



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO**

---

**INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
ÁREA ACADÉMICA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**FERMENTACIÓN *In vitro* DE UNA DIETA Y UN FORRAJE  
CON ALTAS CONCENTRACIONES DE SELENIO**

**ALBERTO MARTINEZ JIMENEZ**

**TESIS**

**PRESENTADA COMO REQUISITO  
PARA OBTENER EL TITULO DE:**

**MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**Director:**

**Dr. Oscar Enrique del Razo Rodríguez**

Tulancingo de Bravo, Estado de Hidalgo.  
2013



### **Agradecimientos**

- ❖ A mis padres y hermana por todo su apoyo, por la oportunidad que me brindaron para poder estudiar una carrera, por fin veo culminado todo ese esfuerzo por parte de ellos.
- ❖ Al Programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP) de la Secretaría de Educación Pública, por el financiamiento de la investigación y la beca otorgada al tesista.
- ❖ Al Instituto de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, por ser mi segunda casa y por brindarme todos los conocimientos para mi formación profesional.
- ❖ Al Dr. Oscar Enrique Del Razo Rodríguez, por darme la oportunidad de realizar la tesis, agradezco todo su apoyo para la realización del presente trabajo, por sus consejos y gran ayuda en mi formación profesional, le estaré siempre agradecido.
- ❖ A los doctores María Guadalupe Torres Cardona, J. Jesús Germán Peralta Ortiz, Javier Piloni Martini, Juan Carlos Hernández González, Pedro Molina Mendoza y Blas Rogelio Ávila Castillo, por la revisión esta tesis.
- ❖ A la M.C. Irma de la Rosa Rodríguez por su asesoría en la edición de esta tesis.
- ❖ Agradezco a todos los catedráticos que me ayudaron en mi formación profesional brindándome todos sus conocimientos y experiencias.
- ❖ A mis amigos que me brindaron su ayuda y apoyo durante la realización de la tesis.

### **Dedicatoria**

- ❖ A mi Papá Roberto Martínez Godínez, a mi Mamá Ernesta Jiménez Domínguez y a mi Hermana Yaneth Martínez Jiménez, por todo su apoyo durante mi formación profesional, por nunca darse por vencidos, por darme la gran oportunidad de estudiar una carrera, por ser mi inspiración para seguir adelante, les dedico este trabajo porque no solo es un logro para mí, sino también es de ellos.
- ❖ A mis sobrinas Karol Dayan López Martínez y Abril López Martínez, porque a su llegada me dieron más fuerza para seguir adelante.
- ❖ A toda mi familia, abuelos, tíos y primos, que me han brindado la confianza, apoyo y sobre todo su cariño durante mi formación profesional y durante toda mi vida.
- ❖ También dedico este trabajo a mis amigos René Martínez Olvera, Edwin Heber Reyes García, Julio Castillo Palmero, Elena Ortiz López, Israel Muñoz Barraza y Enrique Galicia Monterd, por brindarme su apoyo en las buenas y en las malas desde el día que los conocí y por estar a mi lado en los momentos más difíciles y los no tan difíciles.

ESTA INVESTIGACIÓN FUE FINANCIADA POR EL PROGRAMA DE MEJORAMIENTO DEL PROFESORADO (PROMEP) DE LA SECRETARIA DE EDUCACIÓN PÚBLICA EJERCICIO 2011, NÚMERO DEL CONVENIO O CARTA DE LIBERACIÓN: PROMEP/103.5/11/0155.

TAMBIÉN SE UTILIZÓ MOBILIARIO, EQUIPO Y CONSUMIBLES ADQUIRIDOS CON RECURSOS PIFI 2008, 2009, 2010 Y 2012, CUIA 2010 Y CONUPE 2010.

## CONTENIDO

	<b>PAG</b>
<b>INDICE DE CUADROS</b> .....	iv
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	iv
<b>RESUMEN</b> .....	v
<b>SUMMARY</b> .....	vi
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	2
2.1 Función del <i>Se</i> en mamíferos.....	2
2.2 Deficiencia de <i>Se</i> en rumiantes.....	5
2.3 Metabolismo digestivo del <i>Se</i> en rumiantes.....	7
2.4 Absorción, transporte y excreción de <i>Se</i> .....	8
2.5 Consumo de <i>Se</i> complementario y utilización de nutrientes en rumiantes.....	9
2.6 Requerimiento y consumo máximo tolerable de <i>Se</i> para ovinos en crecimiento	10
<b>III. OBJETIVOS</b> .....	13
3.1 Objetivo general.....	13
3.2 Objetivos específicos.....	13
<b>IV. JUSTIFICACIÓN</b> .....	14
<b>V HIPÓTESIS</b> .....	14
<b>VI. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	15
6.1 Localización.....	15
6.2 Diseño experimental.....	15
6.3 Prueba de Digestibilidad <i>in vitro</i> .....	17
6.3.1 Preparación del inóculo.....	17
6.3.2 Inoculación e incubación.....	19
6.3.3 Registro de la producción de gas.....	19
6.3.4 Obtención de muestras y del residuo no degradado.....	20
6.4 Variables de respuesta.....	21
6.5 Análisis estadístico.....	23
<b>VII. RESULTADOS</b> .....	25
7.1 Producción acumulada de gas.....	25
7.2 Digestibilidad de la materia seca y pH a las 72 horas de incubación.....	30

## CONTENIDO

	<b>PAG</b>
<b>VIII. DISCUSIÓN.....</b>	31
<b>IX. CONCLUSIÓN.....</b>	34
<b>X. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	35
<b>ANEXOS.....</b>	40

## ÍNDICE DE CUADROS

	<b>PAG.</b>
Cuadro 1. Tratamientos experimentales en función de la concentración de selenio a partir de selenito de sodio en la dieta.....	15
Cuadro 2. Composición del inóculo utilizado para la incubación <i>in vitro</i> de los sustratos por la técnica de producción de gas.....	17
Cuadro 3. Concentración de selenio en las soluciones preparadas en función de los tratamientos experimentales.....	19
Cuadro 4. Medias de mínimos cuadrados ( $\pm$ EE) del volumen acumulado de gas producido ( $\text{mL g}^{-1}$ MS) con alfalfa y una dieta a base de grano, con altas concentraciones de <i>Se</i> . Experimento 1.....	26
Cuadro 5. Medias de mínimos cuadrados ( $\pm$ EE) del volumen acumulado de gas producido ( $\text{mL g}^{-1}$ MS) con alfalfa y una dieta a base de grano, con altas concentraciones de <i>Se</i> . Experimento 2.....	27
Cuadro 6. Medias de mínimos cuadrados ( $\pm$ EE) de la digestibilidad de la materia seca (%) y pH a las 72 horas de incubación de alfalfa y una dieta a base de grano, con altas concentraciones de <i>Se</i> . Experimento 1.....	28
Cuadro 7. Medias de mínimos cuadrados ( $\pm$ EE) de la digestibilidad de la materia seca (%) y pH a las 72 horas de incubación de alfalfa y una dieta a base de grano, con altas concentraciones de <i>Se</i> . Experimento 2.....	29

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>PAG.</b>
Figura 1. Vial de vidrio de 120 mL con boca de 20 mm utilizado para la incubación de los sustratos por la técnica de producción de gas.....	16
Figura 2. Preparación del inóculo para la incubación de los sustratos por la técnica de producción de gas.....	18
Figura 3. Sistema de medición de gas producido durante la incubación, por desplazamiento de agua.....	20

## RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar los cambios en variables de la fermentación anaerobia utilizando líquido ruminal como inóculo y altas concentraciones de selenio en los sustratos. Se realizaron dos experimentos de digestibilidad *in vitro*, utilizando la técnica de producción de gas por desplazamiento de agua. El diseño experimental fue en Bloques Completamente al Azar, donde el sustrato (alfalfa y dieta a base de grano) fue el criterio de bloqueo. En el experimento 1 se evaluaron 0, 0.3, 4, 8 y 12 mg Se kg MS<sup>-1</sup>; mientras, en el experimento 2 se evaluaron 0, 5, 20, 40 y 60 mg Se kg MS<sup>-1</sup>. Las variables de respuesta fueron volumen de gas producido (mL), pH y porcentaje de digestibilidad de la materia seca a las 72 h. El análisis estadístico se realizó con el procedimiento MIXED de SAS. Se observó efecto de la concentración de selenio sobre el volumen de gas producido, únicamente en el experimento 2, donde ocurrió una disminución lineal, principalmente con la dieta a base de grano ( $P \leq 0.01$ ). La producción de gas en el mismo experimento fue menor con 60 mg Se kg MS<sup>-1</sup> ( $P \leq 0.05$ ) en comparación con 0 y 5 mg. No hubo efecto sobre las demás variables ( $P > 0.05$ ). Bajo las condiciones del presente experimento se concluye que las concentraciones de Se utilizadas, específicamente 40 mg kg<sup>-1</sup> MS en dietas a base de grano o 60 mg kg<sup>-1</sup> MS en forrajes, afectan la producción de gas *in vitro*, aunque no la digestibilidad de la MS y el pH.

**Palabras clave:** producción de gas, pH, digestibilidad de la materia seca, selenito de sodio.

## SUMMARY

The objective of this study was to determine the changes in variables of anaerobic fermentation using rumen fluid as inoculum with high concentrations of selenium in substrates. Two *in vitro* experiments were conducted using the gas production technique by water displacement. The experimental design was a randomized complete block, wherein the substrate (alfalfa and grain-based diet) was the blocking criterion. In experiment 1 were evaluated 0, 0.3, 4, 8 and 12 mg Se kg<sup>-1</sup> DM; whereas, in experiment 2 were evaluated 0, 5, 20, 40 and 60 mg Se kg<sup>-1</sup> DM. The response variables were gas volume (mL), pH and percentage of dry matter digestibility at 72 hours. Statistical analysis was performed using the MIXED procedure of SAS. Effect of concentration of selenium on the volume of gas produced was observed, only in experiment 2, where a linear decrease occurred mainly with grain-based diet ( $P \leq 0.01$ ). The gas production in the same experiment was lower with 60 mg kg<sup>-1</sup>MS compared with 0 and 5 mg ( $P \leq 0.05$ ). There was no effect on the other variables ( $P > 0.05$ ). Under the conditions of this experiment, it is concluded that high concentrations of selenium, specifically 40 mg kg<sup>-1</sup> DM in grain-based diets or 60 mg kg<sup>-1</sup> DM in forages, affect *in vitro* gas production, but not the digestibility of DM and pH.

**Key words:** gas production, pH, digestibility of dry mater, sodium selenite.

## I. INTRODUCCIÓN

El Selenio (*Se*) es un elemento esencial para los rumiantes ya que su deficiencia provoca la enfermedad del músculo blanco en corderos y cabritos, atribuida a una baja actividad de la enzima Glutation Peroxidasa (Ramírez-Bribiesca *et al.*, 2001). Las bacterias ruminales influyen sobre la biodisponibilidad del *Se* consumido mediante asimilación y prevención de intoxicación (Stolz *et al.*, 2002). Primero, las bacterias *Se* inorgánico en forma de selenometionina, la cual es de mayor absorción intestinal (Koenig *et al.*, 1997). Segundo, las bacterias también reducen el *Se* inorgánico consumido a compuestos de menor absorción intestinal, como *Se* elemental y selenuro (Langlands *et al.*, 1986). Esta influencia de las bacterias ruminales sobre la biodisponibilidad del *Se* también repercute en la fermentación ruminal y la proporción de los productos de la misma. En estudios *in vitro* se ha observado mayor producción de ácidos grasos volátiles al adicionar 2 mg *Se* kg<sup>-1</sup> MS a partir de selenometionina en los medios de cultivo (Serra *et al.*, 1994b).

Por otro lado, la concentración máxima tolerable de *Se* en dietas para ovinos es de 5 mg kg<sup>-1</sup> MS (NRC, 2007); sin embargo, ovinos complementados hasta con 40 mg *Se* kg<sup>-1</sup> MS en la dieta por más de un año, no presentaron signos clínicos e histopatológicos de toxicidad, pero sí pérdida de peso sugiriendo menor degradación y utilización de los nutrientes. Por lo que altas concentraciones de *Se* pueden afectar negativamente la degradación microbiana del alimento y la utilización de los nutrientes.

Por tanto, el presente estudio tiene como objetivo determinar los cambios en variables de la fermentación anaerobia utilizando líquido ruminal como inóculo, mediante una prueba *in vitro* de producción de gas usando alfalfa y una dieta a base de grano como sustratos, con altas concentraciones de *Se*.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Función del *Se* en mamíferos

El *Se* fue descubierto por el químico sueco Jons Jacob Berzelius en 1817 y en 1957 reconocido como un elemento esencial para muchas formas de vida, incluyendo al hombre. El Selenito y selenato de algunos alimentos y agua son utilizados por las células de mamíferos como fuentes de *Se* que se reduce a selenuro por la glutatión-glutarredoxina y tiorredoxina. Se han identificado selenoproteínas tales como glutatión peroxidasas (GPX), tiorredoxina reductasas (TrxR) y desyodinasas (DI) que están implicados en las reacciones redox. Las selenoproteínas tienen funciones biológicas como oxido-reducción, señalización redox y antioxidantes participantes en el metabolismo de las hormonas tiroideas y la respuesta inmune (Lu y Holmgren, 2008).

