstante, cuando la producción de gas y de  $\text{CH}_4$  fue expresada por gramo de  $\text{MS}_d$  (Tabla 3 y 4), los valores fueron estadísticamente mayores para el pasto de 60 días de edad ( $p < 0.05$ ). Lo anterior confirma que un forraje de mayor digestibilidad puede producir igual gas y  $\text{CH}_4$  por gramo de  $\text{MS}_i$ , efecto que se revierte cuando la producción de ambos se expresa por gramo de  $\text{MS}_d$ . La mayor digestibilidad del sustrato matemáticamente reduce la producción de gas y de  $\text{CH}_4$  y, biológicamente aumenta el  $Y_{\text{ATP}}$ . Van Soest et al (18) definieron la eficiencia microbiana como la proporción de energía contenida en el sustrato que es fijada en las células y, por tanto, está inversamente relacionada con la producción de AGV y de  $\text{CH}_4$ .

**Efecto de la relación F/S sobre la DMS y la producción de gas y de  $\text{CH}_4$ .** El incremento en la producción de gas y de  $\text{CH}_4$  por gramo de  $\text{MS}_i$  que se observó con la disminución de la relación F/S (Tablas 3 y 4) puede atribuirse a la mayor concentración de CNE respecto la FDN en el sustrato incubado (Tabla 2). La alta proporción de CNE en el suplemento (Tabla 1) explicó el comportamiento creciente que este nutriente registró a medida que disminuyó la relación F/S, conllevando a una mayor relación CNE/FDN (Tabla 2). Pellikaan et al (19) también encontraron mayor producción de gas y de  $\text{CH}_4$  *in vitro* en sustratos con menor contenido de FDN y mayor contenido de almidones. Para el almidón de papa, los autores reportaron producciones de gas y de  $\text{CH}_4$ , por gramo de materia orgánica incubada, de 399.9 y 66.8 ml, respectivamente, mientras para el ensilaje de pasto los valores fueron 273.3 y 47.6 ml, correspondientemente. Navarro-Villa et al (11) igualmente evidenciaron mayor producción de gas y de  $\text{CH}_4$  cuando incubaron grano de cebada, respecto a paja de cebada y ensilaje de pasto.

En el presente estudio, la mayor producción de gas y de  $\text{CH}_4$  en los sustratos que incluyeron suplemento puede ser explicada por su mayor DMS (Tabla 3). Sin embargo, es importante señalar que esta mayor digestibilidad no fue suficiente para generar una tendencia decreciente en los resultados de producción de gas y de  $\text{CH}_4$  (a las 48 horas de incubación), cuando estas variables fueron expresadas por gramo de  $\text{MS}_d$ , conforme disminuyó la relación F/S. La única excepción a este comportamiento se observó para la producción de gas por gramo de  $\text{MS}_d$  en el pasto cosechado a los 60 días de edad (Tablas 3 y 4). Los menores niveles de proteína incubada conforme se redujo la relación F/S, especialmente en los tratamientos que incluyeron el pasto kikuyo de 30 días de edad, pueden estar asociados con reducción en la producción de  $\text{CH}_4$ . De acuerdo con los hallazgos de Inthapanya y Preston (20), una menor degradación de la proteína en el sustrato incubado reduce

effect was smaller in the present study compared to that generated by a higher NSC/NDF ratio, as previously stated.

Increased *in vitro* CH<sub>4</sub> production per gram of <sub>i</sub>DM and <sub>d</sub>DM in treatments with low F/C (Table 4) is not in agreement with *in vivo* results (21), where it is accepted that rapidly fermenting diets decrease CH<sub>4</sub> production. The effect of these diets on *in vivo* CH<sub>4</sub> production is explained by a decrease in ruminal pH, affecting the growth of methanogens, protozoa (22) and cellulolytic bacteria (23), and increasing passage rate, which reduces the number of protozoa and thus interspecies transfer of H<sub>2</sub> and methanogenesis (24). The *in vitro* gas technique does not allow replacing the liquid and/or solid fractions, and a buffer solution is added to guarantee pH stability between 6.5 to 7.0 (Table 5). Both things may explain the divergence between *in vitro* and *in vivo* results regarding CH<sub>4</sub> for increasing NSC levels. This was reported by Navarro-Villa et al (11), who measured 70% higher CH<sub>4</sub> for grains compared with forages incubated *in vitro*, while McGeough et al (25) reported lower CH<sub>4</sub> production from ruminants fed cereal based diets.

