



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS Y FORESTALES

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Mitigación de la metanogénesis ruminal *in vitro* utilizando plantas tropicales y sus extractos**

TESIS

Para Obtener grado de

Doctor en Ciencias Biológicas

Opción: Ciencias Agropecuarias, Forestales y Ambientales

PRESENTA

M.C. Karlos Edmundo Orozco Durán

Asesor: Dr. José Herrera Camacho

Sinodales:

Dr. Octavio Alonso Castelán Ortega (UAEM)

Dr. Juan Carlos Kú Vera (UADY)

Dra. Liliana Márquez Benavides (UMSNH)

Dr. Otoniel Buenrostro Delgado (UMSNH)

Morelia, Mich. Agosto de 2016

El presente trabajo se realizó en el Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo la asesoría del Dr. José Herrera Camacho. Realizándose algunas actividades en el Laboratorio de Análisis de Alimentos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UMSNH.

El financiamiento fue apoyado por la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH, así como por parte del Consejo Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación del Estado de Michoacán (CECTI).

Se contó con el apoyo de capacitación y montaje de técnicas por parte del Dr. Octavio Castelán Ortega de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México y la Dra. Liliana Márquez Benavides del Laboratorio de Residuos Sólidos de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, por ofrecer el espacio para el desarrollo de proyectos, financiamiento y formación de capital humano de alto nivel, para el mejoramiento de la sociedad Michoacana.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca para estudios de doctorado (Becario 272780)

A Los profesores involucrados en el desarrollo de éste proyecto, desde su planeación, supervisión y conclusión especialmente al Dr. José Herrera Camacho.

A mi familia por estar siempre alentando cualquier esfuerzo, Jessica y Constanza, los amores de mi vida.

<b>Contenido</b>	
<b>RESUMEN</b> .....	4
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	7
HIPÓTESIS .....	11
OBJETIVO GENERAL.....	11
Objetivos Específicos.....	12
<b>Potencial metanogénico y digestibilidad <i>in vitro</i> de gramíneas y leguminosas de uso forrajero.</b> .....	13
INTRODUCCIÓN.....	15
MATERIALES Y MÉTODOS .....	18
RESULTADOS.....	21
Producción total de gas (cm <sup>3</sup> ).....	21
Producción de metano % / cm <sup>3</sup> .....	22
Digestibilidad <i>in vitro</i> de la Materia Seca (%) .....	22
DISCUSIÓN.....	23
Producción total de gas (cm <sup>3</sup> ).....	23
Proporción (%) de metano/cm <sup>3</sup> .....	24
Digestibilidad <i>in vitro</i> de la Materia Seca.....	25
CONCLUSIONES.....	26
LITERATURA CITADA .....	31
<b>REDUCCIÓN DE LA METANOGÉNESIS RUMINAL <i>IN VITRO</i> CON ACEITES VEGETALES ALTERNATIVOS: <i>Thevetia peruviana</i> y <i>Persea americana</i>.</b> .....	38
INTRODUCCION.....	40
MATERIAL Y METODOS.....	43
RESULTADOS.....	47
CONCLUSIONES.....	52
LITERATURA CITADA .....	52
<b>DISCUSION GENERAL</b> .....	61
<b>CONCLUSION GENERAL</b> .....	64
<b>REFERENCIAS COMPLEMENTARIAS</b> .....	65
<b>ANEXOS</b> .....	70

## RESUMEN

La producción ganadera actual enfrenta el desafío de producir carne y leche reduciendo las emisiones de metano, en este sentido los rumiantes emiten más del 60 % de los gases de efecto invernadero en lo que respecta a las actividades agropecuarias. Por lo que una de las alternativas en el corto plazo es la suplementación alimenticia con aditivos procedentes de recursos forrajeros, o material vegetativo disponible que permitan la mitigación de metano sin comprometer la inocuidad de los productos de origen animal, o competir con los sustratos y productos destinados a consumo humano. En este tenor, se evaluó el potencial metanogénico *in vitro* de distintas gramíneas y leguminosas de uso forrajero, identificando por una parte su potencial alimenticio para los rumiantes y por la otra su comportamiento como posible fuente de metabolitos secundarios para su futuro aprovechamiento como mitigadores de metano. El análisis incluyó la comparación de gramíneas cultivadas en clima templado y tropical en cuanto a su desempeño alimenticio y metanogénico. Se encontró que la avena (*Avena sativa*) y cebada (*Hordeum vulgare*) fueron los pastos con mayor producción de gas (278 y 283 cm<sup>3</sup> respectivamente), aunque en el caso de la avena la concentración de metano / cm<sup>3</sup> resultó baja (17.42 %), a comparación de la cebada y Tanzania (*Panicum maximum*) donde ése valor supero el 30 %. Los distintos pastos tanto de clima tropical como de clima templado (*Cynodon plechtostachyus*, *Pennisetum clandestinum*, *Pennisetum purpureum* y *Andropogon gayanus*) no resultaron diferentes en cuanto a producción de gas que se mantuvo alrededor de los 200 cm<sup>3</sup>, ni la concentración de metano, la cual se promedió en un 20%. Estos resultados muestran que indistintamente de la especie de pasto y región de origen las características nutricionales y el potencial metanogénico son similares siempre y cuando los pastos se aprovechen antes de la floración. En cuanto a la digestibilidad destacaron los pastos: avena, cebada y Tanzania, encontrándose que el valor mínimo para el resto de las gramíneas fue de 73 %. Por otra parte las leguminosas evaluadas fueron guaje (*Leucaena leucocephala*), alfalfa (*Medicago sativa*), ebo (*Vicia sativa*) y guaje (*Leucaena esculenta*), las cuales mostraron una mayor variación en la producción de gas, sobresaliendo las leguminosas de clima

templado: alfalfa y ebo con 214.6 y 238.9 cm<sup>3</sup> respectivamente. Por su parte *Leucaena leucocephala* produjo 156.5 cm<sup>3</sup> y la *Leucaena esculenta* apenas 60.69 cm<sup>3</sup>, situación que perfila a éste último forraje como un sustrato con un alto contenido de metabolitos secundarios, ya que mostró toxicidad al reducir la fermentación ruminal. Al respecto dicho forraje igualmente fue el que produjo la menor proporción de metano (11.9 %) respecto a las demás leguminosas estudiadas. En cuanto a la digestibilidad de la materia seca, a excepción *Leucaena esculenta* tuvieron una alta proporción ( $\geq 83\%$ ), contra el 65.7 % del forraje mencionado. Estos resultados ponen en perspectiva el hecho de que los modelos usados para estimar la producción de gases de efecto invernadero (GEI) en países ganaderos, deben incluir el análisis de los tipos de forraje, estación del año (fenología de los pastos), así como las especies presentes en los sistemas de producción animal, situación que favorecería un inventario de GEI más exacto. En el segundo experimento, se realizó la evaluación *in vitro* de los aceites crudos de fruto de aguacate Hass (*Persea americana Miller*) y semillas de adelfa amarilla (*Thevetia peruviana*), los cuales previamente se caracterizaron en cuanto a su perfil de ácidos grasos. El análisis consistió en probar diferentes niveles de inclusión (1 al 6% sobre el contenido de materia seca) en un cultivo con pasto Estrella de África como sustrato. Se encontró que la adición de aceites no afectó la producción de gas en ambos aceites con los niveles comprendidos entre el 1 y el 3%, que se situó entre los 226.5 y 233.2 cm<sup>3</sup> en ambos tratamientos, sin embargo fue capaz de reducir la producción de metano, en los niveles de 3, 4, 5 y 6% en el tratamiento aguacate, con una producción que pasó de 91.7 cm<sup>3</sup> en el 1% de inclusión a situarse en 83.7, 78.0, 68.3 y 60.2 cm<sup>3</sup> respectivamente. En el caso de la adelfa amarilla, la disminución significativa de la producción de metano se observó en los niveles de 4, 5 y 6 % de adición con 73.0, 63.9 y 58.7 cm<sup>3</sup> de metano por gramo de materia seca, respectivamente. Usando ambos aceites se encontró una reducción lineal en la producción de gas y de metano, observándose un efecto de la dosis, mas no del tipo de aceite, tampoco se observó una interacción del tratamiento X nivel. En el análisis de la digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS), se observó una disminución lineal de la misma en los

niveles 4, 5 y 6 % de los cultivos con ambos tipos de aceite, el valor más alto para dicha variable fue de 233.2 % en el nivel 1% hasta situarse en 216.9 % en la dosis de 6 % de aceite de adelfa amarilla, en el caso del aceite de aguacate, la digestibilidad máxima observada fue de 232.0 % en el nivel 0, y se redujo hasta el 215.3 % en el 6 % de inclusión. Por su parte, la digestibilidad *in vitro* de la fibra detergente neutra mostró un disminución lineal y cuadrática en ambos tratamientos en los niveles de 3, 4, 5 y 6 % de inclusión, el valor máximo registrado para ésta variable fue de 91.7 % en el grupo testigo (nivel 0) y el valor promedio mínimo observado fue de 58.1 % en el tratamiento con aceite de adelfa amarilla, y de 60.2 % en el aceite de aguacate, en ambos casos dicho valor correspondió al 6 % de inclusión de aceite. A partir de lo encontrado en éste trabajo, se evidencia que el uso de subproductos alimentarios como los frutos de aguacate no aptos para comercialización, o de semillas de algunas plantas de ornato como la *Thevetia peruviana*, se pueden obtener aditivos para la nutrición animal que tienen el potencial de reducir la producción de metano ruminal, considerando posteriores evaluaciones *in vivo*. Se concluye que la exploración del potencial metanogénico y nutricional de distintos pastos y leguminosas forrajeras, brinda una herramienta para la selección de los pastos con mayor potencial productivo y menor producción de metano, además de brindar valores de referencia que pueden alimentar modelos predictivos o de cálculo para los inventarios de GEI. Por otra parte se encontró que al adicionar un 3 y 4% de aceite de aguacate y *Thevetia peruviana* se puede reducir la metanogénesis *in vitro*, sin afectar la producción de gas y digestibilidad del forraje.

**Palabras clave:** metano, forrajes, aceites, rumiantes, cambio climático.

## ABSTRACT

The current livestock production faces the challenge of producing meat and milk reducing methane emissions in this sense ruminants emit more than 60% of greenhouse gases with regard to agricultural activities. So one of the alternatives in the short term nutritional supplementation with additives from forage resources, or vegetative material available that allow methane mitigation without compromising the safety of products of animal origin, or compete with the substrates and products intended for human consumption. In this vein, the methanogenic potential in vitro of different grasses and legumes for feed use, identifying the one hand its nutritional potential for ruminants and other behavior as a possible source of secondary metabolites for future use as relievers methane was evaluated. The analysis included comparison of cultivated grasses in temperate and tropical climate in their food and methanogenic performance. It was found that oats (*Avena sativa*) and barley (*Hordeum vulgare*) were pastures with higher gas production (278 and 283 cm<sup>3</sup> respectively), although in the case of oat methane concentration / cm<sup>3</sup> was low (17.42%), compared to barley and Tanzania (*Panicum maximum*) where that value exceeded 30%. The various grasses both tropical climate as temperate (*Cynodon plechtostachyus*, *Pennisetum clandestinum*, *Pennisetum purpureum* and *Andropogon gayanus*) were not different in terms of gas production remained around 200 cm<sup>3</sup>, and the concentration of methane, which we averaged 20%. These results show that regardless of the species of grass and region of origin and nutritional characteristics are similar methanogenic potential long as pastures advantage before flowering. As they noted digestibility grasses: oats, barley and Tanzania, finding the minimum value for the rest of grasses was 73%. Moreover legumes were evaluated guage (*Leucaena leucocephala*), alfalfa (*Medicago sativa*), ebo (*Vicia sativa*) and guage (*Leucaena esculenta*), which showed a greater variation in gas production, excelling legumes weather in May tempered alfalfa and ebo with 214.6 and 238.9 cm<sup>3</sup> respectively. Meanwhile *Leucaena leucocephala* produced 156.5 cm<sup>3</sup> and *Leucaena esculenta* only 60.69 cm<sup>3</sup>, a situation which profiles the latter forage as a substrate with a high content of secondary metabolites, as it showed toxicity by reducing ruminal fermentation. In this regard such fodder was also the one that produced the lowest proportion of methane (11.9%) compared to other legumes studied. As digestibility of dry matter, to *Leucaena esculenta* exception they had a high proportion ( $\geq 83\%$ ), 65.7% against the above mentioned fodder. These results put into perspective the fact that the models used to estimate the production of greenhouse gases (GHGs) in cattle countries should include analysis of the types of forage, season (phenology pasture) and species in the animal production systems, a situation that would encourage more accurate inventory of GHG. In the second experiment, the in vitro evaluation of crude oils Hass avocado fruit (*Persea americana* Miller) and yellow oleander seeds (*Thevetia peruviana*) was performed, which previously were characterized as to their fatty acid profile. The analysis was to test different inclusion levels (1 to 6% of the dry matter content) in a grass cultivation Star of Africa as a substrate. It was found that the addition of oil did not affect gas production in both oils with levels between 1 and 3%, which was between 226.5 and 233.2 cm<sup>3</sup> in both treatments, but was able to reduce production methane levels 3, 4, 5 and 6% een avocado treatment, with production went from 91.7 cm<sup>3</sup> at 1% inclusion to be at 83.7, 78.0, 68.3 and 60.2 cm<sup>3</sup> respectively. In the case of yellow oleander, the significant decrease in methane production was observed in the levels of 4, 5 and 6% addition with 73.0, 63.9 and 58.7 cm<sup>3</sup> of methane per gram of dry matter respectively. Using both oils found a linear reduction in gas production and methane, showing a dose effect, but not the type of oil, not treatment interaction was observed X level. In the analysis of the in vitro digestibility of

dry matter (IVDMD), a linear decrease of the same was observed in 6 levels 4, 5 and 6% of the cultures with both types of oil, the highest value for the variable was 233.2% at level 1% to stand at 216.9% at the dose of 6% oil yellow oleander, in the case of avocado oil, the maximum observed digestibility was 232.0% at level 0, and reduced 215.3% to 6% inclusion. Meanwhile, the in vitro digestibility of neutral detergent fiber showed a linear and quadratic decrease in both treatments at levels 3, 4, 5 and 6% inclusion, the maximum value recorded for this variable was 91.7% in the control group (level 0) and the minimum average value observed was 58.1% in the oil treatment yellow oleander, and 60.2% in avocado oil, in both cases said value corresponded to 6% inclusion of oil. From what was found in this work, it is evident that the use of food products such as avocado fruits unfit for marketing or seeds of some ornamental plants like peruviana *Thevetia* can be obtained additives for animal nutrition have the potential to reduce ruminal methane production, considering subsequent in vivo evaluations. It is concluded that the exploration of methanogenic and nutritional potential of different grasses and legumes, provides a tool for selecting pastures with greater productive potential and lower production of methane, as well as providing reference values that can feed predictive models or calculation for GHG inventories. Moreover it was found that by adding 3 to 4% of avocado oil and *Thevetia peruviana* can reduce methanogenesis in vitro without affecting gas production and forage digestibility.