Cuando se descubrió en 1970 que el *Se* es un constituyente de la enzima GPX se consideraba que la única función del elemento era como un antioxidante. Hallazgos posteriores han dejado claro que el *Se*, actúa a través de la expresión de una amplia gama de selenoproteínas, teniendo diversas funciones en el organismo animal (Rotruck *et al.*, 1973). Todas las funciones biológicas atribuidas al *Se* están mediadas por selenoproteínas, el elemento se incorpora en la estructura primaria de estas proteínas en forma de selenocisteína. Se han descubierto más de 40 aminoácidos diferentes, los cuales son componentes de diferentes selenoproteínas identificadas en algunos mamíferos (Arthur y Beckett, 1994).

Las selenoproteínas de los mamíferos se pueden clasificar principalmente en dos grupos de acuerdo con la ubicación de la selenocisteína. Un grupo de selenoproteínas posee la selenocisteína en un sitio muy cercano a la terminal C de la proteína, tales como TrxR y

selenoproteínas S, R, S, I y K. El otro grupo (incluyendo GPX, DI, y selenoproteínas H, M, N, T, V y W) tiene la selenocisteína en la parte N-terminal (Lu y Holmgren, 2008).

Actualmente, se conocen más de 30 selenoproteínas con actividad catalítica (Abd El Ghany y Tórtora-Pérez, 2010). Se han identificado cuatro GPX, las cuales reducen peróxido de hidrógeno y peróxido lipídico. Las DI son enzimas que participan en el metabolismo de las hormonas tiroideas. Las TrxR catalizan la producción de tiorredoxina reducida a partir de tiorredoxina oxidada, la cual es necesaria para varios sistemas dependientes de reacciones redox (por ejemplo, síntesis de *ADN* y regulación redox de factores de transcripción) y en la regulación del crecimiento celular e inhibición de apoptosis. La selenofosfato sintetasa participa en la síntesis de selenofosfato, donador de *Se* para la síntesis de selenocisteína (Behne y Kyriakopoulos, 2001). Otras proteínas con *Se* son la selenoproteína *P* que parece funcionar como transportadora de *Se* (Burk *et al.*, 2003) y la *W* que posiblemente actúe como antioxidante en músculo cardíaco y esquelético (Yeh *et al.*, 1997).

**Tiorredoxina reductasas (TrxR).** En células de mamíferos son miembros de la piridina nucleótido-disulfuro oxidoreductasa de la familia TrxR y tres han sido identificadas en mamíferos: TrxR1 en el citosol y/o núcleo, en la mitocondria TrxR2 y tiorredoxina reductasa de glutatión en los testículos, la última también posee glutatión y actividad glutarredoxina reductasa. TrxR es la única enzima capaz de reducir Trx oxidada. La Trx ofrece electrones a la ribonucleótido reductasa, que es esencial para la síntesis de ADN mediante la conversión de ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos. También se sabe que Trx reducida puede unirse e inhibir ASK1 (apoptosis signal regulating quinasa 1), por lo tanto, TrxRs están involucrados en el

control de la proliferación celular, la viabilidad y la apoptosis mediante el control de la actividad de Trx y estado redox (Lu y Holmgren, 2008).

**La glutatión peroxidasa (GPX)** En los seres humanos se han reportado cinco GPX que contienen Se: la GPX citosólica (GPX1), la GPX gastrointestinal específica (GPX2), la GPX del plasma (GPX3), el hidroperóxido de fosfolípido y GPX del epitelio (GPX4), que ésta también implicado en la maduración del espermatozoide y fertilidad masculina, ya que se ha encontrado que es un importante componente estructural de la cápsula del espermatozoide maduro como una enzima inactiva (Lu y Holmgren, 2008).

**Yodotironina desyodinasas (DI).** Se han identificado en diversos tejidos. La DI1 se encuentra principalmente en el hígado, riñón y tiroides; la DI2 en cerebro, pituitaria, tiroides, músculo esquelético y tejido adiposo; la DI3 se encuentra en la corteza cerebral y la piel, y es expresada a un nivel muy alto en útero y placenta durante el embarazo. La DI1 y DI2 catalizan la deiodinación de la tiroxina (T4), hormona tiroidea principal secretada por la glándula tiroides, y la convierten a la forma activa Tri-yodotironina (T3); la DI3 convierte T4 en T3 y también T3 en Di-yodotironina (T2). DI1 y DI2 también puede convertir y revertir T3 en Di-yodotironina (Lu y Holmgren, 2008).

Las selenoproteínas en bacterias Gram-positivas también se encuentran participando en procesos tales como la defensa antioxidante, el ciclo redox y la homeostasis redox. La Formiato deshidrogenasa cataliza la oxidación reversible de CO<sub>2</sub> a formiato y está implicado en el metabolismo energético, la fijación de carbono, la homeostasis del pH y las proteínas de defensa antioxidante en *Clostridium* ssp. A menudo, contienen enzimas para la defensa antioxidante, por

ejemplo, la metionina sulfóxido reductasa (MSR) reduce y oxida los residuos de metionina en las proteínas que surgen por la acción no deseada de especies reactivas del oxígeno (Stock y Rother, 2009).

## **2.2 Deficiencia de *Se* en rumiantes**

La deficiencia de *Se* es un serio problema a nivel mundial y se ha diagnosticado en varios países de América Latina (McDowell *et al.*, 1997) y en países de otros continentes (Finlandia, Nueva Zelanda, China, Estados Unidos y Japón; Henry y Ammerman, 1995). En México, se han encontrado suelos, forrajes y animales con deficiencia de *Se* en los estados de Veracruz, Hidalgo, Estado de México, Tlaxcala y Puebla (Ramírez-Briebiesca *et al.*, 2004).

La participación de las selenoproteínas en diversos procesos metabólicos puede explicar los trastornos clínicos relacionados con la deficiencia de *Se*. En rumiantes jóvenes la deficiencia de *Se* causa degeneración de los músculos estriados conocida como enfermedad del músculo blanco y es atribuida a una baja actividad de la *GPX*. En corderos y cabritos esta degeneración se considera la principal causa de muerte en los primeros 20 días de edad en áreas del centro de México con deficiencia de *Se* (Ramírez-Briebiesca *et al.*, 2001). En becerros la degeneración también afecta músculo cardíaco, ocurriendo la muerte por insuficiencia cardíaca (De Aluja y Adame, 1977).

La biodisponibilidad del *Se* para las plantas está determinada por las características del suelo (pH, textura, contenido de materia orgánica y condiciones redox), forma química del elemento y la presencia de otros iones competidores (Fordyce, 2007). La mayoría de los suelos en regiones

tropicales son ácidos, lo cual reduce la absorción de *Se* por las plantas al formarse complejos entre el hierro férrico y el selenito (McDowell *et al.*, 1997).

La deficiencia de *Se* conduce a una pérdida de actividad de las selenoproteínas, incluyendo TrxR, GPX y DI. La importancia de las selenoproteínas específicas en los tejidos específicos puede determinar la prioridad de los niveles de ARNm y expresión de proteínas, Por ejemplo, bajo condiciones de deficiencia de *Se*, las actividades disminuyen en la mayoría de las selenoproteínas en hígado, riñón y pulmón, mientras las actividades de las selenoproteínas en cerebro se mantienen a un nivel similar durante la suplementación de *Se* normal. Considerando que la deficiencia de *Se* conduce a una rápida disminución de ARNm y GPX1, los niveles de proteína en hígado, GPX fosfolípido e hidroperóxido ARNm TrxR se mantienen en niveles más altos (Lu y Holmgren, 2008).

Un ejemplo de grave deficiencia de *Se* provoca en el ser humano la enfermedad de Keshan, una forma potencialmente mortal de la miocardiopatía que primero fue encontrado en el noreste de China. La enfermedad se produce tras la deficiencia de *Se* en combinación con infección por virus *Coxsackie* B, evitándose a través de la suplementación de *Se* (Lu y Holmgren, 2008).

Una cardiomiopatía que se asemeja a la enfermedad de Keshan ocurre cuando GPX1 en ratones están infectados con una enfermedad benigna del virus *Coxsackie*, lo que sugiere que GPX1 está estrechamente asociada con la protección contra la infección por el virus.

Al menos tres selenoproteínas, TrxR1, TrxR2 y GPx4, están implicados en la embriogénesis ya que deleciones de los genes para estas proteínas en ratones resultan en la muerte embrionaria.

Todas las GPX1, DI1 y DI2 en ratones crecen, se desarrollan y se reproducen normalmente en condiciones de laboratorio. Sin embargo, GPX1 de ratones son más sensibles a paraquat y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inducida por el estrés oxidativo. DI2 de ratones han deteriorado la función auditiva y termogénesis así como defectos de la función cerebral leve y temporal, retraso en el crecimiento. Estos estudios revelan que las selenoproteínas juegan un papel crítico en la defensa antioxidante, la fertilidad, función tiroidea, metabolismo de las hormonas, las respuestas inmunes y el desarrollo muscular (Lu y Holmgren, 2008).

### **2.3 Metabolismo digestivo del Se en rumiantes**

Las bacterias ruminales incorporan Se inorgánico en su proteína principalmente en forma de selenometionina (Serra *et al.*, 1994a; Kim *et al.*, 1997; Koenig *et al.*, 1997), pero se ha encontrado selenocisteína y selenohomocisteína en cultivos de *Selenomonas ruminantium* y *Butyrivibrio fibrisolvens* (Hudman y Glenn, 1984; Hudman y Glen, 1985). Dicha incorporación es mayor cuando las dietas son deficientes en Se (Hidiroglou *et al.*, 1968). El Se incorporado en proteína bacteriana puede estar disponible para ser absorbido al llegar al intestino delgado (Hidiroglou *et al.*, 1968). Serra *et al.* (1997), lograron incrementar la concentración de Se en sangre (15%), corazón (27%), riñones (22%), cerebro (11%), pulmones y bazo (10%) y músculo (9%) en ratones, respecto a los testigo, a partir de masa bacteriana del rumen enriquecida con Se. La incorporación de Se en bacterias es menor en dietas a base de forraje y mayor en dietas a base de granos (Koenig *et al.*, 1997) lo cual puede deberse a la capacidad de las diferentes especies bacterianas predominantes en cada caso para incorporar Se. *Prevotella ruminicola*, predominante en dietas a base de forraje, no incorpora Se en selenoaminoácidos; mientras que *S. ruminantium* y *B. fibrisolvens* predominan en dietas a base de grano pueden incorporarlo (Hudman y Glenn, 1984; Hudman y Glen, 1985).

Las bacterias ruminales también reducen el *Se* inorgánico consumido a compuestos de menor biodisponibilidad para el animal (Langlands *et al.*, 1986). Se ha calculado que se utilizan dos moles de  $H^+$  por mol de selenito reducido a *Se* elemental, y un mol de  $H^+$  para reducir *Se* elemental a selenuro (Kim *et al.*, 1997). La cantidad de *Se* reducido aumenta con el consumo de materia orgánica (Langlands *et al.*, 1986).

Aparentemente, la incorporación y reducción de *Se* es diferente dependiendo de la especie bacteriana presente en el rumen. Se ha demostrado que *S. ruminantium* y *B. fibrisolvens* incorporan *Se* en forma de selenoaminoácidos, pero no así para el caso de *P. ruminicola*; sin embargo, las tres especies redujeron selenito a *Se* elemental (Hudman y Glenn, 1984; Hudman y Glen, 1985). Se ha propuesto que las bacterias anaerobias utilizan *Se* inorgánico como aceptor final de electrones durante su respiración, obteniéndose *Se* elemental insoluble no tóxico ( $Se^0$ ) en forma de partículas esféricas visibles al microscopio de barrido de electrones (Oremland *et al.*, 1989; Siddique *et al.*, 2007).

#### **2.4 Absorción, transporte y excreción de *Se***

La absorción de *Se* se produce principalmente en el extremo posterior del intestino delgado, la absorción total de *Se* en animales experimentales y el humano es del 80%, los compuestos orgánicos, tales como selenometionina, son absorbidos más eficientemente que las formas inorgánicas como selenito, con la captación en el tracto gastrointestinal del 90% de selenometionina en comparación con aproximadamente 60% de selenito (Stewart *et al.*, 1987).

La absorción de *Se* puede verse afectada por numerosos factores en la dieta, además de la forma química del elemento, se mejora la absorción por la presencia de proteína, vitamina E y

vitamina A, sin embargo se reduce con sulfuro, arsénico, mercurio y vitamina C (Fairweather-Tait, 1997).

El *Se* absorbido es transportado en la sangre desde el intestino hasta el hígado, allí se reduce a selenuro antes de ser transportado en la sangre unido a  $\alpha$  y  $\gamma$ -globulinas a diversos órganos y tejidos. El *Se* se incorpora entonces en selenoproteínas específicas como selenocisteína y no específicas como selenometionina, los niveles más altos de *Se* se depositan en los glóbulos rojos, hígado, bazo, corazón, uñas y dientes (esmalte). La excreción de *Se* es principalmente a través de la orina, con alguna pérdida en sudor, además en pequeñas cantidades se pierden a través de la bilis, páncreas y secreciones intestinales en las heces (Linder, 1988).

