

## ESTUDIO COMPARATIVO DEL ANÁLISIS DE GAS METANO PROCEDENTE DE LA FERMENTACIÓN RUMINAL UTILIZANDO DOS ESTÁNDARES DIFERENTES

Mateos I.<sup>1</sup>, Ranilla M.J.<sup>1,2</sup>, Saro C.<sup>1,2</sup> y Carro M.D.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Producción Animal, Universidad de León, 24071 León.

<sup>2</sup> Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE), Finca Marzanas, 24346 Grulleros, León.  
(mdcart@unileon.es)

### INTRODUCCIÓN

El metano es uno de los productos finales de la fermentación ruminal de los alimentos, y es eliminado por los animales mediante el eructo. El metano representa una pérdida energética que oscila entre el 5% y el 8% de la energía bruta de los alimentos ingeridos y contribuye en gran medida al efecto invernadero. La producción de metano por los animales es considerada la mayor fuente de emisión de este gas dentro de las prácticas agrícolas (López y Newbold, 2007). Uno de los métodos más utilizados para el análisis de la concentración de metano es la cromatografía de gases. En este análisis se utilizan estándares de concentración en metano conocida, pero no se conoce el efecto que puede tener la utilización de diferentes estándares sobre el resultado del análisis. Por ello, el objetivo de este trabajo fue comparar los valores obtenidos en muestras de gases de fermentación ruminal cuando se utilizaron como estándares metano puro (MP) o una mezcla de gases que contenía un 10% de metano (MD).

### MATERIAL Y MÉTODOS

Para el estudio se utilizaron muestras de gas recogidas en dos experimentos *in vitro*. El experimento 1 se llevó a cabo con cultivos no renovados de microorganismos ruminales, y en cada botella se incubaron 300 mg de un sustrato (65:35 heno de alfalfa:concentrado) con 30 mL de líquido ruminal tamponado. En esta prueba se analizaron los efectos de 3 aditivos que se administraron a 3 dosis diferentes (9 tratamientos; TA a TI) y los resultados se compararon con los obtenidos en la fermentación del sustrato sin aditivo (control; CON). Las botellas se incubaron a 39°C y al cabo de 24 horas se midió la presión dentro de las mismas con un medidor de presión y se determinó el volumen de gas producido con una jeringa calibrada. A continuación, se recogieron unos 10 mL de gas en un tubo de vacío (Vacutainer®) y se almacenaron hasta su análisis. Se realizaron incubaciones en cuatro días diferentes para obtener 4 réplicas por tratamiento, por lo que se dispuso de 40 muestras de gas (4 réplicas x 10 tratamientos).

El experimento 2 se llevó a cabo con 8 fermentadores RUSITEC que recibieron diariamente 30 g del sustrato usado en el experimento 1. Cuatro fermentadores recibieron como aditivo un cultivo fúngico liofilizado (FUN) y los otros 4 no recibieron aditivo (CON). El gas producido en cada fermentador se recogió diariamente en bolsas herméticas durante 3 días consecutivos (24 muestras en total), se midió con un flujómetro de gas, y se tomó una muestra en tubos de vacío siguiendo el procedimiento descrito anteriormente.