## INTRODUCCIÓN

La producción ganadera del siglo XXI enfrenta retos en materia de productividad, sostenibilidad y sustentabilidad. En primer lugar existe una presión constante por una mayor cantidad y calidad de productos de origen animal, dada la creciente demografía en el planeta (FAO, 2009). En un segundo plano se ha presentado en los últimos 20 años una competencia constante por el uso de granos, cereales y cosechas agrícolas entre la producción animal y el consumo directo de la población humana. (Hernández y Babbar, 2001) En este sentido, la superficie disponible para llevar a cabo la producción de alimentos de origen animal y las cosechas destinadas a la ganadería se han estado realizando en el mismo espacio físico que existe desde hace 30 años (Thornton, 2010). Esta situación ha propiciado la necesidad de intensificar los sistemas de producción animal. Un tercer elemento que caracteriza a la ganadería del siglo XXI, es la necesidad de producir sustentablemente y con el menor impacto ecológico, ya que la cría de ganado involucra el uso de recursos naturales como el agua, cambios de uso de suelo, la sucesiva contaminación de mantos freáticos y del aire por la emisión de gases de efecto invernadero (GEI) (McMichael *et al.*, 2007; Steinfeld, 2009).

Los GEI son el componente involucrado en mayor medida con el cambio climático. Dicho fenómeno está cambiando el medio ambiente, impactando directamente a la población humana a través de un aumento en la altura del nivel medio del mar, variaciones en la precipitación pluvial y fluctuaciones constantes de temperatura, acentuándose un aumento gradual de la misma a nivel global en los últimos años, que de mantenerse con la tendencia actual, ésta podría aumentar hasta 2.5° C más para el año 2050 (OECD, 2008; Prato *et al.*, 2010). Situaciones que han ocasionado un aumento en la presentación de desastres naturales y pérdidas millonarias en la producción agrícola y en otras ramas de la economía (Magaña *et al.*, 1997; Nápoles, 2011). Los principales GEI son el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) que constituye tres cuartas partes del total de GEI, el óxido nitroso (NO<sub>2</sub>) que representa el diez por ciento y el metano (CH<sub>4</sub>) que aporta alrededor del quince por ciento del total (De Klein *et al.*, 2008).

Dentro de las actividades antropogénicas que generan la mayor cantidad de GEI se encuentra la ganadería, particularmente la producción de rumiantes aportando alrededor del 20% de metano que se produce anualmente a nivel mundial. Aunque la fermentación de fibras vegetales en el rumen desprende los tres tipos de GEI, ambientalmente reviste mayor importancia la emisión de metano ya que su potencial de calentamiento global es hasta 23 veces mayor respecto al CO<sub>2</sub> y es el segundo en cuanto a volumen producido (Steinfeld *et al.*, 2009) Si bien la fermentación ruminal puede generar hasta 90% de los GEI derivados de la producción de rumiantes, contribuyen adicionalmente a éste rubro la descomposición de excretas en el suelo y estercoleros que aportan la mayor cantidad de óxido nitroso, así como el consumo de energía a partir de hidrocarburos para la producción de forrajes y la operación de los sistemas de producción animal (Pyteski *et al.*, 2009).

La producción de metano durante la digestión ruminal por otra parte significa energía perdida para el mantenimiento y producción de los rumiantes, haciendo menos eficiente el uso de los recursos forrajeros. Ya que puede significar entre el 6 y 13% de la energía bruta contenida en la dieta (Miller y Wollin, 2001).

En Australia y Nueva Zelanda, se ha estimado que solamente la producción de rumiantes está generando más del 60% del metano correspondiente a las actividades agropecuarias (Cottle *et al.*, 2011; López-Villalobos, 2011) situación que ha puesto en marcha diferentes estrategias para mitigar la producción de GEI en estos y otros países de Europa. Sin embargo, en México, no se ha prestado suficiente importancia al fenómeno de calentamiento global y producción de GEI, siendo que el sector ganadero para el año 2003 generó cerca de 37 249.7 gigagramos de bióxido de carbono equivalente (Gg CO<sub>2</sub> eq.) (Nápoles, 2011), posicionándose como una de las primeras industrias emisoras del país. Sin embargo, el potencial de generación de metano y otros GEI aumenta anualmente debido al crecimiento del sector ganadero que hasta el año 2010 contó con más 49 millones de rumiantes en México (SIAP, 2012). Situación que potencializa la

producción de metano en los próximos años ya que se estima que cada cabeza de ganado ovino y caprino genera de 22-25 g / día de metano y en el caso de los bovinos en pastoreo alcanza los 350 g /día (Eckard, 2009 citado por Cottle *et al.*, 2011).

Aunque se han postulado diferentes estrategias para mitigar la producción de metano sin comprometer la productividad de los rumiantes, éstas hasta el momento no han resultado satisfactorias y aplicables en el corto plazo. Al respecto, se están implementando programas de selección genética de animales con una mayor vida productiva y una mejor eficiencia en la utilización energética de la dieta (Hegarty *et al.*, 2007; Lopez-Villalobos, 2011). Algunos estudios señalan que con un mayor uso de granos, promotores del crecimiento y otros aditivos químicos en la ración de los rumiantes, se disminuye la producción de metano hasta en un 10 %. Sin embargo el uso de granos y cereales aumenta la tasa de pasaje de forrajes y reduce la fermentación ruminal, disminuyendo el potencial digestible de pastos y forrajes. En el caso de los promotores de crecimiento y otros antibióticos selectivos, éstos generan resistencia microbiana a los antibióticos por parte de los consumidores, elevan los costos de la ración y resultan con acción residual, por lo que no son medidas prácticas desde el punto de vista ambiental, económico y social (Ogino *et al.*, 2004).

Los microorganismos involucrados en la producción de metano (metanógenos) son un grupo diverso que comprende 5 géneros y más de 20 especies (Baker, 1999), los cuales colaboran de manera simbiótica con algunas especies de protozoarios ciliados (Kumar *et al.*, 2009). Por lo que los estudios dirigidos a la defaunación de metanógenos y protozoarios ruminales parecen ser los más prácticos en la actualidad para reducir las emisiones entéricas de metano (Martin *et al.*, 2009).

Se ha comprobado que la reducción de la flora ruminal metanogénica disminuye las emisiones de metano por arriba de un 50% (Hegarty, 1999). Situación que ha

despertado el interés por el uso de plantas y subproductos vegetales nativos de distintos agroecosistemas tropicales. Diversas especies de leguminosas arbustivas, herbáceas y algunas raíces de arbustos contienen taninos, saponinas, flavonoides, fitoestrógenos, terpenos y otros polifenoles que poseen propiedades antibióticas, pudiendo eliminar de manera selectiva protozoarios y metanógenos (García y Medina, 2006; Koenig *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2008). Reduciendo de ésta manera la producción de metano en condiciones *in vitro* e *in vivo* sin comprometer la productividad de los rumiantes. Un argumento a favor del uso de árboles y arbustos en la mitigación de metano y nutrición animal parte de la capacidad que tienen éstos organismos de captar CO<sub>2</sub> del ambiente y convertirlo en biomasa vegetal con potencial forrajero compitiendo con granos y forrajes convencionales de cultivo en lo que respecta a rentabilidad, productividad y sustentabilidad (Francis, 1988; Zamora *et al.*, 2001).

Otra de las estrategias más aceptadas para mitigar la producción de metano a nivel ruminal es la suplementación con aceites que poseen un perfil alto en ácidos grasos poliinsaturados, ya que éstos aceites pueden realizar la defaunación selectiva de protozoarios ciliados y los metanogénos asociados, además de reducir la fermentación ruminal, permitiendo una mayor cantidad de proteína de sobrepaso hacia el intestino delgado (Hui-Ling *et al.*, 2010). Por otra parte son un sustrato energético para la producción lechera, función reproductiva y metabólica ante un panorama de déficit energético en los animales. De acuerdo con Martin *et al.* (2010), la adición de fuentes lipídicas disminuye la producción de metano en 3.8% por cada unidad porcentual de grasas, aunque el límite de inclusión de grasa en la dieta de rumiantes se ve limitada a no más del 6 % por los efectos adversos que se pueden generar en el metabolismo ruminal, así como en el consumo y digestibilidad (Mohammed *et al.*, 2004).

Una de las razones por las que los ácidos grasos poliinsaturados se han usado en la suplementación es su capacidad de captar H<sup>+</sup> libre, reduciendo la disponibilidad

del mismo para que los metanógenos no lo fijan en forma de metano (Eckard *et al.*, 2010).

Ante la situación ambiental a nivel global y los compromisos de México para reducir sus emisiones de GEI, importante evaluar igualmente el potencial metanogénico de las distintas especies de gramíneas y leguminosas que se emplean para la nutrición de rumiantes. La generación de algunos datos como el potencial metanogénico, digestibilidad en modelos de fermentación *in vitro*, puede aportar evidencias para alimentar los modelos predictivos, así como los inventarios anuales de GEI en condiciones productivas como las de México, donde existen diferentes regiones agroecológicas. En las regiones tropicales de México existe una gran variedad de especies vegetales subutilizadas en la industria ganadera que tienen el potencial de emplearse como forrajes o bien poseen un buen rendimiento oleoso, lo que los hace candidatos para probarlos como aditivos alimenticios.

### **HIPÓTESIS**

El potencial nutritivo y metanogénico de distintas especies de gramíneas y leguminosas tanto del trópico como de clima templado, es similar cuando éstas se recolectan en el mismo estado fenológico.

Los aceites de *Thevetia peruviana* y *Persea americana* reducen la metanogénesis en sistemas de fermentación ruminal *in vitro* sin disminuir la digestibilidad del forraje

### **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el potencial metanogénico de gramíneas y leguminosas forrajeras de clima templado y tropical, así como el potencial de los aceites de *Thevetia peruviana* y *Persea americana* para reducir la metanogénesis en un sistema de fermentación ruminal *in vitro*.

### **Objetivos Específicos**

Evaluar el potencial metanogénico y nutricional *in vitro* de distintas gramíneas y leguminosas forrajeras de clima templado y tropical recolectadas en la misma etapa fenológica .

Probar el uso de aceites de Thevetia peruviana y Persea americana para reducir la metanogénesis ruminal *in vitro*.

## **CAPITULO 2. Artículo en preparación para someterse a la Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias**

### **Potencial metanogénico y digestibilidad *in vitro* de gramíneas y leguminosas de uso forrajero.**

Karlos Edmundo Orozco Duran<sup>1</sup> José Herrera Camacho<sup>1</sup>, Yveet Sierra Aguilar<sup>2</sup>,

Daniel Val Arreola<sup>1</sup>

#### **RESUMEN**

El objetivo del estudio fue evaluar la digestibilidad y el potencial metanogénico *in vitro* de gramíneas y leguminosas forrajeras de clima tropical y templado en Michoacán. Del trópico se obtuvieron las gramíneas: pasto Taiwán (*Pennisetum purpureum*), Tanzania (*Panicum máximum*), llanero (*Andropogon gayanus*) y estrella (*Cynodon plectostachyu*), así como la leguminosa *Leucaena leucocephala*. En la región templada los pastos seleccionados fueron: avena (*Avena sativa*), cebada (*Hordeum vulgare*), pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) y pasto estrella (*Cynodon plectostachyus*). Además de las leguminosas: ebo (*Vicia sativa*), alfalfa (*Medicago sativa*) y guaje rojo (*L. esculenta*). Los forrajes se sometieron al proceso de producción de gas *in vitro*, sustrayendo 2 ml de biogás cada 12 h para el análisis de metano por cromatografía de gases. En los residuos sólidos de la producción de gas, se evaluó la digestibilidad de los forrajes. Las variables evaluadas fueron: producción de gas *in vitro*, producción de metano y porcentaje de digestibilidad *in vitro* de materia seca (% DIVMS). Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza completamente al azar. Los forrajes con mayor cantidad de metano fueron Tanzania (38.69 % / ml<sup>1</sup>) y cebada (30.73 % / ml<sup>1</sup>)

( $P < 0.005$ ). El mejor desempeño de producción de gas fue para cebada y avena con 286.82 y 278.13  $\text{cm}^3$ , además de que tuvieron una DIVMS de 90.48 y 88.25% respectivamente ( $P < 0.005$ ). *L. esculenta* obtuvo el menor desempeño en producción total de gas (60.69  $\text{cm}^3$ ) y metano (11.97 %/ml) ( $P < 0.005$ ). En conclusión las especies de gramíneas mostraron el mayor desempeño en producción de gas y digestibilidad que las leguminosas. Tanto los forrajes templados como los tropicales tuvieron un potencial metanogénico similar.