## **2.5 Consumo de *Se* complementario y utilización de nutrientes en rumiantes**

En estudios *in vitro* se ha observado mayor producción de ácidos grasos volátiles (AGV), hasta 47% al adicionar 2 ppm de *Se* a partir de selenometionina en los medios de cultivo (Kim *et al.*, 1997), concluyendo que la adición de *Se* puede afectar la fermentación ruminal. Sin embargo, en corderos consumiendo 0.2 ppm de *Se* inorgánico (selenito y selenato) no hubo efecto sobre la producción total de AGV ni la digestibilidad de nutrientes, pero se observó una correlación negativa entre la concentración de *Se* en líquido ruminal y la producción de masa bacteriana en rumen (Serra *et al.*, 1994b). Pero, en otro estudio la digestibilidad total de la fibra detergente neutra incrementó significativamente (34% respecto al testigo) con 0.1 ppm *Se* en la dieta, mientras que con 0.2 ppm de *Se* redujo hasta en 76% (Bravo y Bañuelos, 1994).

Los animales que reciben *Se* inorgánico tienden a tener una mayor concentración de *Se* y GPX en sangre, mientras que las ovejas alimentadas con *Se* orgánico tienden a mostrar mayores niveles de

*Se* en la biomasa ruminal (Panev *et al.*, 2013). Además, la administración de altas dosis de  $Se^0$  en ovinos mostraron disminución de la concentración de cobre en la sangre, lo que indica la posible interacción negativa entre el cobre y el *Se* (Panev *et al.*, 2013).

El aumento en la suplementación con levadura de *Se* en la dieta de vacas de 150 a 300 mg kg<sup>-1</sup> de materia seca de la dieta, aumento la concentración de AGV en el rumen y cambió el patrón de fermentación ruminal en mayor producción de propionato (Wang *et al.*, 2009). Los resultados sugieren que la levadura de *Se* modula los microorganismos o enzimas digestivas de una manera dependiente de la dosis de levadura de *Se* que era de aproximadamente 300 mg kg<sup>-1</sup> en las condiciones experimentales. También se sugiere que los suplementos de levadura de *Se* en las dietas de vacas lecheras en lactancia podrían ser una forma eficaz de aumentar el contenido de *Se* en la leche, para así desarrollar productos lácteos especiales, como leche enriquecida con *Se*.

## **2.6 Requerimiento y consumo máximo tolerable de *Se* para ovinos en crecimiento**

De acuerdo con el NRC (2007), el requerimiento de *Se* para ovinos en crecimiento depende del tipo de dieta, además de la ganancia diaria de peso. El coeficiente de absorción de *Se* es mayor con dietas a base de granos que con dietas a base de forraje (0.6 vs. 0.3). Así, para un cordero de 30 kg el consumo de *Se* recomendado es de 0.2 ppm con una dieta a base de grano, y de 0.4 ppm con una dieta a base de forraje, y disminuye al incrementar el peso del animal. De acuerdo a las regulaciones de la Administración de Alimentos y Drogas (FDA, por sus siglas en inglés) el *Se* suplementario puede adicionarse en dietas de ovinos a partir de selenito o selenato de sodio y levadura enriquecida con *Se*, sin aportar más de 0.3 ppm en las dietas integrales.

La concentración máxima tolerable de *Se* establecida para las dietas de rumiantes es de 5 ppm, pero se recomienda usar concentraciones más bajas para evitar acumulación excesiva del mineral en tejidos comestibles (NRC, 2005; NRC, 2007). Sin embargo, se han realizado estudios en ovinos para determinar la concentración máxima tolerable (Cristaldi *et al.*, 2005; Davis *et al.*, 2006a; Davis *et al.*, 2006b; Davis *et al.*, 2008).

En ovinos en crecimiento de un año de edad complementados hasta con 10 ppm durante un año, a partir de selenito de sodio, no mostraron signos clínicos de toxicidad ni lesiones tisulares; aunque animales en pastoreo pueden acumular más *Se* orgánico por más tiempo por lo que 10 ppm podría representar un riesgo de toxicidad por periodos de tiempo más prolongados (Cristaldi *et al.*, 2005). En ovejas complementadas hasta con 20 ppm de *Se* en la dieta durante 72 semanas no presentaron signos clínicos de toxicidad ni daños histopatológicos, aunque algunas ovejas que consumieron 16 y 20 ppm *Se* presentaron crecimiento anormal en pezuñas y caída de lana, por lo que con estos consumos de *Se* los animales pudieron estar ya sufriendo intoxicación (Davis *et al.*, 2006a). Mientras, en otro estudio se observó que el calostro y leche de ovejas complementadas hasta con 20 ppm en la dieta, durante la gestación y lactación, incrementó de manera significativa conforme incrementó la concentración de *Se* en la dieta, sin embargo, este incremento (3,542 y 2,228  $\mu\text{g Se L}^{-1}$ ) no fue lo suficientemente elevado para causar signos de toxicidad en los corderos (Davis *et al.*, 2006b).

Adicionalmente, en ovinos de dos años complementados hasta con 40 ppm de *Se* en la dieta por más de un año, se observó una tendencia lineal negativa del peso vivo conforme incrementaba la concentración de *Se* en la dieta, independientemente de la fuente (selenito de sodio o levadura enriquecida con *Se*) (Davis *et al.*, 2008). La mayoría de los animales ganaron peso, excepto los

animales con *Se* orgánico a concentraciones de 30 y 40 ppm, quienes perdieron peso a lo largo del estudio. Los valores bajos de peso vivo observados a medida que incrementaba la concentración de *Se* y la pérdida de peso con 30 y 40 ppm de *Se* orgánico podrían atribuirse a efectos tóxicos, sin embargo, no se observaron signos clínicos o evidencia histopatológica de toxicidad. Por tanto, es probable que con las mayores concentraciones de *Se* en la dieta ocurran cambios a nivel de población microbiana en el rumen, ya que las bacterias también son susceptibles a la toxicidad causada por *Se* (Sunde, 1997), afectándose la fermentación ruminal y la eficiencia de utilización de nutrientes con efectos directos sobre el peso vivo de los animales.

El aumento en la suplementación con *nano-selenio* con dosis de aproximadamente 3.0 g kg<sup>-1</sup> de materia seca de la dieta en ovejas incrementó la concentración de AGV en rumen y cambió el patrón de fermentación ruminal de acetato a propionato (Shi *et al.*, 2011).

### III. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general

Determinar los cambios en variables de la fermentación anaerobia utilizando líquido ruminal como inóculo, mediante una prueba *in vitro* de producción de gas usando alfalfa y una dieta a base de grano como sustratos, con altas concentraciones de *Se*.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Evaluar diferentes concentraciones de *Se* (4, 5, 8, 12, 20, 40 y 60 mg *Se* kg<sup>-1</sup> MS) en alfalfa y una dieta a base de grano, a través de una técnica de digestibilidad *in vitro* por producción de gas.
- Determinar los posibles cambios en la actividad fermentativa de las bacterias ruminales, mediante la medición de la producción acumulada de gas, digestibilidad *in vitro* de la materia seca y pH a las 72 horas de incubación, por efecto de la adición de altas concentraciones de *Se*.

#### IV. JUSTIFICACIÓN

El selenito de sodio es la fuente de *Se* inorgánico más utilizada en la alimentación de rumiantes. Aunque la FDA hace la recomendación de no exceder de 0.3 ppm *Se* en dietas integrales, el NRC establece 5 ppm como nivel máximo tolerable de *Se* para la dieta en ovinos. Por otro lado, en la literatura hay evidencia de que con 40 ppm de *Se* no se observan signos de toxicidad en ovinos, indicando que probablemente el nivel máximo tolerable sea superior al establecido. En concentraciones de 30 o más ppm se ha observado una disminución del peso vivo en machos de dos años de edad. Este efecto negativo en el peso vivo podría estar asociado a cambios en la actividad fermentativa de las bacterias ruminales debido a que son susceptibles a intoxicarse con concentraciones altas de *Se*. Por tanto, es necesario determinar la concentración de *Se* a la cual la fermentación ruminal se ve afectada.

#### V. HIPÓTESIS

Concentraciones mayores a 5 mg *Se* Kg<sup>-1</sup> MS adicionadas a dietas para ovinos en etapas de crecimiento afectan la fermentación *in vitro* de las bacterias ruminales, reflejándose en la producción de gas total, pH y digestibilidad de la materia seca.

## VI. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Localización

Este trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Nutrición Animal del Área Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, en el Instituto de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

### 6.2 Diseño experimental

Se realizaron dos experimentos que consistieron en una prueba de digestibilidad *in vitro* cada uno, utilizando una técnica de producción de gas por desplazamiento de agua (Williams, 2000).

**Cuadro 1. Tratamientos experimentales en función de la concentración de selenio a partir de selenito de sodio en la dieta.**

Tratamiento	Experimento 1	Experimento 2
1	0 mg <i>Se</i> kg <sup>-1</sup> <i>MS</i> o tratamiento Testigo negativo	0 mg <i>Se</i> kg <sup>-1</sup> <i>MS</i> o tratamiento Testigo negativo
2	0.3 mg <i>Se</i> kg <sup>-1</sup> <i>MS</i> o tratamiento Testigo positivo	5 mg <i>Se</i> kg <sup>-1</sup> <i>MS</i> o tratamiento Testigo positivo
3	4 mg <i>Se</i> kg <sup>-1</sup> <i>MS</i>	20 mg <i>Se</i> kg <sup>-1</sup> <i>MS</i>
4	8 mg <i>Se</i> kg <sup>-1</sup> <i>MS</i>	40 mg <i>Se</i> kg <sup>-1</sup> <i>MS</i>
5	12 mg <i>Se</i> kg <sup>-1</sup> <i>MS</i>	60 mg <i>Se</i> kg <sup>-1</sup> <i>MS</i>

Testigo negativo: sin selenio complementario; Testigo positivo: selenio complementario a la concentración recomendada por FEDNA (0.3 mg *Se* kg<sup>-1</sup> *MS*) o la máxima tolerable para ovinos (NRC, 2007; 5 mg *Se* kg<sup>-1</sup> *MS*).

El diseño experimental pero cada experimento fue un Diseño en Bloques Completamente al Azar, utilizando como criterio de bloqueo el sustrato: heno de alfalfa y una dieta a base de grano. Cada tratamiento recibió una concentración diferente de *Se* en los sustratos (Cuadro 1), la mayoría por arriba de la concentración máxima tolerable establecida para rumiantes (NRC, 2005).

Para el experimento 1 se utilizaron cinco repeticiones por tratamiento en cada bloque y nueve blancos; mientras, para el experimento 2 se utilizaron cuatro repeticiones por tratamiento en cada bloque y doce blancos. Las unidades experimentales fueron viales de vidrio de 120 mL los cuales se identificaron numéricamente (Figura 1) y se asignaron aleatoriamente a los tratamientos experimentales.



**Figura 1.** Vial de vidrio de 120 mL con boca de 20 mm utilizado para la incubación de los sustratos por la técnica de producción de gas.

### 6.3 Prueba de Digestibilidad *in vitro*

#### 6.3.1 Preparación del inóculo

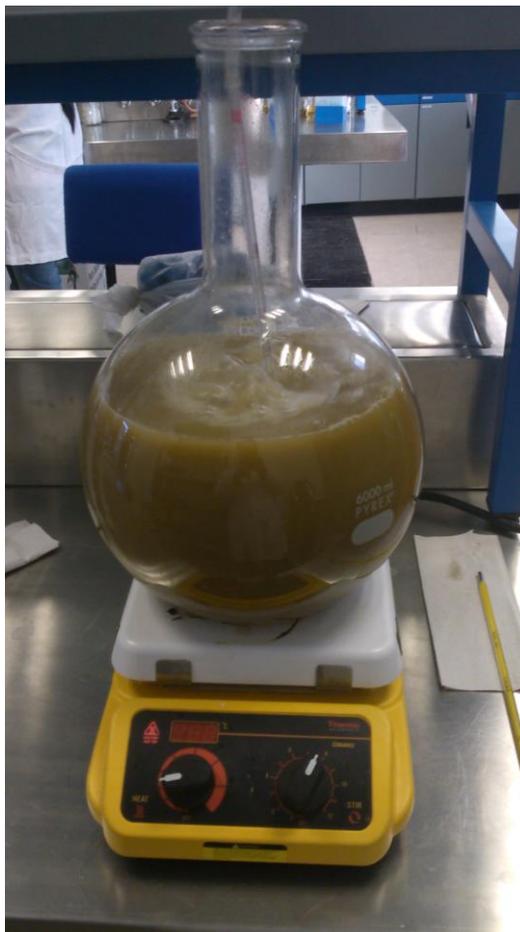
Un día previo al inicio de las pruebas, se preparó una solución amortiguadora de pH, dos soluciones minerales, una solución reductora y una solución de rezaurina (ver Anexo1). El inóculo se preparó mezclando dichas soluciones en un matraz de bola de fondo plano de 6 litros de capacidad en una parrilla de agitación, regulando la temperatura a 39 °C (Cuadro 2).