The CH<sub>4</sub> increase, as a percentage of the <sub>i</sub>GE and <sub>i</sub>DE, is consistent with CH<sub>4</sub> emissions per gram of <sub>i</sub>DM and <sub>d</sub>DM (Table 4). Values ranged from 8.8 (K60-100/0) and 15.1% (K60-50/50) of <sub>i</sub>GE after 24 hours of incubation, surpassing the results by Bhatta et al (26) who evaluated mixed diets also at 24 hours of incubation and obtained between 4.4 and 7.8% of GE.

**Effect of grass age on fermentation profile.** Glucose is a common intermediary among carbohydrates degraded in the rumen and their final products (VFA, CO<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub>). The mechanism that controls glucose partition between different VFA depends on food composition (2). Tropical grasses usually grow and mature faster, rapidly turning into fibrous and less digestible. The lower NDF content (Table 2) and the larger DMD (Table 3) of 30-day grass treatments is consistent with the higher VFA concentration, as reported in Table 5, explaining the significant effect of age on acetate, propionate and butyrate production (p<0.05).

la producción de este gas. En este trabajo, no obstante, este efecto fue menor frente al generado por la mayor relación CNE/FDN, como previamente fue indicado.

La mayor producción *in vitro* de CH<sub>4</sub>, por gramo de MS<sub>i</sub> y MS<sub>d</sub>, en los tratamientos con menor relación F/S (Tabla 4) no es consistente con los resultados encontrados *in vivo* (21), donde es aceptado que la utilización de dietas de rápida fermentación reduce la producción de CH<sub>4</sub>. El efecto de este tipo de dietas sobre la producción *in vivo* de CH<sub>4</sub> se explica por la disminución del pH ruminal, que afecta el crecimiento de metanógenos, protozoos (22) y bacterias celulolíticas (23), y por el aumento en la tasa de pasaje, que reduce el número de protozoarios y con ello la transferencia interespecie de H<sub>2</sub> y la metanogénesis (24). En la técnica *in vitro* de producción de gas, metodología empleada en este trabajo, no es posible el recambio de la fracción líquida y/o sólida y se incluye una solución buffer que garantiza la estabilidad del pH en un rango entre 6.5 a 7.0 (Tabla 5). Ambos conceptos posiblemente expliquen la divergencia entre la producción de CH<sub>4</sub> *in vitro* y los reportes *in vivo* cuando se evalúan niveles crecientes de CNE en el sustrato fermentado. Esta situación fue reportada por Navarro-Villa et al (11), quienes obtuvieron producciones de CH<sub>4</sub> 70% mayores para los granos respecto a los forrajes incubados *in vitro*, en tanto McGeough et al (25) registraron menor producción de CH<sub>4</sub> en rumiantes alimentados con dietas basadas en cereales.

El aumento en la producción de CH<sub>4</sub>, expresado como porcentaje de la EB y ED es consistente con las emisiones de CH<sub>4</sub> por gramo de MS<sub>i</sub> y MS<sub>d</sub> (Tabla 4). A las 24 horas de incubación los valores fluctuaron entre 8.8 (K60-100/0) y 15.1% (K60-50/50) de la EB<sub>i</sub>, superando el reporte de Bhatta et al (26) evaluando dietas mixtas, entre 4.4 y 7.8% de la EB, igualmente a las 24 horas de incubación.