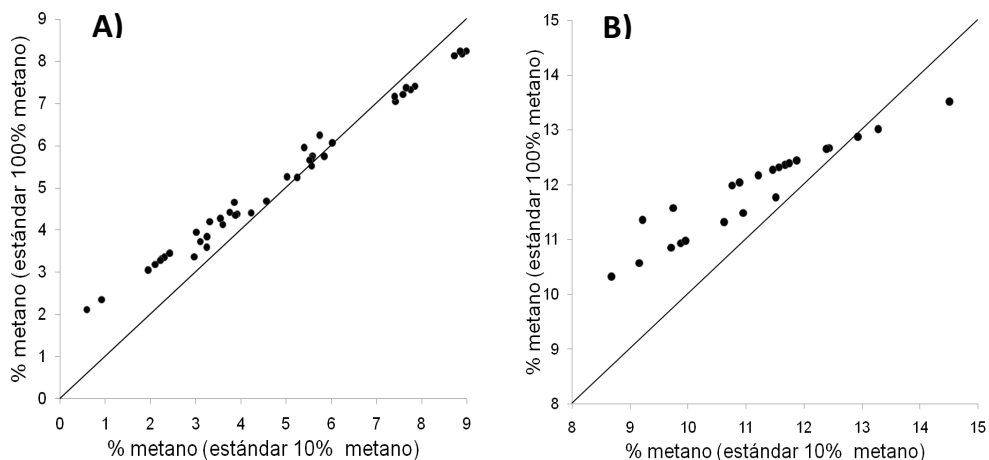
El análisis de la concentración de metano se realizó según el procedimiento descrito por Martínez *et al.* (2010). Se inyectaron muestras del gas (400 y 100  $\mu$ L en los experimentos 1 y 2, respectivamente) en un cromatógrafo de gases (Shimadzu GC 14B; Shimadzu Europa GmbH, Duisburg, Alemania) equipado con un detector de llama de ionización (FID) y una columna empaquetada con Carboxen 1000 (Supelco, Madrid, España). Las temperaturas de la columna, inyector y detector fueron 170, 200 y 200°C, respectivamente, y se usó helio como gas transportador. Cada muestra se analizó por duplicado, y cuando el coeficiente de variación entre las dos inyecciones fue mayor que el 5% se realizó una tercera inyección. Las rectas de calibrado se obtuvieron mediante regresión lineal entre diferentes cantidades inyectadas de un gas estándar y el área de los picos obtenidos en cada caso. Como gas estándar se utilizó metano puro (MP; Supelco, Bellefonte, PA, EEUU) y una mezcla de gases que contenía un 10% de metano (MD; Carbueros Metálicos, León, España), y se calcularon los valores de concentración de metano en el gas (%) obtenidos con cada recta de calibrado. El volumen de gas producido en cada botella o fermentador fue corregido para condiciones normales (273°K; 1 atmósfera), y se calculó la cantidad de metano ( $\mu$ mol) multiplicando el gas producido ( $\mu$ mol) por la concentración de metano (%) en las muestras.

Adicionalmente, en los dos experimentos se recogieron muestras para analizar la concentración de ácidos grasos volátiles siguiendo el procedimiento descrito por Carro y Miller (1999) y se calculó la recuperación de hidrógeno (ReCH) a partir de las producciones de metano y de los ácidos acético, propiónico, butírico y valérico según las ecuaciones propuestas por Demeyer (1991).

Los resultados de cada experimento se analizaron independientemente. Los valores de concentración de metano obtenidos por los dos métodos (MP y MD) se compararon entre sí mediante el test t de Student para medias de dos muestras emparejadas, y las relaciones entre ambos se analizaron mediante análisis de regresión. Finalmente, el efecto de los aditivos sobre la producción diaria de metano se analizó mediante un análisis de la varianza y la comparación de los valores medios de los tratamientos con el control se realizó mediante el test de Dunnett. El nivel de significación estadística se estableció en  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se muestran los valores de concentración en metano obtenidos con los dos estándares en las muestras de los experimentos 1 y 2. Como puede observarse, en las muestras que presentaron los contenidos más elevados en metano, la utilización del estándar MP subestimó los valores, mientras que en las muestras con los contenidos menores en metano, los sobreestimó. Cuando los valores obtenidos por los dos métodos se compararon mediante el test t de Student para medias de dos muestras emparejadas, los valores obtenidos con el estándar MP fueron mayores ( $P < 0,001$ ) que los obtenidos con el estándar MD en el experimento 1 y tendieron ( $P = 0,089$ ) a ser mayores en el experimento 2. A pesar de estas diferencias, en los dos casos existió una correlación positiva significativa entre ambos valores ( $P < 0,001$ ,  $r = 0,995$  y  $n = 40$  en el experimento 1, y  $P < 0,001$ ,  $r = 0,935$  y  $n = 24$  en el experimento 2).



**Figura 1.** Representación gráfica de los valores de porcentaje de metano obtenido utilizando como estándar metano puro (100% metano) y una mezcla de gases con un 10% de metano en las muestras de los experimentos 1 (A) y 2 (B).

En la Tabla 1 se muestran los valores medios de producción diaria de metano ( $\mu\text{mol}$ ) obtenidos en el experimento 1. Las diferencias con el control observadas con los dos estándares fueron iguales para todos los tratamientos, excepto para el TD, en el que únicamente cambió el nivel de significación estadística ( $P = 0,046$  con el estándar MP y  $P = 0,076$  con el estándar MD). En la Tabla 2 aparecen los valores medios de producción diaria de metano ( $\mu\text{mol}$ ) obtenidos en el experimento 2. Como puede observarse, no se detectaron diferencias significativas entre el tratamiento y el control con el estándar MD, pero cuando se utilizó el estándar MP se detectó una tendencia ( $P = 0,088$ ) a una mayor producción de metano en los fermentadores que recibían el aditivo (FUN).