**Cuadro 2. Composición del inóculo utilizado para la incubación *in vitro* de los sustratos por la técnica de producción de gas.**

Componente	Volumen para 50 muestras (mL)
Solución amortiguadora, mL	332.86
Solución macro-mineral, mL	332.86
Solución micro-mineral, mL	0.17
Resazurina, mL	1.71
Agua destilada, mL	665.73
Líquido ruminal, mL	666.67
Solución reductora, mL	66.67
Total, mL	2,066.67

Adicionalmente, se utilizó líquido ruminal fresco extraído de tres cabras adultas de la raza Alpina, a través de cánula ruminal, alimentadas con 400 g de un concentrado a base de grano de sorgo y grano seco de destilería por animal por día y heno de alfalfa a libre acceso. El líquido

ruminal se obtuvo a las tres horas postprandial utilizando una bomba de vacío (Marca Felisa), depositándolo en un termo a una temperatura de 39 °C en el interior. En el laboratorio, el líquido ruminal se filtró a través de cuatro capas de manta de cielo para eliminar las partículas de alimento. Posteriormente, se mezcló la cantidad indicada con el resto de las soluciones bajo flujo constante de CO<sub>2</sub> y manteniendo la temperatura constante a 39 °C (Figura 2).



**Figura 2.** Preparación del inóculo para la incubación de los sustratos por la técnica de producción de gas.

### 6.3.2 Inoculación e incubación

Se agregó un volumen de 40 mL del inóculo a cada uno de los viales, los cuales contaban con una cantidad de 0.5 g de los sustratos (molidos a 1 mm de tamaño de partícula) y 0.5 mL de una solución de selenito de sodio preparada en función de los tratamientos (Cuadro 3). Posteriormente, se agregó CO<sub>2</sub> por 10 s y se colocó un tapón de hule sólido con un aro de aluminio para sellar. Conforme se realizó la inoculación, se agitaron suavemente para mezclar el inóculo con el sustrato. Finalmente, la incubación se realizó a 39 °C por 72 horas en una estufa de cultivo celular (Marca Thermo Electron Corporation).

**Cuadro 3. Concentración de selenio en las soluciones preparadas en función de los tratamientos experimentales.**

<b>Tratamiento</b>	<b>Experimento 1</b>	<b>Experimento 2</b>
1	Agua destilada	Agua destilada
2	0.3 mg Se L <sup>-1</sup>	5 mg Se L <sup>-1</sup>
3	4 mg Se L <sup>-1</sup>	20 mg Se L <sup>-1</sup>
4	8 mg Se L <sup>-1</sup>	40 mg Se L <sup>-1</sup>
5	12 mg Se L <sup>-1</sup>	60 mg Se L <sup>-1</sup>

### 6.3.3 Registro de la producción de gas

La producción de gas se registró a las 3, 8, 24, 48 y 72 horas en el primer experimento, y a las 5, 10, 24, 48 y 72 horas en el segundo experimento. El volumen de gas se registró mediante un sistema de desplazamiento de agua elaborado con una bureta de 100 mL conectada en la parte inferior a un embudo de cuello largo mediante manguera de látex, sujetos ambos en un soporte

universal; en su parte superior de la bureta se colocó una sonda para aplicación de suero provista de una aguja del No. 17. Una vez ajustado el nivel de agua a cero en la bureta, la aguja era insertada en los viales incubados a través del tapón de hule, con lo cual se permite la salida del gas contenido en el vial y, por tanto, el desplazamiento del agua contenida en la bureta (Figura 3).



**Figura 3.** Sistema de medición de gas por desplazamiento de agua.

#### *6.3.4 Obtención de muestras y residuo no degradado*

A las 72 horas de incubación y posterior al último registro del volumen de gas, se colocaron los viales de incubación en refrigeración a 4 °C por 30 minutos para detener la actividad microbiana. Posteriormente, se retiró el aro de aluminio y el tapón de hule, y se transfirió el contenido de cada

vial a tubos Falcon de 50 mL (previamente pesados en balanza analítica) y se centrifugaron a 5,000 rpm por 10 min a 4 °C (centrifuga refrigerada Marca Hermle). Posteriormente, se midió el pH del sobrenadante con un potenciómetro de mesa (Marca Hanna). Finalmente, el sobrenadante se eliminó por decantación.

Por otro lado, se enjuagó con agua destilada cada vial de incubación para recuperar la totalidad del material residual, transfiriéndose a los tubos Falcon para repetir el proceso de centrifugación. Se eliminó el sobrenadante por decantación y el resto de la humedad se evaporó en horno de secado (Marca Terlab) a 60 °C por 72 horas. Se registró el peso del tubo con la materia seca residual en balanza analítica, para finalmente calcular el peso de la materia seca residual restando el peso del tubo.

#### **6.4 Variables de respuesta**

Las variables de respuesta fueron:

- a) Volumen acumulado de gas por gramo de materia seca incubada

Primero, se corrigió el volumen de gas producido a cada tiempo de incubación de cada muestra restándoles el volumen de gas producido en los frascos blancos, mediante la siguiente fórmula:

$$VC = VM - VB$$

Donde:

VC = Volumen de gas corregido a cada tiempo de incubación

VM = Volumen de gas de cada muestra a cada tiempo de incubación

VB = Promedio del volumen de gas de los blancos a cada tiempo de incubación

Posteriormente, para obtener el volumen acumulado de gas producido por gramo de MS incubado, se sumó el volumen de gas producido en cada tiempo de incubación con el volumen de gas producido en el tiempo de incubación previo y dividiendo el resultado entre el peso seco de la muestra inicial.

$$VA = \frac{VC_t + VC_{t-1}}{PSM}$$

Donde:

VA = Volumen de gas acumulado en cada tiempo de incubación

VC<sub>t</sub> = Volumen de gas corregido a cada tiempo de incubación

VC<sub>t-1</sub> = Volumen de gas corregido al tiempo de incubación previo

b) Digestibilidad de la materia seca

Esta variable se obtuvo restando el peso de la materia seca inicial menos el peso de la materia seca del residuo, dividiendo el resultado entre el peso de la materia seca inicial y multiplicando por 100:

$$DMS = \left( \frac{MSI - MSR}{MSI} \right) * 100$$

Donde:

DMS = Digestibilidad de la Materia Seca (%)

MSI = Peso de la materia seca inicial (g)

MSR = Peso de la materia seca residual (g)

c) pH de los medios a los 72 h. Se obtuvo midiendo el pH de los medios a las 72 horas de incubación.

## 6.5 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa SAS para Windows versión 9.0 (SAS, 2002). Para la variable de volumen acumulado de gas producido, primero se realizó un análisis de varianza utilizando modelos mixtos, utilizando el procedimiento MIXED (Littell *et al.*, 1996), en el cual se consideró como efectos fijos la concentración de *Se* complementario, el sustrato, el tiempo de incubación, y sus interacciones dobles y triples; mientras que los efectos aleatorios fueron la repetición y el error experimental (Modelo 1).

Dado que, en el experimento 2 la triple interacción fue significativa ( $P \leq 0.01$ ), se realizó un análisis de varianza para cada tiempo de incubación, donde los efectos fijos fueron la concentración de *Se* complementario, el sustrato, y su interacción; mientras que los efectos aleatorios fueron la repetición y el error experimental (Modelo 2). Este último análisis también fue realizado para la digestibilidad de la materia seca y el pH a las 72 horas de incubación.

Para todas las variables, las medias de mínimos cuadrados se obtuvieron con el enunciado LSMEANS. Se utilizaron polinomios ortogonales para determinar la respuesta lineal y cuadrática de las medias de los tratamientos. Se compararon las medias de los tratamientos testigo negativo y testigo positivo contra las medias de los demás tratamientos con el enunciado PDIFF.

A continuación se presentan los modelos estadísticos utilizados:

$$y_{ijkl} = \mu + Se_i + S_j + Se * S_{ij} + T_k + Se * T_{ik} + S * T_{jk} + Se * S * T_{ijk} + R_l + e_{ijkl} \dots\dots\dots \text{Modelo 1}$$

$$y_{ijk} = \mu + Se_i + S_j + Se * S_{ij} + R_k + e_{ijk} \dots\dots\dots \text{Modelo 2}$$

Donde:

$y =$  Variable de respuesta.

$\mu =$  Media general.

$Se_i =$  Efecto fijo de la  $i$ -ésima concentración de  $Se$  complementario ( $i = 1, 2, 3, 4$  y  $5$ ).

$S_j =$  Efecto fijo del  $j$ -ésimo sustrato ( $j = 1, 2$ ).

$Se * S_{ij} =$  Efecto fijo de la interacción entre la  $i$ -ésima concentración de  $Se$  complementario y el  $j$ -ésimo sustrato.

$T_k =$  Efecto fijo del  $k$ -ésimo tiempo de incubación ( $k = 1, 2, 3, 4, 5$ ).

$Se * T_{ik} =$  Efecto fijo de la interacción entre la  $i$ -ésima concentración de  $Se$  complementario y el  $k$ -ésimo tiempo de incubación.

$S * T_{jk} =$  Efecto fijo de la interacción entre el  $j$ -ésimo sustrato y el  $k$ -ésimo tiempo de incubación.

$Se * S * T_{ijk} =$  Efecto fijo de la interacción triple entre la  $i$ -ésima concentración de  $Se$  complementario, el  $j$ -ésimo sustrato y el  $k$ -ésimo tiempo de incubación.

$R_l =$  Efecto aleatorio asociado a la  $k$ -ésima repetición.

$e_{ijkl} =$  Efecto aleatorio asociado al error experimental.

## VII. RESULTADOS

### 7.1 Producción acumulada de gas

En los cuadros 4 y 5 se presentan las medias de mínimos cuadrados de la producción de gas acumulada por gramo de MS incubada en los experimentos 1 y 2, respectivamente. En ambos experimentos se observó un efecto principal del tiempo de incubación ( $P \leq 0.01$ ), dado que se trata de producción acumulada en el tiempo.

En el experimento 1, la producción de gas acumulada no fue diferente por efecto de la concentración de *Se* complementario ( $P > 0.05$ ), tampoco se observó interacción entre tratamiento con respecto al tiempo o con sustrato, ni interacción triple de estos factores ( $P > 0.05$ ). Sin embargo, se observó una disminución cuadrática de las medias con la alfalfa a las 72 h cuando se usó una concentración de 0.4 mg de *Se* complementario ( $P \leq 0.05$ ).

En contraste, en el experimento 2 se observó efecto de tratamiento sobre la producción de gas acumulada ( $P \leq 0.01$ ). También, se observó interacción triple de tratamientos con sustrato y tiempo ( $P \leq 0.01$ ), lo cual indica que la concentración de *Se* afectó de forma diferente la producción de gas dependiendo del tiempo y del sustrato utilizado (Cuadro 4). En este experimento, se observó interacción doble de tratamiento con sustrato ( $P \leq 0.01$ ) a las 10 horas de incubación. De esta forma, se encontró una disminución lineal del volumen de gas producido con 60 mg de *Se*, la cual fue más significativa con la dieta a base de grano (desde las 10 horas de incubación,  $P \leq 0.01$ ) que con la alfalfa ( $P < 0.10$  a partir de las 24 horas). Esta disminución fue suficiente para que las medias del volumen de gas producido con alfalfa fueran significativamente menores con 60 mg de *Se* que con 0 y 5 mg a las 48 y 72 horas ( $P \leq 0.05$ ), y con dieta a las 10, 24, 48 y 72 horas de incubación ( $P \leq 0.01$ ), aunque con este último sustrato también se observó significancia en las diferencias 0 vs. 20 y 0 vs. 40 mg a las 48 horas ( $P \leq 0.05$ ).

**Cuadro 4. Medias de mínimos cuadrados ( $\pm$  EE) del volumen acumulado de gas producido ( $\text{mL g}^{-1}$  MS) con alfalfa y una dieta a base de grano, con altas concentraciones de Se. Experimento 1.**

Tiempo (h) <sup>t</sup>	Concentración de Se ( $\text{mg kg}^{-1}$ MS)												$P > t$			
	Alfalfa						Dieta						EE <sup>1</sup>			
	0	0.3	4	8	12	0	0.3	4	8	12	L <sup>2</sup>	C <sup>3</sup>	L <sup>2</sup>	C <sup>3</sup>	L <sup>2</sup>	C <sup>3</sup>
3	28.58	28.08	27.68	26.71	27.60	29.30	31.16	28.87	30.92	27.24	4.02	0.79	0.93	0.73	0.90	
8 <sup>d</sup>	65.42	63.68	62.68	63.15	63.37	90.89	92.79	90.52	92.72	86.48	4.02	0.71	0.72	0.48	0.70	
24 <sup>d</sup>	154.54	152.44	147.67	150.57	150.36	193.00	193.36	192.17	192.36	187.49	4.02	0.42	0.33	0.35	0.69	
48 <sup>d</sup>	194.85	191.71	187.17	191.75	190.15	243.08	244.09	241.71	240.37	238.40	4.02	0.46	0.28	0.31	0.84	
72 <sup>d</sup>	211.79	209.16	199.95	209.93	208.28	264.40	266.93	264.43	262.30	262.20	4.02	0.62	0.04	0.48	0.81	

Abreviaturas: <sup>1</sup>Error estándar de la media; <sup>2</sup>Respuesta lineal de las medias de los tratamientos; <sup>3</sup>Respuesta cuadrática de las medias de los tratamientos.