**Efecto de la edad del pasto sobre el perfil de fermentación.** La glucosa es un intermediario común entre los carbohidratos degradados en el rumen y sus productos finales (AGV, CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub>). El mecanismo que controla la partición de la glucosa entre los diferentes AGV está en función de la composición de los alimentos ingeridos (2). Los pastos tropicales generalmente crecen y maduran rápido, lo cual los convierte en alimentos más fibrosos y menos digestibles en un corto período de tiempo. El menor contenido de FDN (Tabla 2) y la mayor DMS (Tabla 3) para los tratamientos que incluyeron el pasto de 30 días es consistente con la mayor concentración de AGV que se reporta en la tabla 5, explicando el efecto significativo (p<0.05) del factor edad sobre la producción de acetato, propionato y butirato.

**Effect of F/C ratio on fermentation profile.** When fiber-rich diets change to diets based on concentrates, a decrease can be expected in ruminal pH (27), number of fibrolytic bacteria (23) and the A/P ratio (28). Although in the present study F/C significantly affected the pH, it tended to remain high and stable due to the  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$  balance of the buffer solution, which could explain the lack of significant effect of the F/C ratio on the A/P ratio (Table 5). Citric acid has been suggested to overcome the buffer effect and perform *in vitro* evaluations at pH lower than 6 (11). However, that strategy did not work in the present study; pH readings at 6 hours of incubation (Table 5) were higher than those recorded at the beginning (pH 6.5). This could be explained by citric acid being rapidly fermented by rumen microorganisms to  $\text{CO}_2$  and acetic acid (29).

The *in vitro* gas technique does not remove VFA via absorption, so its concentration depends on the fermentation rate. Since DMD increases with incubation time, a higher VFA concentration is expected as fermentation continues. However, this was not observed in this study (Table 5). It can be assumed that microorganisms degraded VFA to obtain energy, as observed by Wang et al (30), which would explain the stability of its concentration over the incubation time.

The results of this study confirm that grass age affects DMD,  $\text{CH}_4$ , gas production, and fermentation profile due to a higher proportion of cell wall. A reduction of F/C ratio simultaneous with a high NSC/NDF ratio improves substrate digestibility and increases  $\text{CH}_4$  and gas production, contradicting the *in vivo* reports. The pH, which is controlled by the buffer solution, hinders the study of the effect of F/C ratio on methanogenesis in *in vitro* systems. Therefore, for future studies we suggest to change the formulation of the buffer solution to enable the assessments of mixed diets at a pH close to *in vivo*.

**Efecto de la relación F/S sobre el perfil de fermentación.** Cambios en la alimentación, desde dietas altas en fibra a dietas basadas en suplemento concentrado disminuyen el pH ruminal (27), el número de bacterias fibrolíticas (23) y la relación A/P (28). Si bien, en el presente trabajo la relación F/S afectó significativamente el pH, los valores tendieron a mantenerse altos y estables gracias al equilibrio  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$  de la solución buffer, lo que puede explicar la ausencia de efecto estadístico de la relación F/S sobre la relación A/P (Tabla 5). Para superar el efecto de la solución buffer y realizar evaluaciones *in vitro* a bajo pH (<6) se ha propuesto la utilización de ácido cítrico (11), no obstante, en el presente trabajo esta estrategia no fue eficiente, y las lecturas de pH a las 6 horas de incubación (Tabla 5) mostraron valores superiores a los registrados al inicio (pH 6.5). Esto pudo deberse a que el ácido cítrico es rápidamente fermentado por los microorganismos ruminales hasta  $\text{CO}_2$  y ácido acético (29).

En la técnica *in vitro* de producción de gas no existe remoción de los AGV vía absorción, por lo que su concentración depende de la tasa de fermentación. Dado que la DMS aumenta con el tiempo de incubación, es de esperarse una mayor concentración de AGV a medida que transcurre la fermentación, sin embargo, este comportamiento no fue observado en el presente trabajo (Tabla 5). Es posible suponer que los microorganismos degradaron los AGV para obtener energía, fenómeno observado por Wang et al (30), lo cual estaría explicando la estabilidad en su concentración con el transcurso del tiempo de incubación.