**Palabras Clave:** clima templado, producción de gas, forrajes, metano, trópico.

Potential methanogenesis, and *in vitro* digestibility in several grasses and forage legumes

### ABSTRACT

The objective of study was to evaluate the digestibility and methane production *in vitro* of forage grasses and legumes in tropical weather and temperate in Michoacan. In tropics the legume collected was guaje (*Leucaena leucocephala*) and the grasses: Taiwan (*Pennisetum purpureum*), Tanzania (*Panicum maximum*), gamba (*Andropogon gayanus*) and stargrass (*Cynodon plectostachyus*). In the temperate region, the legumes: ebo (*Vicia sativa*), alfalfa (*Medicago sativa*) and guaje rojo (*L. esculenta*). As well grasses: oat (*Avena sativa*), barley (*Hordeum vulgare*), kikuyo grass (*Pennisetum clandestinum*) and stargrass (*C. plectostachyus*) The fodder was underwent to the gas production process *in vitro*, wherein 2 ml of gas was subtracting per 12 h intervals for analysing methane in

gas chromatography. In solid waste production of gas, the digestibility of forages were evaluated. The variables were evaluated: production of gas *in vitro*, methane production *in vitro* and percent dry matter *in vitro* digestibility (%DMIVD). The data were analyzed by variance and means. The pastures that produced the largest number of methane per ml were Tanzania (38.69%/ml) and barley (30.73%/ml) (P<0.005). The best performance of gas accumulated and for digestibility was to barley and oats with 286.82 and 278.13 cm<sup>3</sup> and 90.48 and 88.25 %DMIVD respectively (P<0.005). *L. esculenta* was the forage with lower both total production of gas (60.69 cm<sup>3</sup>) as in methane production (11.97 %/ml) (P<0.005). In conclusion the species of grasses showed the best gas production performance and digestibility that legumes. Both Temperate and Tropical forages had similar *in vitro* methanogenic potential.

**Keywords:** temperate, gas production, forage, methane, tropics.

## INTRODUCCIÓN

México cuenta con una gran cantidad de regiones agroclimáticas, posee un territorio apto para la ganadería extensiva, más de la mitad del territorio es utilizado para el pastoreo de distintas especies de rumiantes.<sup>(1)</sup>

En la región centro-occidente del país, donde el estado de Michoacán figura como uno de los 13 principales productores de ganado, los sistemas de producción animal basan sus estrategias de alimentación en el pastoreo, cultivo y corte de gramíneas nativas o introducidas, que constituyen la dieta básica en la alimentación de rumiantes, siendo el alimento de menor costo<sup>(2, 3)</sup>. Las gramíneas

constituyen la mayor parte de los forrajes que son aprovechados por los rumiantes, cuya ración se complementa con diferentes especies de leguminosas forrajeras, que se caracterizan por un alto contenido proteico, que va del 15- 40 %, poseen una mayor digestibilidad y composición mineral que otros forrajes y contienen algunos metabolitos secundarios que pueden desempeñar funciones antiparasitarias o antibióticas<sup>(5)</sup>. Actualmente se utilizan en sistemas agrosilvopastoriles, donde se asocian a gramíneas y debido a la simbiosis que establecen con micorrizas radiculares, son capaces de fijar nitrógeno en suelos de cultivo y praderas <sup>(6)</sup>.

Los carbohidratos estructurales de los forrajes como la celulosa, hemicelulosa y xilanos, pueden ser digeridos por los rumiantes debido a la actividad de los microorganismos presentes en el tracto gastrointestinal. El rumen es el segmento digestivo mayormente poblado por bacterias, protozoarios y hongos encargados de la fermentación del forraje, dando lugar a productos y metabolitos intermedios que juegan un rol alimenticio de manera directa para el ganado<sup>(7)</sup>. Al respecto, los de mayor importancia en nutrición ruminal son los ácidos grasos volátiles, algunos ácidos orgánicos, aminoácidos libres y las formas de proteína y grasa de origen microbial. Por otra parte, actualmente han ido tomando relevancia los metabolitos que no son aprovechados por el animal, y que son liberados al medio ambiente, como el bióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), metano (CH<sub>4</sub>) y óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) <sup>(8)</sup>.

La ganadería de rumiantes es una fuente de gases contaminantes para el medio ambiente; en este sentido la generación de CH<sub>4</sub> es la más importante, aportando entre el 20 y 28 % de éste compuesto a nivel mundial. Las metanogénesis, está

moduladas por factores como el tipo y cantidad de flora ruminal, composición y digestibilidad de la dieta, consumo de materia seca, factores genéticos, entre otros <sup>(9,10)</sup>. El CH<sub>4</sub> pertenece al grupo de los gases de efecto invernadero (GEI), tiene un potencial de calentamiento global 23 veces mayor que el CO<sub>2</sub> <sup>(11)</sup>, pudiendo permanecer en la atmósfera por 9 a 15 años <sup>(12,13)</sup>. No obstante, los GEI son mecanismos naturales que han permitido mantener una temperatura cálida en el planeta (15 °C en promedio), aunque desde la revolución industrial se ha evidenciado un aumento en la concentración del conjunto de GEI en la atmósfera. La ganadera no ha quedado exenta de contribuir en este aumento de emisiones, lo cual se asocia a efectos negativos en el medio ambiente como aumento en la temperatura de la tierra y del océano, el descongelamiento de glaciares, aumento en el nivel del mar y en la incidencia de fenómenos naturales extremos (sequías e inundaciones) <sup>(14,15)</sup>.

En México, la estimación de la generación de los gases de efecto invernadero (GEI) está basada en modelos de simulación, que no consideran algunos aspectos particulares de fuentes metanogénicas como la ganadería. Por lo que existe la necesidad de estudios que aporten valores reales en cuanto a la producción de metano entérico en rumiantes. Por otra parte la mitigación de metano entérico en el ganado es un área de investigación creciente en la ciencia animal, bajo dicho escenario, el conocimiento del potencial forrajero y de impacto ambiental de los principales pastos de clima templado y tropical puede constituir un punto de partida en el área de estudio.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Colecta y procesamiento de forrajes:** Se colectaron diferentes leguminosas y gramíneas en dos regiones del Estado de Michoacán, México durante los meses de septiembre y octubre de 2013. En la región Morelia que se caracteriza por un clima templado con lluvias en verano (Cw). Humedad media de 74.67 %. Con un rango de temperatura de 12 a 22 °C y una precipitación de 600 a 1500 mm; localizada en el centro-norte de Michoacán, entre los paralelos 19°52' y 19°26' de latitud norte; los meridianos 101°02' y 101°31' de longitud oeste; con una altitud entre 1 500 y 3 000 msnm (INEGI, 2009). Se recolectaron las leguminosas: alfalfa (*Medicago sativa*), ebo o janamargo (*Vicia sativa*) y guaje rojo (*Leucaena esculenta*) y las gramíneas: avena (*Avena sativa*), cebada (*Hordeum vulgare*), pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) y pasto estrella de África (*Cynodon plectostachyus*). En el municipio de Tuzantla, con un clima tropical subhúmedo con lluvias en verano (Aw). Con una humedad ambiental media de 82.81%, temperatura entre 14 a 28°C y una precipitación de 800 a 1300 mm<sup>3</sup>. Se ubica entre los paralelos 19°00' y 19°27' de latitud norte; los meridianos 100°26' y 100°47' de longitud oeste; con una altitud entre 500 y 2700 msnm (INEGI, 2009). En éste municipio se recolectaron la leguminosa: guaje (*Leucaena leucocephala*), y las gramíneas: pasto Taiwán (*Pennisetum pupureum*), pasto Tanzania (*Panicum máximum*), pasto llanero (*Andropogon gayanus*) y pasto estrella de África (*Cynodon plectostachyus*).

Todos los forrajes se cortaron al inicio de la floración, pasando por un proceso de henificación y secado en estufa de aire forzado (56 °C por 24 h), moliéndose en un

pulverizador a 300 rpm durante 2 min, tamizándose un tamaño de partícula  $\leq 1$ mm.

Todos los forrajes una vez secos y molidos se evaluaron mediante un análisis proximal para analizar su contenido de proteína cruda, materia seca, extracto etéreo y cenizas.

**Producción de gas in vitro:** Los forrajes se sometieron al proceso de producción de gas *in vitro*, de acuerdo a la técnica descrita por Theodorou *et al.* (1994)<sup>(16)</sup> llevándose a 96 h de cultivo, para ello se incubaron 0.99 g de materia seca (MS) de cada forraje en frascos de vidrio con capacidad de 125 ml para cultivo. Además del sustrato, en los frascos se utilizó un medio de cultivo compuesto (saliva artificial) 90 ml y 10 ml de líquido ruminal como agente inoculante, el cual se obtuvo de dos vacas Holstein adultas, vacías y secas, alimentadas con una dieta de 80% forrajes (alfalfa, avena y rastrojo de maíz) y entre un 15 y 18% de alimento concentrado comercial (Figura 1). Durante el periodo de incubación se llevó a cabo la lectura de producción de gas en tiempo real a intervalos de 4 h, utilizando para ello un manómetro digital desmontable (Luton PS, Germany) con un transductor acoplado a una aguja (Figura 2).

**Medición de metano:** Para la cuantificación de la producción de metano en las muestras, se procedió a capturar 2 ml de biogás a intervalos de 12 h de cultivo, colocándolos en tubos herméticamente sellados de 15 ml de capacidad con 13 ml de salmuera ácida (pH =4) para su conservación. Las muestras de gas capturado se inyectaron a un volumen de 0.5 ml en un cromatógrafo de gases (Varian

Chrompack CP 3800), que utilizo H<sub>2</sub>, aire comprimido extraseco y N<sub>2</sub> como gases de acarreo en una columna empacada de acero inoxidable con sílica gel de 7.5 m de longitud y un diámetro interno de 0.25 mm. Se registró el área de los cromatogramas obtenidos (μVol/min) y tiempo de retención del CH<sub>4</sub>, calculando el porcentaje de metano de cada inyección, utilizando como estándar de referencia CH<sub>4</sub> al 99.99% inyectado a diferentes volúmenes para la construcción de curvas de referencia. El software empleado para la lectura de los cromatogramas fue el galaxie workstation versión 1.9.

**Digestibilidad *in vitro* de los forrajes:** Para conocer la digestibilidad de los forrajes, se analizó la Fibra Neutro Detergente (FDN) en los residuos de la producción de gas *in vitro*, según la técnica descrita por Van Soest *et al.* (1991)<sup>(17)</sup>. Para esto, al término de la incubación de 96 h, cada uno de los frascos de 125 ml se destaparon y se vació su contenido sin dejar residuo en frascos de vidrio de mayor capacidad (300 ml), etiquetados con el número correspondiente a los frascos vaciados, agregándose 50 ml de solución FDN y se taparon con papel aluminio para someterlos a un proceso de digestión en autoclave a 105 °C durante una hora. Para la filtración de la fibra después de la digestión neutra, se colocaron filtros circulares de papel (Whatman 54, U.K.) de 125 mm de diámetro con poro de 54 μm. El proceso de filtración se llevó a cabo con la ayuda de un sistema de vacío impulsado por una bomba eléctrica, armando un embudo acoplado a un matraz de toma (Figura 3). Al finalizar el proceso de filtrado, el residuo de fibra se bañó con acetona para eliminar residuos lipídicos, manteniéndose en aireación ambiental durante 2 h, para su posterior desecado en un horno a 65°C por 24 h.

Se utilizó la siguiente fórmula para calcular el porcentaje de la digestibilidad *in vitro* en base de Materia Seca (%DIVMS):

$$\%DIVMS = ((0.999 \text{ g MS} - (\text{Peso del residuo} - \text{Peso del blanco})) / 0.999) * 100$$

Las variables consideradas fueron: producción total de gas *in vitro* (cm<sup>3</sup>), proporción (%) de metano/ cm<sup>3</sup> y porcentaje de digestibilidad *in vitro* de la Materia Seca %DIVMS

El análisis comprendió una comparación múltiple de muestras bajo un análisis de varianza completamente al azar con una mínima diferencia significativa empleando el software Statgraphics Centurion XVI (2012) <sup>(18)</sup>.

## RESULTADOS

### Análisis bromatológico

Se encontró que las gramíneas con mayor proteína cruda fueron cebada, avena y Tanzania, en el caso de las leguminosas el ebo (*Vicia sativa*) tuvo el valor más alto con aproximadamente 20 % (Cuadro 1).

### Producción total de gas (cm<sup>3</sup>)

Las leguminosas que mostraron la mayor producción de biogás fueron la cebada y la avena (P<0.005), dentro de las leguminosas, destacaron el ebo y la alfalfa (Cuadro 2).

El promedio más bajo en cuanto a la producción de biogás correspondió a la *L. esculenta* con 60.69 cm<sup>3</sup>. Dentro de las gramíneas el pasto kikuyo fue el de menor

producción con 155.10 cm<sup>3</sup>, perfilándose como uno de los forrajes de menor producción de gas. A pesar de que las medias del ebo, el guaje, el pasto estrella, Tanzania, Taiwan, alfalfa y llanero fueron diferentes, no presentaron diferencias significativas (P>0.005).