Efectos: <sup>d</sup>Efecto principal de sustrato ( $P \leq 0.01$ ); <sup>e</sup>Efecto principal de tiempo de incubación ( $P \leq 0.01$ ).

**Cuadro 5. Medias de mínimos cuadrados ( $\pm$  EE) del volumen acumulado de gas producido ( $\text{mL g}^{-1}$  MS) con alfalfa y una dieta a base de grano, con altas concentraciones de Se. Experimento 2.**

Tiempo (h) <sup>t</sup>	Concentración de Se ( $\text{mg kg}^{-1}$ MS)												$P > t$								
	Alfalfa				Dieta				EE <sup>1</sup>					Alfalfa				Dieta			
	0	5	20	40	60	0	5	20	40	60	L <sup>2</sup>	C <sup>3</sup>		L <sup>2</sup>	C <sup>3</sup>	L <sup>2</sup>	C <sup>3</sup>	L <sup>2</sup>	C <sup>3</sup>		
5 <sup>b</sup>	55.96	55.21	54.05	57.63	54.10	24.96	26.36	25.98	27.84	23.74	4.62	0.93	0.86	0.94	0.76						
10 <sup>b,df</sup>	120.97	120.22	116.52	121.71	112.31	90.86 <sup>k,n</sup>	88.76 <sup>s</sup>	79.58	77.07	61.58	4.62	0.30	0.98	<0.01	0.54						
24 <sup>b,d</sup>	174.78	173.47	166.16	174.90	160.46	195.53 <sup>n</sup>	190.19 <sup>f</sup>	186.23	185.42	175.50	4.62	0.08	0.80	<0.01	0.89						
48 <sup>b,d</sup>	204.64 <sup>m</sup>	202.31 <sup>f</sup>	195.91	206.60	188.15	254.18 <sup>k,n</sup>	248.87 <sup>f</sup>	240.93	241.73	233.96	4.62	0.07	0.93	<0.01	0.56						
72 <sup>a,d</sup>	217.08 <sup>n</sup>	214.54 <sup>f</sup>	208.65	219.62	199.21	277.11 <sup>n</sup>	272.25 <sup>m</sup>	265.69	267.54	257.84	4.62	0.05	0.93	<0.01	0.74						

**Abreviaturas:** <sup>t</sup>Error estándar de la media; <sup>2</sup>Respuesta lineal de las medias de los tratamientos; <sup>3</sup>Respuesta cuadrática de las medias de los tratamientos.

**Efectos:** <sup>a</sup>Efecto principal de tratamiento ( $P \leq 0.05$ ); <sup>b</sup>Efecto principal de tratamiento ( $P \leq 0.01$ ); <sup>d</sup>Efecto principal de sustrato ( $P \leq 0.01$ ); <sup>f</sup>Efecto de la interacción tratamiento\*sustrato ( $P \leq 0.01$ ); <sup>h</sup>Efecto principal de tiempo de incubación ( $P \leq 0.01$ ).

**Diferencias significativas:** <sup>1</sup>0 vs 20 ( $P \leq 0.05$ ); <sup>2</sup>0 vs 40 ( $P \leq 0.05$ ); <sup>3</sup>0 vs 60 ( $P \leq 0.05$ ); <sup>4</sup>0 vs 60 ( $P \leq 0.01$ ); <sup>5</sup> vs 60 ( $P \leq 0.05$ ); <sup>5</sup> vs 60 ( $P \leq 0.01$ ).

**Cuadro 6. Medias de mínimos cuadrados ( $\pm$  EE) de la digestibilidad de la materia seca (%) y pH a las 72 horas de incubación de alfalfa y una dieta a base de grano, con altas concentraciones de Se. Experimento 1.**

Variable	Concentración de Se ( $\text{mg kg}^{-1}$ MS)												$P > t$				
	Alfalfa			Dieta			EE <sup>1</sup>			Alfalfa				Dieta			
	0	0.3	4	8	12	0	0.3	4	8	12	L <sup>2</sup>	C <sup>3</sup>	L <sup>2</sup>	L <sup>2</sup>	C <sup>3</sup>	L <sup>2</sup>	C <sup>3</sup>
Dig <sup>d</sup>	59.66	58.69	58.99	59.34	58.25	70.00	68.34	68.65	69.09	69.24	0.70	0.33	0.96	0.73	0.26		
pH <sup>d</sup>	6.60	6.61	6.61	6.60	6.60	6.37	6.35	6.35	6.34	6.35	0.01	0.61	0.43	0.20	0.43		

Abreviatura: <sup>1</sup>Error estándar de la media; <sup>2</sup>Respuesta lineal de las medias de los tratamientos; <sup>3</sup>Respuesta cuadrática de las medias de los tratamientos; Dig = Digestibilidad.

Efectos: <sup>d</sup>Efecto principal de sustrato ( $P \leq 0.01$ ).

**Cuadro 7. Medias de mínimos cuadrados ( $\pm$  EE) de la digestibilidad de la materia seca (%) y pH a las 72 horas de incubación de alfalfa y una dieta a base de grano, con altas concentraciones de Se. Experimento 2.**

Variable	Concentración de Se ( $\text{mg kg}^{-1}$ MS)												<i>P</i> > <i>t</i>		
	Alfalfa				Dieta				EE <sup>1</sup>						
	0	5	20	40	60	0	5	20	40	60	L <sup>2</sup>	C <sup>3</sup>		L <sup>2</sup>	L <sup>2</sup>
Dig (%) <sup>d</sup>	60.55	61.39	62.96	65.49	63.08	76.77	77.86	78.01	78.21	82.81	2.50	0.26	0.71	0.15	0.61
pH <sup>d</sup>	6.70	6.70	6.72	6.68	6.71	6.38	6.38	6.36	6.41	6.40	0.02	0.93	0.73	0.41	0.48

Abreviatura: <sup>1</sup>Error estándar de la media; <sup>2</sup>Respuesta lineal de las medias de los tratamientos; <sup>3</sup>Respuesta cuadrática de las medias de los tratamientos; Dig = Digestibilidad.

Efectos: <sup>d</sup>Efecto principal de sustrato ( $P \leq 0.01$ ).

### **Digestibilidad de la materia seca y pH a las 72 horas de incubación**

En los Cuadros 6 y 7 se presenta el porcentaje de digestibilidad de la MS y el pH a las 72 horas de incubación de los dos sustratos, para los experimentos 1 y 2, respectivamente. En ambos experimentos, estas variables no fueron diferentes por efecto de los tratamientos ( $P > 0.05$ ). Tampoco se observó interacción de tratamiento con sustrato ( $P > 0.05$ ), pero si se observó efecto de sustrato ( $P \leq 0.01$ ), observándose mayor digestibilidad de la MS de la dieta en comparación con la digestibilidad de la MS del heno de alfalfa, debido al contenido de almidones de alta degradabilidad en dietas a base de grano (Owens *et al.*, 1998).

## VIII. DISCUSIÓN

Existe poca literatura referente al efecto del *Se* sobre la producción de gas en estudios *in vitro*, pero Vázquez *et al.* (2010) sugieren que la adición de minerales como el Cobre y Zinc en la dieta de cabras Boer en crecimiento modifica la fermentación ruminal, debido a que aumenta el volumen de producción de gas *in vitro*, lo cual no ocurrió en el presente experimento.

En el presente estudio, las concentraciones de *Se* utilizadas en el experimento 1 no fueron suficientes para provocar cambios en las variables de la fermentación estudiadas, lo cual puede significar que 12 mg *Se* kg<sup>-1</sup> MS no es una concentración que afecte la fermentación ruminal. Estos resultados pueden relacionarse con los encontrados por Cristaldi *et al.* (2005), quienes no observaron signos de toxicidad en ovinos en crecimiento. Las bacterias ruminales son capaces de reducir *Se* inorgánico a formas químicas (selenuro y *Se* elemental) que no representan riesgo de toxicidad para los rumiantes por que no pueden absorberse en intestino delgado (Langlands *et al.*, 1986). Si las bacterias se intoxican con *Se* y mueren, disminuye esta reducción, incrementando el riesgo de intoxicación ya que se absorberá mayor cantidad del *Se* consumido por el animal.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el experimento 2, concentraciones de *Se* mayores a las utilizadas en el experimento 1, provocan cambios importantes en la producción de gas, aunque no en la digestibilidad de la MS y el pH. Este efecto pudo estar influenciado por el tipo de sustrato, de tal manera que con alfalfa se observó menor volumen de gas producido con 60 mg *Se* kg<sup>-1</sup> MS, mientras que con la dieta la reducción fue lineal, siendo significativamente menor con 40 y 60 mg *Se* kg<sup>-1</sup> MS, respecto a los testigos.

Los resultados del experimento 2 se pueden relacionar con los reportados por otros investigadores. Davis *et al.* (2008) observaron en ovinos que el peso disminuía a medida que se

incrementaba el consumo de *Se* hasta 40 mg kg<sup>-1</sup> MS, siendo los animales más afectados aquellos con un consumo de 30 y 40 mg *Se* kg<sup>-1</sup> MS. Por tanto, es posible que 40 o 60 mg *Se* kg<sup>-1</sup> MS sean concentraciones tóxicas para las bacterias ruminales, inhibiendo su proliferación y su actividad fermentadora, disminuyendo la tasa de pasaje del alimento y, por tanto, el consumo de alimento, por lo que los animales pueden dejar de ganar peso o incluso perderlo.

Por otro lado, existe evidencia de que el metabolismo ruminal del *Se* es diferente dependiendo del tipo de alimento consumido. Las bacterias ruminales incorporan mayor cantidad de *Se* con dietas concentradas que con dietas a base de forraje (Koenig *et al.*, 1997) y esto se asocia al tipo de bacterias que proliferan en cada caso, bacterias que proliferan en dietas a base de forraje (como *Prevotella ruminicola*) no incorporan *Se*, mientras que bacterias que proliferan con dietas concentradas (como *S. ruminantium* y *B. fibrisolvans*) si lo hacen (Hudman y Glenn, 1984; Hudman y Glen, 1985). También, Koenig *et al.* (1997) encontraron mayor digestibilidad de *Se* con dietas a base de grano (63.7%) que con dietas a base de forraje (36.6%), por lo que las recomendaciones del NRC (2007) indican menor requerimiento de *Se* con dietas a base de grano y mayor con dietas a base de forraje. De esta manera, es posible que la diferencia encontrada en el experimento 2 del presente estudio, respecto al volumen de gas producido, también sea debida al tipo de bacterias predominantes.

Algunas bacterias y hongos pueden producir dimetilselenuro, un compuesto de *Se* muy volátil, por metilación de *Se* inorgánico (Thompson-Eagle *et al.*, 1989). En rumen la producción de dimetilselenuro es elevada y la cantidad de *Se* eliminado por esta vía puede ser superior que la eliminada por heces y orina (Lopez *et al.*, 1969). Por lo tanto, es probable que el *Se* desaparecido en rumen no sea absorbido, sino que sea eliminado por volatilización a través del eructo, lo que

hace suponer que el volumen de gas producido en este estudio también tenga que ver con la cantidad de dimetilselenuro producido por algunas bacterias.

Respecto a la digestibilidad de la MS, no existió respuesta en función de los tratamientos, solamente se encontró efecto de sustrato. El factor más importante en la digestibilidad de los sustratos es la composición de cada uno de ellos debido a que el almidón es un polímero de moléculas de D-glucosa ordenadas como una cadena lineal con enlaces glucosídicos  $\alpha$  1, 4 en la amilosa, o con ramificaciones que se inician en uniones glucosídicas  $\alpha$  1, 6 en la amilopectina. Igualmente todos estos enlaces en el almidón, por ser de tipo alfa, son desdoblados tanto por los microorganismos amilolíticos del rumen como por la amilasa pancreática del animal (Relling *et al.*, 2003). La digestibilidad ruminal del almidón depende en gran medida de la facilidad con que acceden a él las bacterias amilolíticas, en el caso de la alfalfa predomina la fibra, carbohidratos estructurales (celulosa y hemicelulosa) que son difíciles de degradar por las bacterias ruminales (Relling *et al.*, 2003).

En cuanto al pH, Naziroglu *et al.* (1997) observaron menor pH ruminal en corderos alimentados con 0.3 ppm de Se respecto al testigo, lo cual difiere con lo observado en el presente estudio. Sin embargo, la dieta provocó menor pH ruminal, lo cual se debe a que el pH disminuye cuando el consumo de carbohidratos de fácil fermentación incrementa (Owens *et al.*, 1998). El tipo de carbohidrato predominante en la dieta condiciona el desarrollo del tipo de flora adecuada para su fermentación y el ajuste del pH a su rango ideal. Así, una ración rica en almidón es fermentada por una flora amilolítica que desarrolla mejor a un pH de 5.5 a 6.0 mientras que una ración compuesta por forraje con alto contenido de carbohidratos estructurales (celulosa, hemicelulosa y pectinas) será fermentada por una flora celulolítica que desarrolla mejor en un pH de 6.0 a 6.9 (Relling *et al.*, 2003).