Los resultados del presente experimento corroboran que la edad del pasto afecta la DMS, la producción de gas y de  $\text{CH}_4$  y el perfil de fermentación debido a su mayor proporción de pared celular. La reducción en la relación F/S, concomitante con una mayor proporción CNE/FDN, mejora la digestibilidad del sustrato y aumenta la producción de gas y de  $\text{CH}_4$ , esto último contradiciendo los reportes *in vivo*. El valor de pH, que es controlado por la solución buffer, representa una limitante para estudiar el efecto de la relación F/S sobre la metanogénesis en sistemas *in vitro*. Por lo tanto, para futuros trabajos se sugiere realizar modificaciones en la formulación de la solución buffer que permitan realizar evaluaciones de dietas mixtas en un pH cercano al observado *in vivo*.

## REFERENCES

1. Kumar S, Puniya AK, Puniya M, Dagar SS, Sirohi SK, Singh K et al. Factors affecting rumen methanogens and methane mitigation strategies. *World J Microbiol Biotechnol* 2009;25(9):1557-1566.
2. Janssen PH. Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. *Anim Feed Sci Tech* 2010; 160(1-2):1-22.
3. Correa HJ, Pabón ML, Carulla JE. Valor nutricional del pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum* Hoechst Ex Chiov.) para la producción de leche en Colombia (Una revisión): I-Composición química y digestibilidad ruminal y posruminal. *Livest Res Rural Dev* 2008; 20(4) [en línea] [fecha de acceso 18 de julio de 2014]. URL disponible en: <http://www.lrrd.org/lrrd20/4/corra20059.htm>
4. Aguerre MJ, Wattiaux MA, Powell JM, Broderick GA, Arndt C. Effect of forage-to-concentrate ratio in dairy cow diets on emission of methane, carbon dioxide, and ammonia, lactation performance, and manure excretion. *J Dairy Sci* 2011;94(6):3081-3093.
5. Association of Official Analytical Chemist - AOAC. *Official Methods of Analysis*. 18 ed. Gaithersburg, MD: AOAC Int, 2011.
6. Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sci* 1991; 74(10):3583-3597.
7. Raffrenato E, Van Amburgh ME. Technical note: Improved methodology for analyses of acid detergent fiber and acid detergent lignin. *J Dairy Sci* 2011; 94(7):3613-3617.
8. Detmann E, Valadares Filho SC. On the estimation of non-fibrous carbohydrates in feeds and diets. *Arq Bras Med Vet* 2010; 62(4):980-984.
9. Posada SL, Noguera R, Bolívar D. Relación entre presión y volumen para la implementación de la técnica in vitro de producción de gases. *Rev Colomb Cienc Pecu* 2006; 19(4):407-414.
10. McDougall EI. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochem J* 1948; 43(1):99-109.
11. Navarro-Villa A, O'Brien M, López S, Boland TM, O'Kiely P. Modifications of a gas production technique for assessing in vitro rumen methane production from feedstuffs. *Anim Feed Sci Tech* 2011; 166-167:163-174.
12. López S, Newbold CJ. *Measuring methane production from ruminants*. The Netherlands: Springer; 2007.
13. Nkrumah JD, Okine EK, Mathison GW, Schmid K, Li C, Basarab JA et al. Relationships of feedlot feed efficiency, performance, and feeding behavior with metabolic rate, methane production, and energy partitioning in beef cattle. *J Anim Sci* 2006; 84(1):145-153.
14. SAS/STAT [programa de ordenador]. Versión 9.1.3. Cary (NC): SAS Institute Incorporation; 2003.
15. Caro F, Correa HJ. Digestibilidad posruminal aparente de la materia seca, la proteína cruda y cuatro macrominerales en el pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) cosechado a dos edades de rebrote. *Livest Res Rural Dev* 2006; 18(10) [en línea] [fecha de acceso 22 de agosto de 2014]. URL disponible en: <http://www.lrrd.org/lrrd18/10/caro18143.htm>
16. Chaves AV, Thompson LC, Iwaasa AD, Scott SL, Olson ME, Benchaar C et al. Effect of pasture type (alfalfa vs. grass) on methane and carbon dioxide production by yearling beef heifers. *Can J Anim Sci* 2006; 86(3):409-418.
17. Sun XZ, Hoskin SO, Muetzel S, Molano G, Clark H. Effects of forage chicory (*Cichorium intybus*) and perennial ryegrass (*Lolium perenne*) on methane emissions in vitro and from sheep. *Anim Feed Sci Tech* 2011; 166-167:391-397.
18. Van Soest PJ, France J, Siddons RC. On the steady-state turnover of compartments in the ruminant gastrointestinal tract. *J Theor Biol* 1992; 159(2):135-145.