Todos los forrajes del estudio se comportaron con una cinética de fermentación similar, y la acumulación en la producción de gas *in vitro* fue ascendente hasta las 96 h de incubación.

### **Producción de metano % / cm<sup>3</sup>**

En cuanto a la producción de metano, se encontró que el pasto Tanzania fue el que tuvo el valor más alto (38.69 % /cm<sup>3</sup>) (P<0.005). También la cebada se perfiló con un alto porcentaje de metano respecto a los demás forrajes con 30.73 % /cm<sup>3</sup> (P<0.005) (Cuadro 3).

La *L. esculenta* resultó el forraje con menor producción de metano llegando al 11.97 % /cm<sup>3</sup>, siendo significativamente menor al resto de los forrajes (P<0.005).

### **Digestibilidad *in vitro* de la Materia Seca (%)**

La cebada, la avena y el ebo obtuvieron el mayor porcentaje de digestibilidad *in vitro* en base de Materia Seca (%DIVMS) con 90.48, 88.25 y 87.57 %DIVMS respectivamente (P<0.05). Las demás gramíneas y leguminosas independientemente de la región donde se recolectaron obtuvieron valores de digestibilidad similares (P>0.05) (Cuadro 4), exceptuando la *L. esculenta* que tuvo el menor desempeño a comparación de los demás forrajes con un 65.74 % (P<0.05)

## DISCUSIÓN

### Producción total de gas (cm<sup>3</sup>)

Con la evaluación de gas acumulado se aprecian las diferencias en la fermentación de los forrajes<sup>(19,20)</sup>. El promedio de gas acumulado fue mayor en la cebada y avena; aunque estudios indican que algunas leguminosas como la alfalfa, supera a las gramíneas hasta en un 40% en la producción de gas<sup>(21,22)</sup>; en el presente trabajo, los resultados concuerda con estudios donde a la cebada y la avena se les caracteriza por su alto perfil de volumen de gas acumulado, relacionado con su alta DIVMS<sup>(23)</sup>, debido posiblemente a variaciones de los componentes químicos de las plantas, por ejemplo; el contenido de carbohidratos estructurales y no estructurales o el de proteína cruda<sup>(24)</sup>.

El bajo promedio que obtuvo la *L. esculenta* incluso por debajo de los demás forrajes, concordó en donde comparando con otras leguminosas, la *L. esculenta* obtuvo el más bajo promedio en el total de producción de gas con 53.2 ml/MS tras 72 h de incubación<sup>(25)</sup> y 63.7 ml/MS después de 96 h<sup>(26)</sup>. La baja producción de gas en leguminosas puede estar atribuido a la cantidad de taninos condensados en la planta; compuestos polifenólicos que varían en la planta cambiando su concentración y actividad biológica según las condiciones ambientales donde se desarrolle la leguminosa; estos polímeros complejos se ligan a compuestos carbonados de la dieta modificando su digestibilidad. También se puede deber a capacidad citotóxica en bacterias celulolíticas o protozoarios, ocasionando una defaunación en la flora microbiana ruminal y por consiguiente un bajo aprovechamiento del sustrato<sup>(27,28,29)</sup>.

La similitud en las medias de los demás forrajes estudiados, se pueden relacionar a factores que tienen más relevancia <sup>(30)</sup> como etapa fenológica de los pastos, composición química, época de corte, contenido proteico y proporción de pared celular que al tipo de planta, ya sea C3 o C4<sup>(31,32)</sup>.

### **Proporción (%) de metano/cm<sup>3</sup>**

El mayor porcentaje de producción de metano por cm<sup>3</sup> del pasto Tanzania, planta C4 recolectada en clima tropical concuerda con estudios, donde en un estudio donde recopilaron información de la producción de CH<sub>4</sub> explican que la producción de metano fue mayor en animales alimentados con gramíneas C4 (33.7 L/kg consumo de MS) en comparación con los alimentados con C3 (30 L/kg consumo de MS)<sup>(33)</sup>. Sin embargo, el alto perfil metanogénico que también obtuvo la cebada, planta C3 de clima templado, pueden atribuirse a que los cambios del potencial metanogénico de los pastos se relacionan en mayor medida a diferencias en la tasa de degradación<sup>(34,35)</sup>, composición de carbohidratos estructurales y no estructurales<sup>(36)</sup>, que al efecto del tipo de plantas C3 o C4<sup>(37)</sup>.

La baja producción de metano en la *L. esculenta* concuerda con estudios donde las leguminosas cultivadas en clima templado fueron las que tuvieron menor proporción de metano (30.1 L/kg consumo de MS) en los animales alimentados por ellas, similar a las emisiones por gramíneas C3 en el mismo estudio <sup>(33)</sup>. A si mismo concuerda con resultados *in vitro*, que muestran que la reducción en la producción de CH<sub>4</sub> de las leguminosas respecto a las gramíneas, fue acompañada por efectos negativos sobre la digestibilidad de las leguminosas<sup>(28,38,39)</sup>. Esto

acompañado a su perfil de metabolitos secundarios, ya que estudios de leguminosas donde se incluye la Alfalfa y la *L. leucocephala*, se observa como sus concentraciones de estos taninos y saponinas alteran la metanogénesis ruminal<sup>(40,41)</sup>, debido principalmente a la defaunación selectiva de microorganismos metanogénicos en el rumen o de bacterias celulolíticas<sup>(38)</sup>. Que aunque en el presente estudio no se analizaron los metabolitos secundarios, la producción de gas y digestibilidad, pueden sugerir la toxicidad de dichos forrajes.

### **Digestibilidad *in vitro* de la Materia Seca**

La alta digestibilidad del ebo (*Vicia sativa*) no se vio reflejada en la producción de gas, lo que puede deberse a un alto contenido de proteína cruda (PC) que pudiera caracteriza esta especie forrajera, la cual al originar amonio provoca un desequilibrio en el carbonato, neutralizando los iones H<sup>+</sup> de los AGV, limitando la liberación de CO<sub>2</sub>; lo cual se relaciona con una menor producción gas durante la fermentación, aunque la leguminosa fuera altamente digestible<sup>(42)</sup>.

La digestibilidad de la avena y la cebada concuerdan con el principio de la técnica utilizada, que se refiere a que la cantidad de gas liberada, cuando una muestra de alimento es incubada *in vitro* con líquido ruminal, es directamente proporcional con la digestibilidad o la degradación del sustrato de la muestra y por lo tanto con el valor energético del alimento<sup>(19,20,43,44)</sup>.

El % DIVMS del *P. clandestinum*, *C. plectostachyus*, *P. maximum*, *P. purpureum*, *A. gayanus*, *L. leucocephala*, *Vicia sativa* y *Medicago sativa*, indican elevada disponibilidad de nutrientes para los microorganismos ruminales, los bajos valores

pueden ser el resultado de mayores cantidades de FDN, cuyos componentes químicos pueden reducir la velocidad de fermentación de los sustratos. La FDN, de hojas de arbustos y árboles de las regiones tropicales pueden ser responsables de la baja producción de gas *in vitro* <sup>(30,45)</sup>.

### **CONCLUSIONES**

Las gramíneas de la región templada avena y cebada fueron las especies que se comportaron con el mayor potencial forrajero *in vitro*, por la producción de gas y digestibilidad.

A excepción del ebo, las leguminosas presentaron un menor potencial forrajero *in vitro* con una baja producción de gas, digestibilidad y potencial metanogénico respecto a todas las gramíneas del estudio.

El pasto Tanzania del trópico mostro la mayor producción de metano, seguido por la cebada. Los demás forrajes tuvieron un comportamiento similar entre ellos.

*L. esculenta* fue el forraje con menor producción de gas, baja digestibilidad y potencial metanogénico. Por lo que se puede utilizar como alternativa para la mitigación de metano en rumiantes, sin embargo se requieren pruebas de toxicidad y estudios bromatológicos.

### **AGRADECIMIENTOS**

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada al primer autor y al Consejo Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación del Estado de Michoacán, así como a la Coordinación de la Investigación

Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por el financiamiento para el desarrollo del presente trabajo.

**Cuadro 1.-** Análisis bromatológico de distintas gramíneas y leguminosas forrajeras de clima templado y tropical

Especie	PC (%)	MS (%)	EE (%)	Cenizas (%)
<i>Hordeum vulgare</i>	9.58	95.12	1.42	7.91
<i>Avena sativa</i>	9.56	95.04	2.26	8.17
<i>Panicum maximum</i>	8.31	95.12	1.12	11.84
<i>Andropogon gayanus</i>	7.04	95.09	0.91	0.84
<i>Pennisetum purpureum</i>	7.96	95.07	1.315	14.53
<i>Cynodon plectostachyus</i> (tropical)	12.16	95.13	1.7	11.81
<i>Cynodon plectostachyus</i> (templado)	11.24	95.11	1.57	10.75
<i>Pennisetum clandestinum</i>	13.21	95.79	0.545	13.05
<i>Leucaena leucocephala</i>	17.89	95.11	5.34	7.125
<i>Medicago sativa</i>	16.75	95.03	3.07	10.9
<i>Leucaena Esculenta</i>	17.06	95.2	2.87	4.99
<i>Vicia sativa</i>	19.73	95.8	2.81	11.39

**Cuadro 2.** Diferencias en la acumulación de producción de gas *in vitro* a las 96 h de gramíneas y leguminosas de clima templado y tropical en Michoacán, México.

<b>Nombre común del forraje</b>	<b>Nombre científico del forraje</b>	<b>Familia botánica</b>	<b>Clima de la región de colecta</b>	<b>Promedio gas total acumulado (cm<sup>3</sup>)</b>
Kikuyo	<i>P. clandestinum</i>	Gramineae	Templada	155.10± 16.59 <sup>c</sup>
Estrella de África	<i>C. plectostachyus</i>	Gramineae	Templada	197.45± 5.43 <sup>b</sup>
Avena	<i>Avena sativa</i>	Gramineae	Templada	278.13± 34.53 <sup>a</sup>
Cebada	<i>H. vulgare</i>	Gramineae	Templada	286.829± 26.71 <sup>a</sup>
Tanzania	<i>P. maximum</i>	Gramineae	Tropical	223.39± 36.25 <sup>b</sup>
Taiwan	<i>P. purpureum</i>	Gramineae	Tropical	177.22± 44.16 <sup>b</sup>
Llanero	<i>A. gayanus</i>	Gramineae	Tropical	218.56± 35.77 <sup>b</sup>
Estrella de África	<i>C. plectostachyus</i>	Gramineae	Tropical	163.29± 52.71 <sup>b</sup>
Guaje	<i>L. leucocephala</i>	Leguminosae	Tropical	156.54± 31.70 <sup>b</sup>
Guaje rojo	<i>L. esculenta</i>	Leguminosae	Templada	60.69± 20.24 <sup>d</sup>
Ebo	<i>Vicia sativa</i>	Leguminosae	Templada	238.93± 33.47 <sup>b</sup>
Alfalfa	<i>Medicago sativa</i>	Leguminosae	Templada	214.66± 53.59 <sup>b</sup>

<sup>a,b,c,d</sup> Diferente literal en la misma columna indica diferencia significativa (P<0.005)

**Cuadro 3.** Proporción relativa de CH<sub>4</sub> producido *in vitro* por diferentes especies de gramíneas y leguminosas de clima templado y tropical en Michoacán, México.

Nombre común del forraje	Nombre científico del forraje	Familia botánica	Clima de la región de colecta	Proporción de CH <sub>4</sub> por cm <sup>3</sup> (cm <sup>3</sup> /cm <sup>3</sup> )
Kikuyo	<i>P. clandestinum</i>	Gramineae	Templada	0.1957 <sup>d</sup>
Estrella de África	<i>C. plectostachyus</i>	Gramineae	Templada	0.2284 <sup>d</sup>
Avena	<i>Avena sativa</i>	Gramineae	Templada	0.1742 <sup>d</sup>
Cebada	<i>H. vulgare</i>	Gramineae	Templada	0.3073 <sup>a</sup>
Tanzania	<i>P. maximum</i>	Gramineae	Tropical	0.3869 <sup>b</sup>
Taiwan	<i>P. purpureum</i>	Gramineae	Tropical	0.2000 <sup>d</sup>
Llanero	<i>A. gayanus</i>	Gramineae	Tropical	0.1731 <sup>d</sup>
Estrella de África	<i>C. plectostachyus</i>	Gramineae	Tropical	0.1248 <sup>d</sup>
Guaje, guaje blanco, Guash	<i>L. leucocephala</i>	Leguminosae	Tropical	0.1792 <sup>d</sup>
Guaje rojo	<i>L. esculenta</i>	Leguminosae	Templada	0.1197 <sup>c</sup>
Ebo	<i>Vicia sativa</i>	Leguminosae	Templada	0.2244 <sup>d</sup>
Alfalfa	<i>Medicago sativa</i>	Leguminosae	Templada	0.1906 <sup>d</sup>

<sup>a,b,c,d</sup> Diferente literal en las columnas indica diferencia significativa (P<0.005)

**Cuadro 4.** Porcentaje de la digestibilidad *in vitro* de materia seca (%DIVMS) en gramíneas y leguminosas de clima templado y tropical en Michoacán, México.