## **IX. CONCLUSIÓN**

Bajo las condiciones en que se realizó el presente estudio y en base a los resultados obtenidos, se puede concluir que las concentraciones de *Se* utilizadas, específicamente 40 mg *Se* kg<sup>-1</sup> MS en dietas a base de grano o 60 mg *Se* kg<sup>-1</sup> MS en forrajes, afectan la producción de gas *in vitro*, aunque no la digestibilidad de la MS y el pH final.

## X. BIBLIOGRAFÍA

- Abd El Ghany, H. and J.L. Tórtora-Pérez. 2010. The importance of selenium and the effects of its deficiency in animal health. *Small Rum. Res.* 89: 185–192.
- Arthur, J.R. and G.J. Beckett. 1994. Newer aspects of micronutrients in at risk groups. New metabolic roles for selenium. *Proc. Nutr. Soc.* 53: 615–624.
- Behne, D. and A. Kyriakopoulos. 2001. Mammalian selenium-containing proteins. *Annu. Rev. Nutr.* 21: 453-473.
- Bravo M., E., y J. Bañuelos L. 1994. Comportamiento de ovinos suplementados con selenio. Tesis Profesional. Departamento de Zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Méx. 80 p.
- Burk, R.F., K.E. Hill, and A.K. Motley. 2003. Selenoprotein metabolism and function: evidence for more than one function for Selenoprotein P. *J. Nutr.* 133: 1517S-1520S.
- Cristaldi, L.A., L.R. McDowell, C.D. Buergelt, P.A. Davis, N.S. Wilkinson, and F.G. Martin. 2005. Tolerance of inorganic selenium in wether sheep. *Small Rum. Res.* 56: 205-213.
- Davis, P.A., L.R. McDowell, N.S. Wilkinson, C.D. Buergelt, R. Van Alstyne, R.N. Weldon and T.T. Marshall. 2006a. Tolerance of inorganic selenium by range-type ewes during gestation and lactation. *J. Anim. Sci.* 84: 660-668.
- Davis, P.A., L.R. McDowell, N.S. Wilkinson, C.D. Buergelt, R. Van Alstyne, R.N. Weldon, and T.T. Marshall. 2006b. Effects of selenium levels in ewe diets on selenium in milk and the plasma and tissue selenium concentrations of lambs. *Small Rum. Res.* 65: 14-23.
- Davis, P.A., L.R. McDowell, N.S. Wilkinson, C.D. Buergelt, R. Van Alstyne, R.N. Weldon, T.T. Marshall, and E.Y. Matsuda-Fugisaki. 2008. Comparative effects of various dietary levels of Se as sodium selenite or Se yeast on blood, wool, and tissue Se concentrations of wether sheep. *Small Rum. Res.* 74: 149-158.

- De Aluja, A.S. y P. Adame. 1977. Miopatía degenerativa en becerros. *Vet. Mex.* 8: 2-12.
- Fairweather-Tait, S. 1997. Bioavailability of selenium. *Eur. J. Clin. Nutr.* 51: S20–S23.
- Fordyce, F. 2007. Selenium geochemistry and health. *Ambio.* 36: 94-97.
- Henry, P.R. and C.B. Ammerman. 1995. Selenium bioavailability. In: Ammerman, C.B., D.H. Baker and A.J. Lewis (eds), Bioavailability of nutrients for animals amino acids, minerals and vitamins. Academic Press. New York, USA. pp 303-331.
- Hidiroglou, M., D.P. Heaney, and K.J. Jenkins. 1968. Metabolism of inorganic selenium in rumen bacteria. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 46: 229-232.
- Hudman, J.F. and A.R. Glenn. 1984. Selenite uptake and incorporation by *Selenomonas ruminantium*. *Arch. Microbiol.* 140: 252-256.
- Hudman, J.F. and A.R. Glenn. 1985. Selenium uptake by *Butyrivibrio fibrisolvens* and *Bacteroides rumenicola*. *FEMS Microbiol. Lett.* 27: 215-220.
- Kim, J., P.J. Van Soest, and G.F. Combs, Jr. 1997. Studies on the effects of selenium on rumen microbial fermentation *In Vitro*. *Biol. Trace Elem. Res.* 56: 203-213.
- Koenig, K.M., L.M. Rode, R.D.H. Cohen, and W.T. Buckley. 1997. Effects of diet and chemical form of selenium metabolism in sheep. *J. Anim. Sci.* 75: 817-827.
- Langlands, J.P., J.E. Bowles, G.E. Donald and A.J. Smith. 1986. Selenium excretion in sheep. *Aust. J. Agric. Res.* 37: 201-209.
- Linder, M.C., 1988, *Nutritional Biochemistry and Metabolism*, Elsevier, New York, p. 177.
- Littell, R.C., G.A. Milliken, W.W. Stroup and R.D. Wolfinger. 1996. SAS System for Mixed Models. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA. 633 p.
- Lopez, P.L., R.L. Preston and W.H. Pfander. 1969. Whole-body retention, tissue distribution and excretion of selenium-75 after oral and intravenous administration in lambs fed varying selenium intakes. *J. Nutr.* 97: 123-132.

- Lu, J. Holmgren, A. 2008. Selenoproteins. Instituto Médico Nobel de Bioquímica, Departamento de Bioquímica Médica y Biofísica, Karolinska Institute. SE-17177. Estocolmo, Suecia.
- McDowell, L.R., J. Velásquez-Pereira y G. Valle. 1997. Minerales para rumiantes en pastoreo en regiones tropicales. Boletín. 3ª edición. Departamento de Ciencia Animal. Universidad de Florida. Gainesville, Florida. 84 p.
- Naziroglu, M., Aksakal, M., Cay, S. and Celik, S. 1997. Effects of vitamin E and Selenium on some rumen parameters in lambs. *Acta Vet. Hung.* 45: 447-456.
- NRC. 2005. Mineral tolerance of animals. Second revised edition. National Academy Press. Washington, D.C. 510 p.
- NRC. 2007. Nutrient Requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids and new world camelids. National Academy Press. Washington, DC. 381 p.
- Oremland, R.S., J.T. Hollibaugh, A.S. Maest, T.S. Presser, L.G. Miller, and C.W. Culbertson. 1989. Selenate reduction to elemental selenium by anaerobic bacteria in sediments and culture: biogeochemical significance of a novel, sulfate-independent respiration. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 2333-2343.
- Owens, F. N.; Secrist, D. S.; Hill, W. J.; Gill, D. R. 1998. Acidosis in cattle: a review. *J. Anim. Sci.* 76:275-286.
- Panev, A. K. Hauptmanová, L. Pavlata, A. Pechová, J. Filípek, R. Dvořák, R. 2013. Effect of supplementation of various selenium forms and doses on selected parameters of ruminal fluid and blood in sheep. *Czech J. Anim. Sci.* 58: 37-46.
- Ramírez-Bribiesca, J.E., J.L. Tórtora, L.M. Hernández, and M. Huerta. 2001. Main causes of mortalities in dairy goat kids from the Mexican Plateau. *Small Rumin. Res.* 41: 77-80.

- Ramírez-Bribiesca, E., E. Hernández-Camacho, L.M. Hernández-Calva y J.L. Tórtora-Pérez. 2004. Efecto de un suplemento parenteral con selenito de sodio en la mortalidad de corderos y los valores hemáticos de selenio. *Agrociencia*. 38: 43-51.
- Relling A.E. y G.A. Mattioli. 2003. Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes. Editorial EDULP, pp 3-67.
- Rotruck, J.T. Pope, A.L. Ganther, H.E. 1973. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 179: 585–590.
- SAS. 2002. SAS/STAT User's guide. Version 9. SAS Institute Inc. Cary, NC. 1464 p.
- Serra, A.B., K. Nakamura, T. Matsui, T. Harumoto and T. Fujihara. 1994a. Inorganic selenium for sheep I. Selenium balance and selenium levels in the different ruminal fluid fractions. *AJAS*. 7: 83-89.
- Serra, A.B., K. Nakamura, T. Matsui, T. Harumoto and T. Fujihara. 1994b. Inorganic selenium for sheep II. Its influence on rumen bacterial yield, volatile fatty acid production and total tract digestion of timothy hay. *AJAS*. 7: 91-96.
- Serra, A.B., S.D. Serra, K. Shinci, and T. Fujihara. 1997. Bioavailability of rumen bacterial selenium in mice using tissue uptake technique. *Biol. Trace Elem. Res.* 58: 255-261.
- Shi L., W. Xun, W. Yue, C. Zhang, Y. Ren, Q. Liu, Q. Wang, L. Shi. 2011. Effect of elemental nano-selenium on feed digestibility, rumen fermentation, and purine derivatives in sheep. *Anim. Feed Sci. Tech.* 163: 136–142.
- Siddique, T., J.M. Arocena, R.W. Thring, and Y. Zhang. 2007. Bacterial reduction of selenium in coal mine tailings pond sediment. *J. Environ. Qual.* 36: 621-627.
- Stock, T. and M. Rother. 2009. Selenoproteins in Archea and Gram-positive bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1790: 1520–1532.

- Stolz J.F., P. Basu and R.S. Oremland. 2002. Microbial transformation of elements: the case of arsenic and selenium. *Int. Microbiol.* 5: 201–207.
- Sunde, R.A. 1997. Selenium. En: O'Dell, B.L. and Sunde, R.A (eds.), Handbook of nutritionally essential mineral elements. Marcel Dekker, Inc. New York, USA. pp 493-556.
- Thompson-Eagle, E.T., W.T. Frankenberger, Jr., and U. Karlson. 1989. Volatilization of selenium by *Alternaria alternate*. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1406-1413.
- Vázquez, J.F. Rojo, R. López, D. Tinoco, J.L. Cardoso, D. y Brionez, F. 2010. Fermentación Ruminal *in vitro* de una Dieta Integral Para Cabras Adicionadas con Cobre y Zinc. Centro Universitario UAEM, Tescamacaltepec, México.
- Wang, C., Q. Liu, W.Z. Yang, Q. Dong, X.M. Yang, D.C. He, P. Zhang, K.H. Dong, Y.X. Huang. 2009. Effects of selenium yeast on rumen fermentation, lactation performance and feed digestibilities in lactating dairy cows. *Livestock Science* 126: 239–244.
- Williams, B. A. 2000. Cumulative gas-production techniques for forage evaluation. In: Givens D I, Owen E, Omed H M and Axford R F E (editors). Forage Evaluation in Ruminant Nutrition. Wallingford (UK). CAB International. 475 p.
- Yeh, J.-Y., Q.-P. Gu, M.A. Beilstein, N.E. Forsberg and P.D. Whanger. 1997. Selenium influences tissue levels of Selenoprotein W in sheep. *J. Nutr.* 127: 394-402.

## ANEXOS

### A1. SOLUCIONES PARA LA PREPARACIÓN DEL INÓCULO

#### Cuadro A1.1 Solución amortiguadora

Reactivo	1 mL	1 L
Bicarbonato de amonio ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ), g.	0.004	4.0
Bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ), g.	0.035	35.0
Aforar con agua destilada, mL.	1	1000

#### Cuadro A1.2 Solución macromineral

Reactivo	1 mL	1 L
Fosfato de sodio dibásico ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	0.0057	5.7
Fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0.0062	6.2
Sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.0006	0.6
Aforar con agua destilada, mL.	1	1000

#### Cuadro A1.3 Solución micromineral

Reactivo	100 mL	250 mL	500 mL
Cloruro de calcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	13.2	33	66
Cloruro de manganeso tetrahidratado ( $\text{MnCl} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )	10	25	50
Cloruro de cobalto hexahidratado ( $\text{CoCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	1	2.5	5
Cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ )	8	20	40
Aforar con agua destilada, mL.	100	250	500

#### Cuadro A1.4 Resazurina

Reactivo	100 mL	200 mL
Resazurina, g	0.1	0.2
Aforar con agua destilada, mL.	100	200

#### Cuadro A1.5 Solución reductora a razón de 2 mL por cada 60 mL de inóculo (para 100 mL)

Reactivo	1 mL	100 mL	200 mL
Sulfato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )	0.0057	0.57	1.14
Solución de hidróxido de sodio 0.1 N (4 g NaOH/L), mL	0.04	4.0	8
Aforar con agua destilada, mL.	1	100	200



Fermentación *in vitro* de una Dieta y un Forraje con Altas Concentraciones de Selenio  
 Alberto Martínez Jiménez