19. Pellikaan WF, Hendriks WH, Uwimana G, Bongers LJGM, Becker PM, Cone JW. A novel method to determine simultaneously methane production during *in vitro* gas production using fully automated equipment. *Anim Feed Sci Tech* 2011; 168(3-4):196-205.
20. Inthapanya S, Preston TR. Methane production from urea-treated rice straw is reduced when the protein supplement is cassava leaf meal or fish meal compared with water spinach meal in a rumen *in vitro* fermentation. *Livest Res Rural Dev* 2014; 26(9) [en línea] [fecha de acceso 14 de noviembre de 2014]. URL disponible en: <http://www.lrrd.org/lrrd26/9/sang26159.html>
21. Doreau M, Van Der Werf HMG, Micol D, Dubroeuq H, Agabriel J, Rochette Y et al. Enteric methane production and greenhouse gases balance of diets differing in concentrate in the fattening phase of a beef production system. *J Anim Sci* 2011; 89(8):2518-2528.
22. Hook SE, Steele MA, Northwood KS, Wright AD, McBride BW. Impact of high-concentrate feeding and low ruminal pH on methanogens and protozoa in the rumen of dairy cows. *Microb Ecol* 2011; 62(1):94-105.
23. Sung HG, Kobayashi Y, Chang J, Ha A, Hwang IH, Ha JK. Low Ruminant pH Reduces Dietary Fiber Digestion via Reduced Microbial Attachment. *Asian-Aust J Anim Sci* 2007; 20(2):200-207.
24. Kumar S, Dagar SS, Puniya AK, Upadhyay RC. Changes in methane emission, rumen fermentation in response to diet and microbial interactions. *Res Vet Sci* 2013; 94(2):263-268.
25. McGeough EJ, O'Kiely P, Foley PA, Hart KJ, Boland TM, Kenny DA. Methane emissions, feed intake, and performance of finishing beef cattle offered maize silages harvested at 4 different stages of maturity. *J Anim Sci* 2010; 88(4):1479-1491.
26. Bhatta R, Enishi O, Takusari N, Higuchi K, Nonaka I, Kurihara M. Diet effects on methane production by goats and a comparison between measurement methodologies. *J Agr Sci* 2008; 146(6):705-715.
27. Bevans DW, Beauchemin KA, Schwartzkopf-Genswein KS, McKinnon JJ, McAllister TA. Effect of rapid or gradual grain adaptation on subacute acidosis and feed intake by feedlot cattle. *J Anim Sci* 2005;83(5):1116-1132.
28. Suárez BJ, Van Reenen CG, Beldman G, van Denle J, Dijkstra J, Gerrits JJ. Effects of Supplementing Concentrates Differing in Carbohydrate Composition in Veal Calf Diets: I. Animal Performance and Rumen Fermentation Characteristics. *J Dairy Sci* 2006; 89(11):4365-4375
29. Wright DE. Citric acid metabolism in the bovine rumen. *Applied microbiology* 1971; 21(2):165-168.
30. Wang Q, Kuninobu M, Ogawa HI, Kato Y. Degradation of volatile fatty acids in highly efficient anaerobic digestion. *Biomass Bioenerg* 1999; 16(6):407-416.