Nombre común del forraje	Nombre científico del forraje	Familia botánica	Clima de la región de colecta	%DIVMS
Kikuyo	<i>P. Clandestinum</i>	Gramineae	Templada	73.86±0.123 <sup>a</sup>
Estrella de África	<i>C. plectostachyus</i>	Gramineae	Templada	75.10 ± 0.016 <sup>a</sup>
Avena	<i>Avena sativa</i>	Gramineae	Templada	88.25±0.008 <sup>b</sup>
Cebada	<i>H. vulgare</i>	Gramineae	Templada	90.48±0.081 <sup>b</sup>
Tanzania	<i>P. maximum</i>	Gramineae	Tropical	81.86±0.118 <sup>a</sup>
Taiwan	<i>P. purpureum</i>	Gramineae	Tropical	73.99±0.052 <sup>a</sup>
Llanero	<i>A. gayanus</i>	Gramineae	Tropical	78.76±0.020 <sup>a</sup>
Estrella de África	<i>C. plectostachyus</i>	Gramineae	Tropical	74.4±0.157 <sup>a</sup>
Guaje	<i>L. leucocephala</i>	Leguminosae	Tropical	83.97±0.085 <sup>a</sup>
Guaje rojo	<i>L. esculenta</i>	Leguminosae	Templada	65.74 ±0.016 <sup>c</sup>
Ebo	<i>Vicia sativa</i>	Leguminosae	Templada	87.57±0.019 <sup>b</sup>
Alfalfa	<i>Medicago sativa</i>	Leguminosae	Templada	83.3±0.085 <sup>a</sup>

<sup>a,b,c</sup>. Diferente literal en las columnas indica diferencia significativa (P<0.05)

## LITERATURA CITADA

1. INEGI. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. PIB y Cuentas Nacionales. PIB - Actividad de los Bienes y Servicios, anual. Producto Interno Bruto a precios de 2008, por sector de actividad económica. México. 2014. Disponible: <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/cn/bs/>. Consultado 10 dic, 2014.
2. SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Resumen Nacional Producción, Precio, Valor, Animales Sacrificados y Peso 2013. Mexico. 2013. Disponible: <http://www.siap.gob.mx/resumen-nacional-pecuario/>. Consultado 10 dic, 2014).
3. SEMARNAT. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Mexico's Profile for Livestock Waste Management. Presented in the Methane to Markets, Agriculture Subcommittee; 2008. Disponible: [http://www.globalmethane.org/documents/ag\\_cap\\_mexico.pdf](http://www.globalmethane.org/documents/ag_cap_mexico.pdf). Consultado 10 mar, 2014.
4. FAO. Food and Agriculture Organization. Strategy for sustainable use of natural renewable resources: constraints and opportunities. Animal Feed Resources Information System; 2006.
5. Disponible: <http://www.fao.org/ag/aga/agap/frg/econf95/HTML/PRESTON>. Consultado 10 may, 2014.
6. INEGI. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Censo Agropecuario 2007. Características del sector agropecuario y forestal en Michoacán de Ocampo. Mexico. 2007. Disponible: [http://www.inegi.org.mx/prod\\_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/ce](http://www.inegi.org.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/ce)

[nsos/agropecuaria/2007/agro\\_forestal/mich/CSAgroForCA.pdf](https://www.repositorio.cesga.org/handle/document/2007/agro_forestal/mich/CSAgroForCA.pdf) . Consultado 14 oct 2014.

7. Faría JM, (2006). Estrategias de alimentación con pastos y cultivos forrajeros. XII Congreso Venezolano Producción e Industria Animal. AVPA-INIA-UCV, Maracay, Venezuela. 2006:235-238.
8. De Klein C A M, Pinares-Patino C, Waghorn GC. Greenhouse gas emissions. In: environmental impacts of pasture-based farming. Edited by Richard W. McDowell. CAB international publishing, London, U.K. 2008. 2:11-12.
9. Cottle DJ, Nolan JV, Wiedemann SG. Ruminant enteric methane mitigation: a review. Anim Prod Sci 2011;(51):491-514.
10. Aguado GASQ, Rascón CJL, Pons HO, Grageda CE, García M. Manejo biotecnológico de gramíneas forrajeras. Tec Pecu Méx 2004;(42):261-2762.
11. Beauchemin KA, Kreuzer M, O'mara F, McAllister TA. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. Aust J Exp Agri 2008;48: 21-27.
12. Steinfeld H, Gerber P, Wassenaar T, Castel V, Rosales M, De Haan C. La larga sombra del Ganado. Problemas ambientales y opciones. LEAD-FAO. Roma, Italia. 2009: 464.
13. Johnson KA, Johnson DE. Methane emissions from cattle. J Anim Sci 1995 (73):2483-2492.
14. Demeyer D, Fievez V. Ruminants at environment: la méthanogénèse (Ruminants and environment: methanogenesis). Ann Zoo 2000 (49):95-112.

15. ONU. Organización de las Naciones Unidas. Protocolo Kyoto de la Convención Marco de Las Naciones Unidas sobre el cambio climático. Naciones Unidas. Kyoto. 1998.
16. IPCC. Intergovernmental Panel on Climate Change. Climate change 2013: The Physical Science Basis [Summary]. Fifth Assessment Report Of The Intergovernmental Panel On Climate Change. Switzerland. 2013. 5:12.
17. Theodorou KM, Williams AB, Dahona SM, McAllan BA, France J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim Feed Sci Technol* 1994 48:185-197.
18. Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J Dairy Sc* 1991 74:3583-3597.
19. Statgraphics Centurion XVI. Statpoin Technologies Inc. 2012.
20. Menke KH, Raab L, Salewski A, Steingass H, Fritz D, Schneider W. The estimation of the digestibility and metabolisable energy content of ruminant feeding stuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor. *J Agric Sci* 1979 93:217–222.
21. Krishnamoorthy U, Soller H, Steingass H, Menke KH. Energy and protein evaluation of tropical feedstuffs for whole tract and ruminal digestion by chemical analyses and rumen inoculum studies in vitro. *Anim Feed Sci Technol* 1995 52 (3-4):177-188.
22. Blümmel M, Becker K. The degradability characteristics of fifty four roughages and roughage neutral-detergent fibers as described by in vitro

- gas production and their relationship to voluntary feed intake. *Br J Nutr* 1997 77:757-768.
23. Juárez AR, Cerrillo MS, Gutierrez EO, Romero ET, Colin JN, Bernal HB. Estimación del valor nutricional de pastos tropicales a partir de análisis convencionales y de la producción de gas *in vitro*. *Tec Pecu Mex* 2009 47 (1):55-67
24. Singh S, Kushwaha BP, Nag SK, Mishra AK, Singh A, Anele UY. *In vitro* ruminal fermentation, protein and carbohydrate fractionation, methane production and prediction of twelve commonly used Indian green forages. *Anim Feed Sci Technol* 2012 178:2–11.
25. Santoso B, Hariadi BT. Evaluation of nutritive value and *in vitro* methane production of feed stuffs from agricultural and food industry by-products. *J Indonesian Trop Anim Agric* 2009 34:189–195.
26. Salem AZM, ZHOU Chuan-she, TAN Zhi-liang, Mellado M, Moises Cipriano MS, Mona MM, Elghandopur Y, Odongo NE, (2013). *In vitro* Ruminant Gas Production Kinetics of Four Fodder Trees Ensiled With or Without Molasses and Urea. *J Integr Agr* 2013 12(7):1234-1242.
27. Nherera FV, Ndlovu LR, Dzowelab BH. Relationships between *in vitro* gas production characteristics, chemical composition and *in vivo* quality measures in goats fed tree fodder supplements. *Small Ruminant R* 1999 31:117-126.
28. Chesson A, Forsberg CW. Polysaccharide degradation by the rumen microorganisms. *The Rumen Microbial Ecosystem*. 2nd ed. New York: Chapman & Hall; 1997: 329–381.

29. Tiemann TT, Avila P, Ramírez G, Lascano CE, Kreuzer M, Hess HD. *In vitro* ruminal fermentation of tanniferous tropical plants: Plant-specific tannin effects and counteracting efficiency of PEG. *Anim Feed Sci Technol* 2008 146:222-241.
30. Theodoridou K, Aufrere J, Andueza D, Pourrat J, Le Morvan A, Stringano E, Muelle-Harvey I, Baumont R. Effects of condensed tannins in fresh sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) on *in vivo* and *in situ* digestion in sheep. *Anim Feed Sci Technol* 2010 159:122-130.
31. Tan HY, Sieo CC, Abdullah N, Lian JB, Huang XD, Ho YW. Effects of condensed tannins from *Leucaena* on methane production, rumen fermentation and populations of methanogens and protozoa *in vitro*. *Anim Feed Sci Technol* 2011 169:185–193.
32. Cooper JP, Tainton NM. Light and temperature requirements for growth of tropical and temperate grasses. *Herb abstr* 1968 38:167-176.
33. Pérez JP, Alarcón BZ, Mendoza GDM, Barcena RG, Hernández AG, Herrera JGH. Efecto de un banco de proteína de kudzu en la ganancia de peso de toretes en pastoreo de estrella africana. *Tec Pecu Mex* 2001 39:39-52.
34. Archimède H, Eugène M, Magdeleine MC, Boval M, Martin C, Morgavi DP, Lecomte P, Doreau M. Comparison of methane production between C3 and C4 grasses and legumes. *Anim Feed Sci Technol* 2011 166–167:59–64.
35. Muetzel S, Knight TW, Hoskin SO, Molano G, Maclean S, Silva-Villacorta D, Clark H. Level of intake and physiological state influences methane emissions from sheep fed fresh pasture. In Chilliard Y, Glasser F,

- Faulconnier Y, Bocquier F, Vissier, I, Doreau M. Ruminant physiology, digestion metabolism and effects of nutrition on reproduction and welfare. Proceedings of the XI International Symposium on Ruminant Physiology. Edmonton, Canada. 2009.
36. Sun XZ, Hoskin SO, Zhang GG, Molano G, Muetzel S, Pinares-Patiño CS, Clark H, Pacheco D. Sheep fed forage chicory (*Cichorium intybus*) or perennial ryegrass (*Lolium perenne*) have similar methane emissions. Anim Feed Sci Technol 2011 172:217-225.
37. Pinares-Patiño CS, Holmes CW, Lassey KR, Ulyatt MJ. Measurement of methane emission from sheep by the sulphur hexafluoride tracer technique and by the calorimetric chamber: failure and success. Anim 2008 2(1):141-148.
38. Klevenhusen F, Bernasconi SM, Hofstetter T, Bolotin J, Kunz C, Soliva CR. Efficiency of monolaurin in mitigating ruminal methanogenesis and modifying C isotope fractionation when incubating diets of either C3 or C4 plants in a rumen simulation technique (Rusitec) system. Br J Nutr 2009 8(6): 1-11.
39. Hess HD, Monsalve LM, Lascano CE, Carulla JE, Díaz TE, Kreuzer M. Supplementation of a tropical grass diet with forage legumes and *Sapindus saponaria* fruits: effects on in vitro ruminal nitrogen turnover and methanogenesis. Aust J Agric Res 2003 54:703-713.
40. Grainger C, Clarke T, McGinn SM, Auldist MJ, Beauchemin KA, Hannah GC, Waghorn GC. Methane emissions from dairy cows measured using the

- sulfur hexafluoride (SF6) tracer and chamber techniques. *J Dairy Sci* 2007 90:2755-2766.
41. Waghorn GC, Woodward SL, Tavendale M, Clark DA, (2006). Inconsistencies in rumen methane production— effects of forage composition and animal genotype. *International Congress Series* 1293:115–118
42. Jouany JP, Morgavi DP. Use of ‘natural’ products as alternatives to antibiotic feed additives in ruminant production. *Anim* 2007 1:1443-1466.
43. Cone JW, Van Gelder AH. Influence of protein fermentation on gas production profiles. *Anim Feed Sci Technol* 1991 76:251–264
44. Menke KH, Steingass H, (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Anim Res Develop* 28:7-55.
45. Blümmel M, Ørskov ER. Comparison of in vitro and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. *Anim Feed Sci Technol* 1993 40:109–119.
46. Rodríguez R, Fondevila M, Castrillo C. *In vitro* ruminal fermentation of *Pennisetum purpureum* CT-115 supplemented with four tropical browse legume species. *Anim Feed Sci Technol* 2009 151:65-74

**CAPITULO 2.- Artículo Publicado en la Revista Ecosistemas y Recursos Agropecuarios. 3 (9): 335-344, 2016**

**Aceites vegetales y Metanogénesis *in vitro***

**REDUCCIÓN DE LA METANOGÉNESIS RUMINAL *IN VITRO* CON ACEITES VEGETALES ALTERNATIVOS: *Thevetia peruviana* y *Persea americana*.  
*IN VITRO* RUMINAL METHANOGENESIS REDUCTION WITH ALTERNATIVE**

**VEGETABLE OILS: *Thevetia peruviana* AND *Persea americana*.**

Karlos Edmundo Orozco Durán<sup>1</sup>, José Herrera Camacho<sup>1\*</sup>, Octavio Alonso Castelán Ortega<sup>2</sup>, Liliana Márquez Benavides<sup>1</sup>, Otoniel Buenrostro Delgado<sup>1</sup>, Juan Carlos Kú Vera<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Carretera Morelia-Zinapécuaro Km 9.5. El Trébol, C.P. 58893. Tarímbaro, Michoacán, México. [\\*josheca@hotmail.com](mailto:*josheca@hotmail.com)

<sup>2</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México.

<sup>3</sup> Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Autónoma de Yucatán.