**Tabla 1.** Valores medios de producción de metano ( $\mu\text{mol}$ ) en 24 horas en cada botella para los diferentes tratamientos experimentales en el experimento 1 cuando en el análisis de metano se utilizó como estándar metano puro (MP) o una mezcla de gases con un 10% de metano (MD).

Estándar	Tratamiento <sup>1</sup>											EEM <sup>2</sup>	P =
	CON	TA	TB	TC	TD	TE	TF	TG	TH	TI			
MD	512	416	299 <sup>d</sup>	183 <sup>d</sup>	401 <sup>a</sup>	310 <sup>d</sup>	190 <sup>d</sup>	228 <sup>d</sup>	180 <sup>d</sup>	165 <sup>d</sup>	29,3	<0,001	
MP	494	418	326 <sup>d</sup>	231 <sup>d</sup>	405 <sup>b</sup>	332 <sup>d</sup>	237 <sup>d</sup>	267 <sup>d</sup>	229 <sup>d</sup>	216 <sup>d</sup>	21,7	<0,001	

a, b, c, d los valores para cada tratamiento difieren del control: <sup>a</sup> P<0,10; <sup>b</sup> P<0,05; <sup>c</sup> P<0,01; <sup>d</sup> P<0,001.

<sup>1</sup> ver texto para la descripción de los tratamientos experimentales. CON: control.

<sup>2</sup> error estándar de la media.

En lo que se refiere a la recuperación de hidrógeno, los valores en el experimento 1 oscilaron entre 62,5 y 103% con el estándar MD y entre 68,8 y 104% con el estándar MP. Ambos valores están dentro del rango de los obtenidos en trabajos previos (Kamel *et al.*, 2007; López y Newbold, 2007) en los que se utilizaron aditivos que reducían la producción de metano. En el experimento 2, los valores de recuperación de hidrógeno oscilaron entre 84,9 y 103% con el estándar MD y entre 93,9 y 107% con el estándar MP.

**Tabla 2.** Producción de metano ( $\mu\text{mol} / \text{d}$ ) en fermentadores control (CON) y suplementados con un aditivo fúngico (FUN) en el experimento 2 cuando en el análisis de metano se utilizó como estándar metano puro (MP) o una mezcla de gases con un 10% de metano (MD).

Estándar	Tratamiento		EEM <sup>2</sup>	P =
	CON	FUN		
MD	20,9	22,3	0,902	0,321
MP	22,6	24,1	1,84	0,088

<sup>2</sup> error estándar de la media.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Carro, M. D., and E. L. Miller. 1999. Br. J. Nutr. 82:149-155. • Demeyer, D.I., 1991. In: Jouany, J.P. (Ed.). INRA Editions, Paris, France. pp. 217-237. • López, S., and C. J. Newbold. 2007. In: Makkar, H.P.S. and Vercoe, P.E. (Ed.). IAEA – FAO – Springer, Dordrecht, The Netherlands. pp: 1-13. • Kamel, C., Greathead, H.M.R., Tejido, M.L., Ranilla, M.J., and Carro, M.D. 2007. Anim. Feed Sci. Technol. 145:351-363. • Martínez, M. E., M. J. Ranilla, M. L. Tejido, C. Saro, and M. D. Carro. 2010. Anim. Feed Sci. Technol. 158:126-135.

**Agradecimientos:** Este trabajo ha sido financiado por la CICYT (Proyectos AGL-2004-04755-CO2-01 y AGL2008-04707-CO2-02) y la Junta de Castilla y León (Proyecto GR158)..

## COMPARISON OF TWO STANDARD GASES TO ANALYZE METHANE FROM RUMINAL FERMENTATION

**ABSTRACT:** Samples from ruminal fermentation gases obtained in two in vitro experiments were used to compare the values of methane production obtained by using two different standards (pure methane (MP) and a gas mixture (MD) with 10% methane) in the chromatographic analysis of methane. Values of methane concentration using MP as standard were greater ( $P<0.001$ ) than those obtained with MD in experiment 1, and tended ( $P=0,089$ ) to be greater in experiment 2, but in both experiments there was a positive relationship ( $P<0.001$ ) between both values. With both standards, hydrogen recoveries were in the range of results reported in the literature for similar studies. In both experiments, the use of MD and MP detected similar significant differences between control and treatments, and therefore did not change the interpretation of results.

**Keywords:** methane, gas chromatography, standard gas, ruminal fermentation