Effect	SUSTRATO	HORA	TRAT	Estimador	Error estándar	DF	Valor t	Pr >  t
SUSTRATO*HORA*TRAT	Alfalfa	3	0	28.5835	3.9764	66	7.19	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Alfalfa	3	0.3	28.0839	3.9764	66	7.06	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Alfalfa	3	4	27.6808	3.9764	66	6.96	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Alfalfa	3	8	26.7155	3.9764	66	6.72	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Alfalfa	3	12	27.6092	3.9764	66	6.94	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Alfalfa	8	0	65.4238	3.9764	66	16.45	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Alfalfa	8	0.3	63.6818	3.9764	66	16.02	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Alfalfa	8	4	62.6829	3.9764	66	15.76	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Alfalfa	8	8	63.1572	3.9764	66	15.88	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Alfalfa	8	12	63.3709	3.9764	66	15.94	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Alfalfa	24	0	154.54	3.9764	66	38.86	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Alfalfa	24	0.3	152.44	3.9764	66	38.34	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Alfalfa	24	4	147.67	3.9764	66	37.14	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Alfalfa	24	8	150.57	3.9764	66	37.87	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Alfalfa	24	12	150.36	3.9764	66	37.81	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Alfalfa	48	0	194.85	3.9764	66	49.00	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Alfalfa	48	0.3	191.71	3.9764	66	48.21	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Alfalfa	48	4	187.17	3.9764	66	47.07	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Alfalfa	48	8	191.75	3.9764	66	48.22	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Alfalfa	48	12	190.18	3.9764	66	47.83	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Alfalfa	72	0	211.79	3.9764	66	53.26	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Alfalfa	72	0.3	209.16	3.9764	66	52.60	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Alfalfa	72	4	199.95	3.9764	66	50.28	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Alfalfa	72	8	209.93	3.9764	66	52.79	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Alfalfa	72	12	208.28	3.9764	66	52.38	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Dieta	3	0	29.3088	3.9764	66	7.37	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Dieta	3	0.3	31.1670	4.4457	66	7.01	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Dieta	3	4	28.8754	3.9764	66	7.26	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Dieta	3	8	30.9217	3.9764	66	7.78	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Dieta	3	12	27.2408	3.9764	66	6.85	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Dieta	8	0	90.8944	3.9764	66	22.86	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Dieta	8	0.3	92.7921	4.4457	66	20.87	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Dieta	8	4	90.5278	3.9764	66	22.77	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Dieta	8	8	92.7289	3.9764	66	23.32	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Dieta	8	12	86.4865	3.9764	66	21.75	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Dieta	24	0	193.00	3.9764	66	48.54	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Dieta	24	0.3	193.36	4.4457	66	43.49	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Dieta	24	4	192.17	3.9764	66	48.33	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Dieta	24	8	192.36	3.9764	66	48.38	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Dieta	24	12	187.49	3.9764	66	47.15	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Dieta	48	0	243.08	3.9764	66	61.13	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Dieta	48	0.3	244.09	4.4457	66	54.90	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Dieta	48	4	241.71	3.9764	66	60.79	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Dieta	48	8	240.37	3.9764	66	60.45	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Dieta	48	12	238.40	3.9764	66	59.95	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Dieta	72	0	264.40	3.9764	66	66.49	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Dieta	72	0.3	266.93	4.4457	66	60.04	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Dieta	72	4	264.43	3.9764	66	66.50	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Dieta	72	8	262.30	3.9764	66	65.96	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Dieta	72	12	262.20	3.9764	66	65.94	<.0001

### A2.2.3 Producción de gas, Estimadores para la prueba de respuesta lineal y cuadrática de las medias.

Etiqueta	Estimates				
	Estimador	Error estándar	DF	Valor t	Pr >  t
<b>Alfalfa</b>					
LINEAL TRATAMIENTO, HORA 3	-3.3171	12.6066	32.3	-0.26	0.7941
LINEAL TRATAMIENTO, HORA 8	-4.6304	12.6066	32.3	-0.37	0.7158
LINEAL TRATAMIENTO, HORA 24	-10.2286	12.6066	32.3	-0.81	0.4231
LINEAL TRATAMIENTO, HORA 48	-9.2989	12.6066	32.3	-0.74	0.4661
LINEAL TRATAMIENTO, HORA 72	-6.2482	12.6066	32.3	-0.50	0.6235
CUADRÁTICO TRATAMIENTO, HORA 3	-0.8311	9.7650	32.3	-0.09	0.9327
CUADRÁTICO TRATAMIENTO, HORA 8	-3.4289	9.7650	32.3	-0.35	0.7278
CUADRÁTICO TRATAMIENTO, HORA 24	-9.5500	9.7650	32.3	-0.98	0.3353
CUADRÁTICO TRATAMIENTO, HORA 48	-10.7075	9.7650	32.3	-1.10	0.2810
CUADRÁTICO TRATAMIENTO, HORA 72	-20.1753	9.7650	32.3	-2.07	0.0469
<b>Dieta</b>					
LINEAL TRATAMIENTO, HORA 3	-4.3813	12.6962	33.6	-0.35	0.7322
LINEAL TRATAMIENTO, HORA 8	-8.8789	12.6962	33.6	-0.70	0.4892
LINEAL TRATAMIENTO, HORA 24	-12.0045	12.6962	33.6	-0.95	0.3511
LINEAL TRATAMIENTO, HORA 48	-13.0819	12.6962	33.6	-1.03	0.3102
LINEAL TRATAMIENTO, HORA 72	-9.0313	12.6962	33.6	-0.71	0.4818
CUADRÁTICO TRATAMIENTO, HORA 3	1.2012	9.7138	33.6	0.12	0.9023
CUADRÁTICO TRATAMIENTO, HORA 8	3.6747	9.7138	33.6	0.38	0.7076
CUADRÁTICO TRATAMIENTO, HORA 24	3.8393	9.7138	33.6	0.40	0.6952
CUADRÁTICO TRATAMIENTO, HORA 48	1.9297	9.7138	33.6	0.20	0.8437
CUADRÁTICO TRATAMIENTO, HORA 72	2.2717	9.7138	33.6	0.23	0.8165

### A2.2.4 Digestibilidad, Prueba tipo 3 de efectos fijos y sus interacciones.

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F-Valor	Pr > F
SUSTRATO	1	40	509.19	<.0001
TRAT	4	40	1.07	0.3848
SUSTRATO*TRAT	4	40	0.34	0.8468

### A2.2.5 Digestibilidad, Medias de mínimos cuadrados.

Least Squares Means

Effect	SUSTRATO	TRAT	Estimador	Error estándar	DF	Valor t	Pr >  t
SUSTRATO*TRAT	Alfalfa	0	59.6680	0.7063	40	84.48	<.0001
SUSTRATO*TRAT	Alfalfa	0.3	58.6945	0.7063	40	83.10	<.0001
SUSTRATO*TRAT	Alfalfa	4	58.9963	0.7063	40	83.52	<.0001
SUSTRATO*TRAT	Alfalfa	8	59.3408	0.7063	40	84.01	<.0001
SUSTRATO*TRAT	Alfalfa	12	58.2524	0.7063	40	82.47	<.0001
SUSTRATO*TRAT	Dieta	0	70.0074	0.7063	40	99.11	<.0001

Fermentación *in vitro* de una Dieta y un Forraje con Altas Concentraciones de Selenio  
Alberto Martínez Jiménez

SUSTRATO*TRAT	Dieta	0.3	68.3486	0.7063	40	96.76	<.0001
SUSTRATO*TRAT	Dieta	4	68.6549	0.7063	40	97.20	<.0001
SUSTRATO*TRAT	Dieta	8	69.0949	0.7063	40	97.82	<.0001
SUSTRATO*TRAT	Dieta	12	69.2485	0.7063	40	98.04	<.0001

**A2.2.6 Digestibilidad, Estimadores para la prueba de respuesta lineal y cuadrática de las medias.**

Etiqueta	Estimates		DF	Valor t	Pr >  t
	Estimador	Error estándar			
LINEAL TRATAMIENTO, ALFALFA	-2.1849	2.2336	40	-0.98	0.3339
LINEAL TRATAMIENTO, DIETA	-0.7716	2.2336	40	-0.35	0.7316
CUADRÁTICO TRATAMIENTO, ALFALFA	0.07214	1.7302	40	0.04	0.9670
CUADRÁTICO TRATAMIENTO, DIETA	-1.9461	1.7302	40	-1.12	0.2674

**A2.2.7 pH, Prueba tipo 3 de efectos fijos y sus interacciones.**

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F-Valor	Pr > F
SUSTRATO	1	39.9	1234.38	<.0001
TRAT	4	39.9	0.71	0.5917
SUSTRATO*TRAT	4	39.9	0.70	0.5958

**A2.2.8 pH, Medias de mínimos cuadrados.**

Least Squares Means

Effect	SUSTRATO	TRAT	Estimador	Error estándar	DF	Valor t	Pr >  t
SUSTRATO*TRAT	Alfalfa	0	6.6040	0.01130	39.9	584.17	<.0001
SUSTRATO*TRAT	Alfalfa	0.3	6.6140	0.01130	39.9	585.06	<.0001
SUSTRATO*TRAT	Alfalfa	4	6.6140	0.01130	39.9	585.06	<.0001
SUSTRATO*TRAT	Alfalfa	8	6.6000	0.01130	39.9	583.82	<.0001
SUSTRATO*TRAT	Alfalfa	12	6.6020	0.01130	39.9	584.00	<.0001
SUSTRATO*TRAT	Dieta	0	6.3740	0.01130	39.9	563.83	<.0001
SUSTRATO*TRAT	Dieta	0.3	6.3520	0.01130	39.9	561.88	<.0001
SUSTRATO*TRAT	Dieta	4	6.3540	0.01130	39.9	562.06	<.0001
SUSTRATO*TRAT	Dieta	8	6.3420	0.01130	39.9	561.00	<.0001
SUSTRATO*TRAT	Dieta	12	6.3560	0.01130	39.9	562.24	<.0001

**A2.2.9 pH, Estimadores para la prueba de respuesta lineal y cuadrática de las medias.**

Estimates

Etiqueta	Estimador	Error estándar	DF	Valor t	Pr >  t
----------	-----------	----------------	----	---------	---------

LINEAL TRATAMIENTO, ALFALFA	-0.01800	0.03575	39.9	-0.50	0.6174
LINEAL TRATAMIENTO, DIETA	-0.04600	0.03575	39.9	-1.29	0.2056
CUADRÁTICO TRATAMIENTO, ALFALFA	0.02200	0.02769	39.9	0.79	0.4316
CUADRÁTICO TRATAMIENTO, DIETA	-0.02200	0.02769	39.9	-0.79	0.4316

## A2.3 Resultados del análisis estadístico para el experimento 2

### A2.3.1 Producción de gas, Prueba tipo 3 de efectos fijos y sus interacciones.

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F-Valor	Pr > F
SUSTRATO	1	30	13.11	0.0011
HORA	4	117	8045.30	<.0001
TRAT	4	30	3.74	0.0138
SUSTRATO*HORA	4	117	639.17	<.0001
SUSTRATO*TRAT	4	30	0.44	0.7765
HORA*TRAT	16	117	6.10	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	16	117	3.76	<.0001

### A2.3.2 Producción de gas, Medias de mínimos cuadrados.

Least Squares Means

Effect	SUSTRATO	HORA	TRAT	Estimador	Error estándar	DF	Valor t	Pr >  t
SUSTRATO*HORA*TRAT	Alfalfa	5	0	55.9699	4.6205	40.1	12.11	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Alfalfa	5	5	55.2109	4.6205	40.1	11.95	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Alfalfa	5	20	54.0549	4.6205	40.1	11.70	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Alfalfa	5	40	57.6389	4.6205	40.1	12.47	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Alfalfa	5	60	54.1095	4.6205	40.1	11.71	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Alfalfa	10	0	120.97	4.6205	40.1	26.18	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Alfalfa	10	5	120.22	4.6205	40.1	26.02	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Alfalfa	10	20	116.52	4.6205	40.1	25.22	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Alfalfa	10	40	121.71	4.6205	40.1	26.34	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Alfalfa	10	60	112.31	4.6205	40.1	24.31	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Alfalfa	24	0	174.78	4.6205	40.1	37.83	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Alfalfa	24	5	173.47	4.6205	40.1	37.54	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Alfalfa	24	20	166.16	4.6205	40.1	35.96	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Alfalfa	24	40	174.90	4.6205	40.1	37.85	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Alfalfa	24	60	160.46	4.6205	40.1	34.73	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Alfalfa	48	0	204.64	4.6205	40.1	44.29	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Alfalfa	48	5	202.31	4.6205	40.1	43.78	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Alfalfa	48	20	195.91	4.6205	40.1	42.40	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Alfalfa	48	40	206.60	4.6205	40.1	44.71	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Alfalfa	48	60	188.15	4.6205	40.1	40.72	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Alfalfa	72	0	217.08	4.6205	40.1	46.98	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Alfalfa	72	5	214.54	4.6205	40.1	46.43	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Alfalfa	72	20	208.65	4.6205	40.1	45.16	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Alfalfa	72	40	219.62	4.6205	40.1	47.53	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Alfalfa	72	60	199.21	4.6205	40.1	43.11	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Dieta	5	0	24.9661	4.6205	40.1	5.40	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Dieta	5	5	26.3636	4.6205	40.1	5.71	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Dieta	5	20	25.9876	4.6205	40.1	5.62	<.0001