## **RESUMEN**

Con la finalidad de reducir la producción de metano (CH<sub>4</sub>) *in vitro*, se evaluó el efecto de la adición de diferentes proporciones (1 % al 6 %) de aceites de semillas de *Thevetia peruviana* (TP) y de frutos de aguacate (AG) en cultivos de fluido ruminal bovino. Se evaluó la producción de gas (PG), CH<sub>4</sub>, además de la digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) y de la fibra detergente neutra (DIVFDN). Se utilizó un modelo lineal con contrastes ortogonales para el análisis

de datos. Se encontró un efecto lineal y cuadrático sobre la producción de gas a partir del 4% de inclusión de ambos aceites ( $P < 0.0001$ ), con una producción promedio de  $220 \text{ cm}^3$ . En cuanto a la producción de metano, se encontró una disminución a partir del 3% de inclusión en ambos tratamientos ( $P < 0.0001$ ), con un efecto lineal al aumentar la dosis de aceites. La DIVMS del tratamiento control fue del 67.2%, disminuyendo significativamente a partir de los niveles 4, 5 y 6 % en ambos tratamientos, la DIVFDN, mostró una tendencia similar, disminuyendo en ambos tratamientos de manera significativa a partir del 4% de inclusión de ambos aceites. Para todas las variables evaluadas se encontró un efecto de la dosis de aceite, mas no se observó un efecto del tipo de aceite. En conclusión, el nivel del 3 % de suplementación de aceites de TP y AG, redujo la producción de  $\text{CH}_4$  sin afectar la producción de gas, ni la digestibilidad del forraje, por lo que puede ser el nivel más apropiado para evaluar su potencial en condiciones *in vivo*.

**Palabras Clave:** ácidos grasos, rumiantes, cambio climático

## **SUMMARY**

In order to reduce the production of methane ( $\text{CH}_4$ ) on *in vitro* conditions, the effect of adding different proportions (1 % to 6 %) of *Thevetia peruviana* seed oils (TP) and avocado fruit (AG) was evaluated in a cultured bovine rumen fluid system. The production of gas (GP),  $\text{CH}_4$  was assessed, in addition to the *in vitro* dry matter digestibility (IVDMD) and neutral detergent fiber digestibility (IVDNDF). All variables were compared against a control treatment (100 % grass). Both linear and quadratic effects were found over gas production from 4 % inclusion of both oils ( $P < 0.001$ ) with an average production of  $220 \text{ cm}^3$ . As for methane production,

a decrease was found from 3% inclusion in both treatments ( $P < 0.0001$ ), with a linear effect when the oils doses were increased. IVDMD of control treatment was 67.2 %, significantly decreasing from levels 4, 5 and 6 % for both treatments, IVDNDF showed a similar trend, falling in both treatments significantly from 4% inclusion in both oils. For all variables an effect of oil doses was found, but not an effect related to the type of the oil. In conclusion, 3 % of TP and AG oil supplementation reduces  $CH_4$  production without affecting changes in gas production, either forage digestibility, so it could be more appropriate to evaluate its potential level *in vivo* conditions.

**Key Words:** fatty acids, ruminants, climate change.

## **INTRODUCCION**

La fermentación entérica de los carbohidratos estructurales de pastos y forrajes (celulosa, hemicelulosa y lignina) es la principal fuente  $CO_2$  y metano ( $CH_4$ ), emitidos por el sector agropecuario mundial (Steinfeld *et al.* 2009, Eckard *et al.* 2010, Dewhurst 2013). En el rumen se genera cerca del 90 % del metano liberado al medio ambiente proveniente de la actividad ganadera (Cottle *et al.* 2011, Gerber *et al.* 2013). En producción animal, la generación de metano representa energía liberada al ambiente, que no se aprovecha para el mantenimiento y producción de los rumiantes y por tanto, hace que sea menos eficiente el uso de los recursos forrajeros. Ésta pérdida fluctúa entre el 3 y 13 % de la energía bruta contenida en la ración (Johnson y Johnson 1995, Moss *et al.* 2000, Miller y Wollin 2001).

Dentro de las estrategias alimenticias para mitigar la metanogénesis entérica, la suplementación con fuentes de ácidos grasos poliinsaturados de origen animal o

vegetal, se postula como una medida efectiva (Martin *et al.* 2010, Hristov *et al.* 2013, Kumar *et al.* 2014). Los ácidos grasos poliinsaturados mitigan la producción de metano mediante la captación de iones de  $H_2$  libre, saturando los enlaces dobles en sus cadenas, y así disminuyen la disponibilidad de  $H_2$  para la síntesis de  $CH_4$ . Sin embargo, la suplementación alimenticia con grasas, aceites y fuentes de ácidos grasos se ha asociado a una reducción en la cinética de fermentación y en la degradabilidad de los sustratos (Hook *et al.* 2010, Hristov *et al.* 2012), disminuyendo la tasa de fermentación ruminal y modificando los patrones de síntesis de ácidos grasos volátiles en el rumen, ya que aumenta la síntesis de butirato y disminuye la proporción molar de acetato (Benchaar *et al.* 2007, Macheboeuf *et al.* 2008, Kong *et al.* 2010). Algunos aceites derivados de partes de algunas plantas, tienen en su composición química algunos metabolitos secundarios (terpenoides, isoprenoides, compuestos aromáticos entre otros.) que contribuyen a la reducción de las emisiones de metano mediante la defaunación selectiva de las poblaciones de protozoarios y metanógenos asociados (Agarwal *et al.* 2009, Mao *et al.* 2010, Benchaar y Greathead 2011).

El uso de aceites vegetales ricos en ácidos grasos poliinsaturados en nutrición animal, ha sido cuestionado, ya que éstos compiten con la nutrición humana; sin embargo, si son accesibles en costo, abundancia relativa y adicionalmente poseen metabolitos secundarios, éstos representan una alternativa para la mitigación de  $CH_4$  en la producción ganadera (Beauchemin *et al.* 2008, Sallam *et al.* 2009)

A nivel mundial, más de la mitad de los rumiantes domésticos habitan en las regiones tropicales, en las que consumen forrajes de baja digestibilidad y con una disponibilidad sujeta a las condiciones climáticas y estacionales, no obstante, persiste una presión constante por una mayor cantidad y calidad de productos de origen animal (Bowman *et al.*, 2005, FAO, 2009). En dicho contexto, el uso de complementos alimenticios como los aceites vegetales provenientes de especies nativas en las regiones ganaderas son un recurso renovable y sustentable (Abdalla *et al.* 2012). Los aceites de adelfa amarilla (*Thevetia peruviana*) y de aguacate, (*Persea americana*) poseen un rendimiento y perfil de ácidos grasos similares a fuentes lipídicas como soya, coco, canola y girasol (Chandra y Basumatary 2011, Yanty *et al.* 2011, Odihambo *et al.* 2012). Adicionalmente, en el aceite de adelfa amarilla se han descrito propiedades insecticidas, antibióticas y antifúngicas (Kareru *et al.* 2010). Por otro lado en el aceite de aguacate se han encontrado compuestos bioactivos como fenoles, alcanos, cetonas, fitoesteroles y carotenos (Dos Santos *et al.* 2014). Aunque no se ha documentado su comportamiento ni su toxicidad en sistemas de fermentación ruminal *in vitro*, ambos aceites son candidatos en nutrición animal como mitigadores de metano teniendo en cuenta su composición química.

El objetivo del estudio fue evaluar el efecto de la inclusión de diferentes proporciones de aceites de adelfa amarilla (*Thevetia peruviana*) y aguacate Hass (*Persea americana*) sobre la metanogénesis y la digestibilidad de un pasto tropical *in vitro*.

## **MATERIAL Y METODOS**

El estudio se desarrolló en las instalaciones del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana De San Nicolás de Hidalgo, en Tarímbaro, Michoacán, México, región ubicada a los 19° 45' 00" latitud norte y 19° 54' 00" de longitud oeste, a una altitud media sobre el nivel del mar de 1883 m. El clima predominante es templado subhúmedo con lluvias en verano (Cw1) (García, 1964).

**Extracción de aceites y perfil de ácidos grasos.** Para la obtención de aceite de adelfa amarilla (*T. peruviana Schum*) (TP) se cosecharon frutos maduros en el municipio de Tuzantla, Michoacán, región clasificada como tropical subhúmeda con lluvias en verano (Aw0) (García, 1964). Las semillas limpias se sometieron a un proceso de prensado mecánico a temperatura ambiente, separando el aceite crudo, que se filtró y almacenó en frascos ámbar a temperatura ambiente y adicionando 0.1 ml de vitamina E como agente conservante.

El aceite de aguacate Hass (*P. americana Miller var Hass*) (AG) se obtuvo de frutos no aptos para la comercialización en huertos y empacadoras del municipio de Nuevo Parangaricutiro, Michoacán, región de clima templado (Cw1), a una altura media de 1600 msnm. Los frutos se deshidrataron a 65 °C durante 48 h y se trituraron para obtener una pasta, de la cual se extrajo la fracción oleosa de acuerdo al método No. 30 descrito por la AOAC (2000), utilizando como solvente orgánico hexano grado reactivo.

En ambos aceites se analizó el perfil de ácidos grasos, a partir de una muestra de 50 mg que se mezcló en 6 ml de solución Folch durante 24 h. Posteriormente las muestras se sometieron a sonicación durante 15 min, en baño de hielo, para su

posterior evaporación a 30 °C. A las muestras se les realizó un proceso de derivación lipídica de acuerdo al método descrito por Folch *et al.*, (1957) con 2.5 ml de una solución metanol: ácido clorhídrico (95:5), manteniéndose a 85 °C durante 2.5 h. Luego, las muestras se diluyeron al 5% con hexano, adicionándose 10 µl de butil hidroxil tolueno como antioxidante y 10 µl de ácido tricosanoico como estándar interno. Las muestras se colocaron en viales para cromatografía color ámbar, realizándose su posterior inyección de modo automático en un cromatógrafo de gases (Agilent 6850, USA) a un volumen de 1 µl. Se utilizó una columna (Agilent BD-23, USA) de 50 % Cyanopropyl, 50% methylpolysiloxano, con una longitud de 30 m X 0.25 mm de espesor y un diámetro interno de 0.25 µm. Como gas de acarreo se usó Helio grado cromatográfico, con un flujo de H<sub>2</sub> a 40 ml/min. Finalmente se realizó la identificación y el cálculo de la concentración relativa de los ácidos grasos comparando el tiempo de retención de las muestras y al área de los cromatogramas contra los estándares de referencia dentro del mismo análisis (37 componente FAME mix, supelco y marinol).

**Forraje sustrato.** Se utilizó heno de pasto estrella africana (*Cynodon plechtostachyus*) a inicio de floración con 12.1 % de proteína cruda, 1.7 % de extracto etéreo, 71.29 % de fibra detergente neutra (FDN), 28.29 % de fibra detergente ácida (FDA) y 35.49 % de extracto libre de nitrógeno (AOAC, 2006). El pasto se deshidrató en un horno de aire forzado (56 °C por 24 h), pasando por un pulverizador a 300 rpm durante 2 min, tamizándose a un tamaño de partícula de 1 mm, teniendo un porcentaje de materia seca del 94 %.

**Cultivo *in vitro*.** Los tratamientos se sometieron a un proceso de digestión *in vitro* durante 96 h, de acuerdo a la técnica descrita por Theodorou *et al.* (1994). El

cultivo se realizó en botellas de vidrio con capacidad de 125 ml, herméticamente selladas con un tapón de goma. Los frascos contuvieron al forraje sustrato, 90 ml de una solución de saliva artificial y 10 ml de líquido ruminal como agente inoculante. Para la extracción de líquido ruminal se utilizaron dos vacas Holstein secas e intactas, con un peso promedio de  $540 \pm 30$  Kg. Los animales se alimentaron con una dieta de 80% forraje (ensilado y rastrojo de maíz) y 20% alimento concentrado comercial. La extracción de líquido ruminal se realizó mediante la inserción de una sonda orogástrica con punta roma (0.5" de diámetro), bajo un proceso previo de sedación con  $0.25 \text{ mg/kg}^1$  de clorhidrato de xilazina. La sonda se acopló a una bomba manual de vacío, depositándose el líquido ruminal en un contenedor térmico herméticamente sellado y a una temperatura de  $38.5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Durante la extracción de fluido ruminal, la primera porción obtenida fue descartada, dado su contenido de saliva. El cultivo se realizó a  $39 \text{ }^\circ\text{C}$  de manera constante y la medición de la producción de gas se realizó con un manómetro digital portátil (Lutron PS, Alemania) cada 60 min, durante las primeras 8 h de cultivo, para posteriormente realizarse a intervalos de 4 h, hasta la conclusión (96 h).

**Tratamientos.** Se sometieron a cultivo 9 frascos por cada tratamiento, los cuales fueron los siguientes: control 0/100 (0 g aceite/ 1 g de MS del forraje que se utilizó como sustrato), 1% ( 0.01 g aceite/ 0.99 g sustrato), 2 % ( 0.02 g aceite/ 0.98 g sustrato), 3 % (0.03 g aceite/ 0.97 g sustrato), 4 % 0.04 g aceite/ 0.96 g sustrato), 5% (0.05 g aceite/ 0.95 g sustrato) y 6 % (0.06 g aceite/ 0.94 g sustrato), el pasto sustrato se administró en base a su materia seca previamente calculada (94 %).

**Medición de metano.** Para la cuantificación de la producción de CH<sub>4</sub> en las muestras incubadas, se tomaron dos ml de biogás en los frascos de cultivo y almacenaron en tubos plásticos de 15 ml de capacidad, herméticamente sellados y libres de aire, que contenían 13 ml de una solución salmuera ácida (pH = 4), preparada con cloruro de sodio granulado a saturación, en 1000 ml de agua destilada, ajustando el pH con ácido clorhídrico. Las muestras de biogás se inyectaron a un volumen de 0.5 cm<sup>3</sup>, con una jeringa de vidrio (Hamilton, USA), y una aguja calibre No. 22s, en un cromatógrafo de gases (Varian Chrompack CP 3800), utilizando H<sub>2</sub>, aire comprimido y N<sub>2</sub> como gases de acarreo en una columna empacada de acero inoxidable, revestida de sílica gel, con 7.5 m de longitud y un diámetro interno de 0.25 mm. Se utilizó como estándar de referencia metano al 99.99 % de pureza. Se calculó el promedio de CH<sub>4</sub> por cm<sup>3</sup> de biogás inyectado para poder estimar la producción total acumulada de metano por cada g<sup>-1</sup> de materia seca del forraje sustrato, en función de la producción total de biogás acumulado por tratamiento.

**Análisis de digestibilidad.** Para la determinación de la digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS), se procedió a filtrar el residuo sólido de los frascos al final de la fermentación *in vitro*, utilizando filtros grado 54 (Whatman, UK). Una vez recuperados los residuos se llevaron a un proceso de deshidratación. Para evaluar la digestibilidad de la fibra detergente neutra (DIVFDN), se agregaron 50 ml de solución FDN en los residuos de la producción de gas, colocándose en un autoclave a 105 °C por una hora, éstos se filtraron en crisoles Goosh del número uno, y se llevaron a deshidratación en donde permanecieron a 65°C por 12 h. El cálculo de DIVMS se realizó por diferencia de peso entre la muestra inicial y la

materia seca (MS) final del residuo de producción de gas, mientras que para la DIVFDN se calculó teniendo en cuenta el contenido de la FDN de la muestra entre el contenido de FDN de la muestra intacta (Van Soest *et al.*, 1991).

**Análisis de datos.** Las variables analizadas fueron: producción acumulada de gas (PG), producción de CH<sub>4</sub> en cm<sup>3</sup> por g<sup>-1</sup> de MS de sustrato, digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS %) y digestibilidad *in vitro* de la fibra neutro detergente (DIVFDN %). Los datos se analizaron bajo el procedimiento GLM, aplicándose contrastes ortogonales entre los niveles (dosis) de cada tratamiento (aceite), y de la interacción tratamiento x nivel, las diferencias entre los tratamientos se determinaron mediante mínimos cuadrados. En todos los casos se utilizó el paquete estadístico SAS 9.0 para Windows 7 (2006).

## RESULTADOS

El perfil de ácidos grasos de los aceites de TP y AG (Cuadro 1), muestra que la concentración de ácidos grasos insaturados fue alta (70 y 80 %, respectivamente predominando el oleico, que representó casi el 50% de éstos ácidos grasos.

**Producción de gas.** La producción promedio fue de 224 cm<sup>3</sup>/g<sup>-1</sup> de MS del forraje sustrato en TP y de 223 cm<sup>3</sup> en AG, observándose una disminución significativa en los niveles 4, 5 y 6 % de ambos aceites (Cuadro 2). Igualmente se observó un efecto lineal y cuadrático del nivel de inclusión de aceite sobre la producción de gas *in vitro*.

**Producción de metano.** La adición de aceite de TP y AG, afectó la producción de CH<sub>4</sub> entre 19 y 30 cm<sup>3</sup> a partir del nivel de 3 % de inclusión respecto al tratamiento control, observándose la menor producción de metano en los niveles del 5 y 6 % de ambos aceites (Cuadro 2). Se encontró un efecto lineal y cuadrático de la dosis

de aceite y de la interacción tratamiento por nivel, sin encontrarse un efecto del tipo de aceite.

**Digestibilidad del forraje.** La DIVMS, mostró una disminución ( $P < 0.001$ ), por la adición de aceite de TP y AG en niveles superiores al 3 %, repercutiendo igualmente en la DIVFDN que presentó un comportamiento similar (Cuadro 3). El tratamiento control mostró una DIVMS promedio del 67.2 % reduciéndose hasta en un 11 % en el mayor nivel de inclusión de aceite (6 %). El contenido de FDN del forraje sustrato fue de 71.2 %; sin embargo, durante el proceso de producción de gas *in vitro*, el tratamiento control presentó una DIVFDN promedio de 52.52 %, la cual se redujo hasta el 37 % en los niveles máximos de inclusión de ambos aceites. En ambos análisis de digestibilidad se observó un efecto lineal y cuadrático de la dosis de aceite y de la interacción dosis x el aceite.

## **DISCUSIÓN**

En general se ha reportado que existe una correlación negativa entre la inclusión de aceites esenciales, fuentes específicas de ácidos grasos, aceites puros y modificados respecto a la producción de gas *in vitro* (Mohammed *et al.* 2004, Abdalla *et al.* 2012). Al respecto, Castagnino *et al.* (2015) en tratamientos con aceites poliinsaturados y glicerol, encontraron que la producción de gas *in vitro* disminuye del 12-20 % afectando los parámetros de fermentación. En el presente estudio, la producción de gas se redujo en los niveles del 4 al 6% de inclusión de ambos aceites. Al respecto, Nanon *et al.* (2014), encontraron que utilizando aceites esenciales (pasto limón, ajo y gengibre) en dosis de  $200 \text{ mg/ kg}^{-1}$  de MS, la producción de gas y digestibilidad se mantuvieron en un nivel alto, argumentando que bajo dicho escenario, los aceites favorecieron una producción alta y sostenida

de gas *in vitro*, aunque en proporciones menores a la utilizadas en el presente estudio. Por otra parte, se ha reportado que los aceites de canola y girasol poseen un perfil de ácidos grasos similar a los de TP y AG y son capaces de aumentar la eficiencia en el crecimiento bacteriano en niveles inferiores al 5 % sobre la materia seca (Dewhurst *et al.* 2000) y por lo tanto favorecer la producción de gas. No obstante sin en el presente estudio la producción de gas se redujo a partir del 4 % de inclusión.

Aunque en los aceites de TP y AG que se evaluaron en éste trabajo, no se realizaron análisis químicos para metabolitos secundarios, se observó un comportamiento similar al de algunos aceites esenciales, en un estudio realizado por Lin *et al.* (2013) al utilizar aceites esenciales combinados con fumarato, encontraron una disminución paulatina en la producción de gas, en función de la adición de dichos aceites, siendo significativa al agregar 200 mg l<sup>-1</sup> de solución, con una producción promedio de gas de 91 ml, aunque con menor cantidad de sustrato (750 mg) respecto al presente estudio (999 mg).

En cuanto a la disminución de la metanogénesis, aunque algunos autores han encontrado una reducción lineal entre en la producción de metano *in vitro* y el aumento en la proporción de aceites (Sallam *et al.* 2010, Grainger y Beauchemin 2011). En este sentido existe una mayor variabilidad de resultados, ya pueden influir en la respuesta aspectos como el tipo de forraje, cantidad, tipo de aceite, perfil de ácidos grasos y metodología de cultivo; por lo que resulta difícil establecer un parámetro de referencia sobre el nivel de inclusión y respuesta en la reducción de metano. En la presente investigación se encontró un efecto de la dosis de aceite, mas no del tipo de aceite, por lo que ambos aceites se comportaron de

manera similar para la producción de metano. En general, algunos estudios sugieren que la cantidad y tipo de ácidos grasos poseen diferente potencial reductor de la metanogénesis, al respecto, Soliva *et al.* (2003), encontraron un mayor efecto en la mitigación de metano *in vitro* utilizando ácido laúrico no esterificado (C12) en comparación con el ácido mirístico (C14). En el presente trabajo, no se detectó diferencia entre los dos tipos de aceites (TP y AG), dada la similitud en el perfil de ácidos grasos.

Un nivel alto de inclusión de aceite en cultivos ruminales, no se relaciona directamente con la producción de metano. En este sentido, (Storlien *et al.* 2012), reportaron que la inclusión del 5 % de aceites de canola, girasol e hígado de bacalao mantuvo una producción de gas similar entre el control y los tratamientos utilizados, mas no tuvo efecto sobre la producción de metano, contrastando con lo observado en el presente estudio, donde la inclusión del 3 % de aceites de TP y AG, mantuvo una producción de gas similar al control, pero redujo significativamente la producción de CH<sub>4</sub>. En condiciones *in vitro*, la reducción de la metanogénesis puede estar ligada a la reducción de la fermentación (producción de gas) y digestibilidad del sustrato por niveles altos de inclusión de aceite (Patra y Yu 2012), aspecto no observado en el presente trabajo, ya que en el nivel del 3% de inclusión de ambos aceites, se mantuvo la producción de gas y digestibilidad del forraje, reduciéndose solamente la producción de CH<sub>4</sub>.

---

Aunque el porcentaje de la DIVMS y la DIVFDN encontrados en el presente estudios, se vieron afectados con niveles altos de aceite (4-6 %), ambos indicadores mostraron un comportamiento similar, aspecto que coincide con los

hallazgos de Nanon *et al.* (2014), quienes igualmente encontraron un comportamiento de DIVMS y DIVFDN similar al del presente estudio con aceite de jengibre, con efecto lineal y cuadrático. Sin embargo, al comparar los indicadores de digestibilidad del presente trabajo contra los reportados por Martínez *et al.* (2006), utilizando aceites esenciales de plantas del género *Thymus*, se infiere que la naturaleza de los aceites tiene un impacto directo sobre la fermentación y digestibilidad del forraje, ya que dichos autores observaron una disminución mayor al 30% en la digestibilidad con niveles bajos de inclusión (2 %). Uno de los principales retos en materia de mitigación de metano a nivel experimental, radica en el hecho de que aunque se logre mitigar la metanogénesis, se debe evitar una disminución lineal en la digestibilidad, ya que ésta guarda una relación directa con la productividad animal y con el consumo voluntario de alimento (Beauchemin y McGinn 2006). Al respecto, Soder *et al.* (2013), observaron que al adicionar hasta un 10 % de aceites de linaza, girasol y canola, la digestibilidad aparente y la digestibilidad de la fibra detergente no se ven reducidas; sin embargo, dichos autores utilizaron una dieta baja en FDN (54.2 %) compuesta fundamentalmente de herbáceas, con una mayor cantidad de forraje (70 g) realizándose en fermentadores, aspectos que pudieron inferir en dicho hallazgo.

Finalmente, es importante señalar que el presente estudio es pionero en la exploración del comportamiento biológico del aceite de *Thevetia peruviana* en sistemas de fermentación *in vitro*, simulando condiciones ruminales, dados los antecedentes de toxicidad en dicha planta a nivel de hojas, tallos, inflorescencias y frutos (Odhiambo *et al.* 2012). Los parámetros de producción de gas y

digestibilidad obtenidos en los cultivos adicionados con TP y AG del presente trabajo, indican que se puede considerar el uso de ambos aceites en estudios *in vivo* que contemplen su evaluación como aditivos alimenticios y mitigadores de la metanogénesis.

## **CONCLUSIONES**

Se encontró que al adicionar un 3 % de aceite de semillas de *Thevetia peruviana* y de frutos de aguacate *in vitro*, se puede reducir la metanogénesis sin afectar la cinética de fermentación (producción de gas), ni la digestibilidad del forraje.

En el presente estudio se encontró un efecto lineal y cuadrático de la dosis de aceite sobre la producción de metano y digestibilidad del forraje, mas no se observó un efecto de la fuente de aceite.

## **LITERATURA CITADA**

- Abdalla AL, Louvandini H, Abdallah SM, Da Silva CI, Tsai MS, De Oliveira A (2012) *In vitro* evaluation, *in vivo* quantification, and microbial diversity studies of nutritional strategies for reducing enteric methane production. Tropical Animal Health and Production 44: 953-964.
- AOAC International (2006) Official Methods of Analyses 18th ed .AOAC International. Gaithersburg, MD.
- AOAC (2000) Official Methods of Analysis. Method 930.15 17th ed AOAC International. Gaithersburg, MD.
- Beauchemin KA, Kreuzer M, O'Mara F, McAllister TA (2008). Nutritional management for enteric methane abatement: a review. Australian Journal of Experimental Agriculture 48: 21-27.

- Beauchemin KA, McGinn SM (2006) Methane emissions from beef cattle: Effects of fumaric acid, essential oil, and canola oil. *Journal of Animal Science* 84: 1489-1496.
- Beauchemin KA, McGinn SM, Petit HV (2007) Methane abatement strategies for cattle: lipid supplementation of diets. *Canadian Journal of Animal Science* 87: 431-440.
- Benchaar C, Greathead H (2011) Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. *Animal Feed Science and Technology* 166-167: 338–355.
- Benchaar C, Petit HV, Berthiaume R, Ouellet DR, Chiquette J, Chouinard PV (2007) Effects of essential oils on digestion, ruminal fermentation, ruminal microbial populations, milk production and milk composition in dairy cows fed alfalfa silage or corn silage. *Journal of Dairy Science* 90: 886-897.
- Castagnino PS, Meesana JD, Fiorentini G, De Jesús RB, San Vito E, Carvalho IPC, Berchielli TT (2015) Glycerol combined with oils did not limit biohydrogenation of unsaturated fatty acid but reduced methane production *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology* 201: 14-15.
- Chandra DD, Basumatary S (2011) High quality biodiesel from yellow oleander (*Thevetia peruviana*) seed oil. *Biomass and Bioenergy* 35: 1797-1803.
- Cottle DJ, Nolan JV, Wiedemann SG (2011). Ruminant enteric methane mitigation: a review. *Animal Production Science* 51: 491-514.
- Dewhurst RJ (2013) Editorial: greenhouse gasses and animal agriculture conference, Dublin, 2013. *Animal* 7:s2: 203-205.