Fermentación *in vitro* de una Dieta y un Forraje con Altas Concentraciones de Selenio  
Alberto Martínez Jiménez

---

SUSTRATO*HORA*TRAT	Dieta	5	40	27.8436	4.6205	40.1	6.03	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Dieta	5	60	23.7492	4.6205	40.1	5.14	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Dieta	10	0	90.8668	4.6205	40.1	19.67	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Dieta	10	5	88.7628	4.6205	40.1	19.21	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Dieta	10	20	79.5872	4.6205	40.1	17.22	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Dieta	10	40	77.0722	4.6205	40.1	16.68	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Dieta	10	60	61.5831	4.6205	40.1	13.33	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Dieta	24	0	195.53	4.6205	40.1	42.32	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Dieta	24	5	190.19	4.6205	40.1	41.16	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Dieta	24	20	186.23	4.6205	40.1	40.30	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Dieta	24	40	185.42	4.6205	40.1	40.13	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Dieta	24	60	175.50	4.6205	40.1	37.98	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Dieta	48	0	254.18	4.6205	40.1	55.01	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Dieta	48	5	248.87	4.6205	40.1	53.86	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Dieta	48	20	240.93	4.6205	40.1	52.14	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Dieta	48	40	241.73	4.6205	40.1	52.32	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Dieta	48	60	233.96	4.6205	40.1	50.63	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Dieta	72	0	277.10	4.6205	40.1	59.97	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Dieta	72	5	272.25	4.6205	40.1	58.92	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Dieta	72	20	265.69	4.6205	40.1	57.50	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Dieta	72	40	267.54	4.6205	40.1	57.90	<.0001
SUSTRATO*HORA*TRAT	Dieta	72	60	257.84	4.6205	40.1	55.80	<.0001

### A2.3.3 Producción de gas, Estimadores para la prueba de respuesta lineal y cuadrática de las medias.

Etiqueta	Estimates				
	Estimador	Error estándar	DF	Valor t	Pr >  t
<b>Alfalfa</b>					
LINEAL TRATAMIENTO, HORA 5	-1.2926	15.1355	18.7	-0.09	0.9328
LINEAL TRATAMIENTO, HORA 10	-15.8267	15.1355	18.7	-1.05	0.3090
LINEAL TRATAMIENTO, HORA 24	-27.1933	15.1355	18.7	-1.80	0.0885
LINEAL TRATAMIENTO, HORA 48	-28.6820	15.1355	18.7	-1.90	0.0736
LINEAL TRATAMIENTO, HORA 72	-30.6491	15.1355	18.7	-2.02	0.0574
CUADRÁTICO TRATAMIENTO, HORA 5	-1.9695	11.7239	18.7	-0.17	0.8684
CUADRÁTICO TRATAMIENTO, HORA 10	-0.2339	11.7239	18.7	-0.02	0.9843
CUADRÁTICO TRATAMIENTO, HORA 24	-2.9256	11.7239	18.7	-0.25	0.8057
CUADRÁTICO TRATAMIENTO, HORA 48	-0.9613	11.7239	18.7	-0.08	0.9355
CUADRÁTICO TRATAMIENTO, HORA 72	1.0208	11.7239	18.7	0.09	0.9315
<b>Dieta</b>					
LINEAL TRATAMIENTO, HORA 5	-0.9539	14.0143	21.4	-0.07	0.9464
LINEAL TRATAMIENTO, HORA 10	-70.2579	14.0143	21.4	-5.01	<.0001
LINEAL TRATAMIENTO, HORA 24	-44.8362	14.0143	21.4	-3.20	0.0042
LINEAL TRATAMIENTO, HORA 48	-47.5858	14.0143	21.4	-3.40	0.0027
LINEAL TRATAMIENTO, HORA 72	-43.2491	14.0143	21.4	-3.09	0.0055
CUADRÁTICO TRATAMIENTO, HORA 5	3.2598	10.8554	21.4	0.30	0.7669
CUADRÁTICO TRATAMIENTO, HORA 10	6.7246	10.8554	21.4	0.62	0.5421
CUADRÁTICO TRATAMIENTO, HORA 24	1.4211	10.8554	21.4	0.13	0.8971
CUADRÁTICO TRATAMIENTO, HORA 48	-6.2850	10.8554	21.4	-0.58	0.5687
CUADRÁTICO TRATAMIENTO, HORA 72	-3.5497	10.8554	21.4	-0.33	0.7469

### A2.3.4 Diferencias entre medias de mínimos cuadrados de los tratamientos a las 72 horas

Effect	HORA	TRAT	HORA	TRAT	Differences of Least Squares Means				
					Estimador	Error estándar	DF	Valor t	Pr >  t
<b>Alfalfa</b>									
HORA*TRAT	48	0	48	5	2.3312	6.7688	18.7	0.34	0.7344
HORA*TRAT	48	0	48	20	8.7236	6.7688	18.7	1.29	0.2132
HORA*TRAT	48	0	48	40	-1.9587	6.7688	18.7	-0.29	0.7755
HORA*TRAT	48	0	48	60	16.4860	6.7688	18.7	2.44	0.0250
HORA*TRAT	48	5	48	20	6.3924	6.7688	18.7	0.94	0.3570
HORA*TRAT	48	5	48	40	-4.2899	6.7688	18.7	-0.63	0.5339
HORA*TRAT	48	5	48	60	14.1547	6.7688	18.7	2.09	0.0504
HORA*TRAT	72	0	72	5	2.5384	6.7688	18.7	0.38	0.7119
HORA*TRAT	72	0	72	20	8.4225	6.7688	18.7	1.24	0.2287
HORA*TRAT	72	0	72	40	-2.5439	6.7688	18.7	-0.38	0.7113
HORA*TRAT	72	0	72	60	17.8657	6.7688	18.7	2.64	0.0163
HORA*TRAT	72	5	72	20	5.8841	6.7688	18.7	0.87	0.3957
HORA*TRAT	72	5	72	40	-5.0823	6.7688	18.7	-0.75	0.4621
HORA*TRAT	72	5	72	60	15.3273	6.7688	18.7	2.26	0.0356
<b>Dieta</b>									
HORA*TRAT	10	0	10	5	2.1040	6.2674	21.4	0.34	0.7404
HORA*TRAT	10	0	10	20	11.2795	6.2674	21.4	1.80	0.0860
HORA*TRAT	10	0	10	40	13.7946	6.2674	21.4	2.20	0.0388
HORA*TRAT	10	0	10	60	29.2837	6.2674	21.4	4.67	0.0001
HORA*TRAT	10	5	10	20	9.1755	6.2674	21.4	1.46	0.1577
HORA*TRAT	10	5	10	40	11.6906	6.2674	21.4	1.87	0.0759
HORA*TRAT	10	5	10	60	27.1797	6.2674	21.4	4.34	0.0003

HORA*TRAT	24	0	24	5	5.3441	6.2674	21.4	0.85	0.4033
HORA*TRAT	24	0	24	20	9.3049	6.2674	21.4	1.48	0.1522
HORA*TRAT	24	0	24	40	10.1184	6.2674	21.4	1.61	0.1211
HORA*TRAT	24	0	24	60	20.0309	6.2674	21.4	3.20	0.0043
HORA*TRAT	24	5	24	20	3.9609	6.2674	21.4	0.63	0.5341
HORA*TRAT	24	5	24	40	4.7743	6.2674	21.4	0.76	0.4545
HORA*TRAT	24	5	24	60	14.6869	6.2674	21.4	2.34	0.0288
HORA*TRAT	48	0	48	5	5.3120	6.2674	21.4	0.85	0.4061
HORA*TRAT	48	0	48	20	13.2539	6.2674	21.4	2.11	0.0464
HORA*TRAT	48	0	48	40	12.4524	6.2674	21.4	1.99	0.0599
HORA*TRAT	48	0	48	60	20.2227	6.2674	21.4	3.23	0.0040
HORA*TRAT	48	5	48	20	7.9418	6.2674	21.4	1.27	0.2187
HORA*TRAT	48	5	48	40	7.1404	6.2674	21.4	1.14	0.2672
HORA*TRAT	48	5	48	60	14.9107	6.2674	21.4	2.38	0.0267
HORA*TRAT	72	0	72	5	4.8497	6.2674	21.4	0.77	0.4475
HORA*TRAT	72	0	72	20	11.4094	6.2674	21.4	1.82	0.0827
HORA*TRAT	72	0	72	40	9.5606	6.2674	21.4	1.53	0.1418
HORA*TRAT	72	0	72	60	19.2691	6.2674	21.4	3.07	0.0057
HORA*TRAT	72	5	72	20	6.5597	6.2674	21.4	1.05	0.3069
HORA*TRAT	72	5	72	40	4.7109	6.2674	21.4	0.75	0.4604
HORA*TRAT	72	5	72	60	14.4194	6.2674	21.4	2.30	0.0316

### A2.3.5 Digestibilidad, Prueba tipo 3 de efectos fijos y sus interacciones.

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F-Valor	Pr > F
SUSTRATO	1	26	89.83	<.0001
TRAT	4	26	0.84	0.5120
SUSTRATO*TRAT	4	26	0.44	0.7798

### A2.3.6 Digestibilidad, Medias de mínimos cuadrados.

Least Squares Means

Effect	SUSTRATO	TRAT	Estimador	Error estándar	DF	Valor t	Pr >  t
SUSTRATO*TRAT	Alfalfa	0	60.5569	2.5133	26	24.09	<.0001
SUSTRATO*TRAT	Alfalfa	5	61.3948	2.9021	26	21.16	<.0001
SUSTRATO*TRAT	Alfalfa	20	62.9662	2.5133	26	25.05	<.0001
SUSTRATO*TRAT	Alfalfa	40	65.4960	2.5133	26	26.06	<.0001
SUSTRATO*TRAT	Alfalfa	60	63.0825	2.5133	26	25.10	<.0001
SUSTRATO*TRAT	Dieta	0	76.7789	2.5133	26	30.55	<.0001
SUSTRATO*TRAT	Dieta	5	77.8607	2.5133	26	30.98	<.0001
SUSTRATO*TRAT	Dieta	20	78.0185	2.9021	26	26.88	<.0001
SUSTRATO*TRAT	Dieta	40	78.2177	2.9021	26	26.95	<.0001
SUSTRATO*TRAT	Dieta	60	82.8142	2.9021	26	28.54	<.0001

### A2.3.7 Digestibilidad, Estimadores para la prueba de respuesta lineal y cuadrática de las medias.

Estimates

Etiqueta	Estimador	Error estándar	DF	Valor t	Pr >  t
LINEAL TRATAMIENTO, ALFALFA	9.1524	8.0792	26	1.13	0.2676
LINEAL TRATAMIENTO, DIETA	12.4278	8.5846	26	1.45	0.1597
CUADRÁTICO TRATAMIENTO, ALFALFA	2.2929	6.1563	26	0.37	0.7126
CUADRÁTICO TRATAMIENTO, DIETA	-3.5562	6.9590	26	-0.51	0.6136

### A2.3.8 pH, Prueba tipo 3 de efectos fijos y sus interacciones.

#### Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F-Valor	Pr > F
SUSTRATO	1	28.6	279.37	<.0001
TRAT	4	28.6	0.11	0.9798
SUSTRATO*TRAT	4	28.6	0.62	0.6509

### A2.3.9 pH, Medias de mínimos cuadrados.

#### Least Squares Means

Effect	SUSTRATO	TRAT	Estimador	Error estándar	DF	Valor t	Pr >  t
SUSTRATO*TRAT	Alfalfa	0	6.7050	0.02928	28.6	228.98	<.0001
SUSTRATO*TRAT	Alfalfa	5	6.7075	0.02928	28.6	229.06	<.0001
SUSTRATO*TRAT	Alfalfa	20	6.7225	0.02928	28.6	229.57	<.0001
SUSTRATO*TRAT	Alfalfa	40	6.6800	0.02928	28.6	228.12	<.0001
SUSTRATO*TRAT	Alfalfa	60	6.7150	0.02928	28.6	229.32	<.0001
SUSTRATO*TRAT	Dieta	0	6.3800	0.02928	28.6	217.88	<.0001
SUSTRATO*TRAT	Dieta	5	6.3875	0.02928	28.6	218.13	<.0001
SUSTRATO*TRAT	Dieta	20	6.3675	0.02928	28.6	217.45	<.0001
SUSTRATO*TRAT	Dieta	40	6.4150	0.02928	28.6	219.07	<.0001
SUSTRATO*TRAT	Dieta	60	6.4067	0.03381	28.6	189.48	<.0001

### A2.3.10 pH, Estimadores para la prueba de respuesta lineal y cuadrática de las medias.

#### Estimates

Etiqueta	Estimador	Error estándar	DF	Valor t	Pr >  t
LINEAL TRATAMIENTO, ALFALFA	-0.00750	0.09260	28.6	-0.08	0.9360
LINEAL TRATAMIENTO, DIETA	0.08083	0.09858	28.6	0.82	0.4190
CUADRÁTICO TRATAMIENTO, ALFALFA	0.02500	0.07173	28.6	0.35	0.7300
CUADRÁTICO TRATAMIENTO, DIETA	-0.05167	0.07369	28.6	-0.70	0.4889