- Dewhurst RJ, Davies D R, Merry RJ (2000) Microbial protein supply from the rumen. *Animal Feed Science and Technology* 85: 1-21.
- Dos Santos MAZ, Alicieo TVR, Pereira CMP, Ramis-Ramos G, Mendonca CRB (2014) Profile of bioactive compounds in avocado pulp oil: influence of the drying processes and extraction methods. *Journal American Oil Chemistry Society* 91: 19-27.
- Eckard RJ, Grainger C, De Klein CAM (2010) Options for the abatement of methane and nitrous oxide from ruminant production: a review. *Livestock Science* 130: 47-56.
- Folch J, Lees M, Stanley GHS (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry* 226: 497-509.
- Food and Agriculture Organization (2009) Change in the livestock sector in: The state of food and agriculture, *Livestock in the balance*. FAO, Rome, Italy pp.:9-30.
- García E (1964) Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la Rep. Mexicana): México, D. F., Univ. Nal. Auton. México, Inst. *Geografía*. Pp. 35.
- Gerber PJ, Henderson B, Makkar HPS (2013). Interacciones de las prácticas de mitigación. En: *Mitigación de las emisiones de gases de efecto invernadero en la producción ganadera*. FAO, Roma, Italia. Pp 143-158.
- Grainger C, Beauchemin KA (2011) Can enteric methane emissions from ruminants be lowered without lowering their production? *Animal Feed Science and Technology* 166–167: 308-320.

- Hook SE, Wright AD, McBride BW (2010) Methanogens: methane producers of the rumen and mitigation strategies. Hindawi Publishing Corporation, Archaea. doi:10.1155/2010/945785, Article ID 945785.
- Hristov A N, Lee C, Hristova RA, Huhtanen P, Firkins J (2012) A meta-analysis of the variability in continuous culture rumen fermentation and digestibility data. *Journal of Dairy Science* 95: 5299-5307.
- Hristov AN, Oh J, Firkins JL, Dijkstra J, Kebreab E, Waghorn G, *et al.* (2013). Special topics-Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations; I. A review of enteric methane mitigation options. *Journal of Animal Science* 91: 5045–5069.
- Johnson KA, Johnson DE (1995) Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science* 73: 2483-2492.
- Kareru PG, Keriko JM, Kenji GM, Gachanja AN (2010) Short communication. Antitermite and antimicrobial properties of paint made from *Thevetia peruviana* (Pers.) Schum. Oil extract. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 4: 087-089.
- Kong Y, He M, McAlister T, Seviour R, Forster R (2010) Quantitative fluorescence *in situ* hybridization of microbial communities in the rumens of cattle fed different diets. *Applied Environmental Microbiology* 76: 6933–6938.
- Kumar S, Kumar P, Carro MD, Griffith GW, Dagar SS, Puniya M, *et al.* (2014) New aspects and strategies for methane mitigation from ruminants. *Applied Microbiology Biotechnology* 98: 31-44.
-

- Lin B, Wang JH, Lu Y, Liang Q, Liu JX (2013) *In vitro* rumen fermentation and methane production are influenced by active components of essential oils combined with fumarate. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 97: 1-9
- Mao HL, Wang JK, Zhou YY, Liu JX (2010) Effects of addition of tea saponins and soybean oil on methane production, fermentation and microbial population in the rumen of growing lambs. *Livestock Science* 129: 56-62.
- Martin C, Morgavi DP, Doreau N (2010) Methane mitigation in ruminants: from microbe to farm scale. *Animal* 4: 351-365.
- Martinez S, Madrid J, Hernandez F, Megias MD, Sotomayor JA, Jordan MJ (2006) Effect of thyme essential oils (*Thymus hyemalis* and *Thymus zygis*) and monensin on *in vitro* ruminal degradation and volatile fatty acid production. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 54: 6598-6602.
- Mohammed N, Ajisaka N, Lila ZA, Hara K, Mikuni K, Hara K *et al* (2004) Effect of Japanese horseradish oil on methane production and ruminal fermentation *in vitro* and in steers. *Journal of Animal Science* 82: 1839-1846.
- Nanon A, Suksombat W, Yang WZ (2014) Effects of essential oils supplementation on *in vitro* and *in situ* feed digestion in beef cattle. *Animal Feed Science and Technology* 196: 50-59.
- Odhiambo PO, Makobe, Boga MH, Miugai A, Schumacher M, Kiesecker H (2012) Phyto-chemical screening of wild types and tissue cultured yellow oleander *Thevetia peruviana* Pers.K.Schum in Kenya. *Advances in Pharmacoepidemiology and Drug Safety* 1: 5. <http://dx.doi.org/10.4172/2167-1052.1000120>.

- Patra AK, Yu Z (2012) Effects of essential oils on methane production and fermentation by, and abundance and diversity of, rumen microbial populations. *Applied Environmental Microbiology* 78: 4271-4280.
- Sallam SMA, Abdelgaleil SAM (2010). Efecto de diferentes niveles de aceite esencial de cítrico y su componente activo en la fermentación microbiana ruminal y la producción *in vitro* de metano. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 44: 373-378.
- Sallam SMA, Bueno ICS, Brigide P, Godoy PB, Vitti DMSS, Abdalla AL (2009) Efficacy of eucalyptus oil on *in vitro* rumen fermentation and methane production. *Options Mediterraneennes* 85: 267-272.
- Statistical Analysis Systems – SAS (2006) User's guide. Version 9.0 ed. Cary: SAS Institute.
- Soder KJ, Brito AF, Rubano MD (2013) Short communication: Effect of oilseed supplementation of an herbage diet on ruminal fermentation in continuous culture. *Journal of Dairy Science* 96: 2551–2556.
- Soliva CR, Hindrichsen IK, Meile L, Kreuzer M, Machmuller A (2003) Effects of mixtures of lauric and myristic acid on rumen methanogens and methanogenesis *in vitro*. *Letters in Applied Microbiology* 37: 35-39.
- Steinfeld H, Gerber P, Wassenaar T, Castel V, Rosales N, De Han C (2009) La producción pecuaria como uno de los principales protagonistas de la problemática pecuaria a nivel mundial. En: *La larga sombra del ganado, problemas ambientales y opciones*. FAO, Roma, Italia pp 2-4.
-

- Storlien TM, Harstad OM, Narvaez N, Wang Y, McAllister TA (2012) Effects of different oils and plant extracts on *in vitro* ruminal methane production. *Acta Agriculturae Scandinavica Section A* 62: 300-304.
- Theodorou MK, Williams BA, Dahona MS, McAllan AB, France J (1994) A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology* 48: 185-197.
- Van Soest PV, Robertson JB, Lewis BA (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74(10): 3583-3597.
- Yanty NAM, Marikkar JMN, Long K (2011) Effect of varietal differences on composition and Thermal Characteristics of avocado oil. *Journal American Oil Chemistry Society* 88: 1997-2003.

**Cuadro 1. Perfil de ácidos grasos y su concentración relativa (%) en aceite de semillas de adelfa amarilla (*Thevetia peruviana*) y frutos de aguacate (*Persea americana*).**

---

Tipo de ácido graso	Aceite de adelfa amarilla ( <i>Thevetia Peruviana</i> <i>Schum</i> )	Aceite de aguacate Hass ( <i>Persea americana</i> <i>Miller</i> )
Palmítico (C16:0)	19.4 %	19.3%
Palmitoleico (C16:1 n-7)	0.4%	8.4%
Esteárico (C18:0)	7.9%	-
Oleico (C18:1 n-9)	49.3%	47.9%
Vaccénico (C18:1 n-7)	0.7 %	7.0%
Alfa-linoleico (C18: 2 n-6)	20.6%	15.9%
Alfa-linolénico (C18:3 n-3)	-	1.5%
Araquídico (C 20:0)	1.7%	-

**Cuadro 2. Medias de cuadrados mínimos de los efectos de la inclusión de aceites de adelfa amarilla (*Thevetia peruviana*) y frutos de aguacate (*Persea***

**americana) sobre la producción acumulada de gas (PG) y metano (CH<sub>4</sub>) en condiciones *in vitro*.**

% de inclusión de aceite	Aceite de adelfa amarilla ( <i>Thevetia Peruviana Schum</i> )		Aceite de aguacate Hass ( <i>Persea americana Miller</i> )	
	PG (cm <sup>3</sup> )	CH <sub>4</sub> (cm <sup>3</sup> )	PG (cm <sup>3</sup> )	CH <sub>4</sub> (cm <sup>3</sup> )
Control	232.0	91.7	232.0	91.7
1 %	233.2	91.3	231.0	90.4
2 %	230.0	87.0	227.5	88.1
3 %	226.9	81.4 <sup>a</sup>	226.5	83.7 <sup>a</sup>
4 %	223.1 <sup>a</sup>	73.0 <sup>a</sup>	223.4 <sup>a</sup>	78.0 <sup>a</sup>
5 %	221.1 <sup>a</sup>	63.9 <sup>a</sup>	224.2 <sup>a</sup>	68.3 <sup>a</sup>
6%	216.9 <sup>a</sup>	58.1	215.3 <sup>a</sup>	60.2 <sup>a</sup>
CME	13.7	6.7	11.3 <sup>a</sup>	10.8 <sup>a</sup>
Significancia				
Lineal	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Cuadrática	0.2050	<0.0001	0.0066	<0.0001
Dosis	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Aceite	0.1533	0.0256	0.2136	0.0136
Dosis x Aceite	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

<sup>a</sup> Indica diferencia significativa en las columnas (P < 0.0001)

CME= Cuadrado medio del error

Significancia= P < 0.0001 indica diferencia significativa.

**Cuadro 3. Medias de cuadrados mínimos para la Digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) y de la fibra detergente neutra (DIVFDN) en pasto**

**estrella de África (*Cynodon plechstostachyus*) incubado con distintos niveles de aceites de *Thevetia peruviana* y *Persea americana*.**

% de inclusión de aceite	Aceite de adelfa amarilla ( <i>Thevetia Peruviana Schum</i> )		Aceite de aguacate Hass ( <i>Persea americana Miller</i> )	
	DIVMS (%)	DIFDN (%)	DIVMS (%)	DIFDN (%)
Control	65.5	54.6	65.5	54.6
1 %	64.1	54.6	64.5	53.7
2 %	66.0	54.0	64.8	53.7
3 %	65.0	54.5	62.9	54.3
4 %	54.9	49.0	53.3	49.0
5 %	51.2	39.2	51.9	39.3
6%	47.0	35.7	49.3	36.2
CME	3.9	6.8	4.3	1.7
Significancia				
Lineal	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Cuadrática	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Dosis	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Aceite	0.1533	0.0256	0.2136	0.0130
Dosis x Aceite	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

<sup>a</sup> Indica diferencia significativa en las columnas (P < 0.0001)

CME= Cuadrado medio del error

Significancia= P < 0.0001 indica diferencia significativa.

## DISCUSION GENERAL

En el presente estudio se consideró que a partir de evaluaciones de forrajes y aditivos naturales *in vitro*, se puede conocer el desempeño y el potencial que tienen diferentes sustratos para la producción de rumiantes, incluyendo un análisis de su metanogénesis potencial. Sin embargo, en algunas ocasiones los resultados *in vitro*, no siempre son reproducibles en condiciones *in vivo* por lo que el desarrollo de estudios complementarios son necesarios para validar ésta investigación básica.

En la evaluación bromatológica y metanogénica realizada a los distintos forrajes de clima templado y tropical, queda de manifiesto que los pastos que crecen en las regiones tropicales, tienen una calidad nutricional comparable a los de clima templado, que se han calificado históricamente como los mejores en la nutrición del ganado. Esta situación sugiere que la altitud sobre el nivel del mar no cambia en gran medida el contenido de los forrajes, ya que los pastos que se evaluaron se encontraban en la misma etapa fenológica (inicio de floración) y fueron colectados en el mismo periodo de tiempo.

La tasa de fermentación observada en los forrajes cebada y avena resultó superior al resto de las gramíneas evaluadas, pudiendo influir entre otras cosas el mejoramiento genético de dichas plantas, así como el sistema de cultivo que tienen y el tipo de ciclo al que pertenecen, ya que se compararon contra otras gramíneas de tipo perene como los pastos Estrella de Africa, Kikuyo, Tanzania, Taiwan y Llanero, que aunque muestran una menor calidad nutricional, son pastos con una recuperación y producción de biomasa mayor que la de la cebada y avena en condiciones productivas. Es preciso resaltar que el pasto Tanzania, pese a que mostró el mayor potencial metanogénico, igualmente presentó una producción de gas similar a la de los pastos de clima templado (avena y cebada), aspecto que puede estar ligado a su contenido de proteína cruda. En general se puede asumir que la alimentación de rumiantes con pastos del trópico o de una región templada, es equiparable en cuando a la calidad nutricional y a la posible producción de metano, siempre y cuando no exista una madurez fenológica.

En el caso de las leguminosas estudiadas, este trabajo es pionero en la evaluación de la *Leucaena esculenta* en un sistema de digestión ruminal *in vitro*, observándose que es una planta con una alta toxicidad, ya que redujo en más del 50% la fermentación ruminal en comparación con otras leguminosas. Dicha toxicidad, lejos de representar un problema, puede ser objeto de estudio para realizar la identificación de los metabolitos secundarios más abundantes en el follaje de dicha planta. Estos metabolitos se pueden trabajar en forma de extractos para su evaluación como mitigadores de metano. En condiciones productivas el ganado si consume dicha planta (*Leucaena esculenta*), aunque modera su consumo, tal como ocurre con la *Leucaena leucocephala*. Actualmente las opciones de mitigación entérica en los rumiantes deben priorizar en llevarse a cabo con forrajes, subproductos o sustratos abundantes, que requieran poca manipulación o transformación, y que se encuentren disponibles localmente, con la intención de que los costos energéticos y ambientales que involucra el procesamiento, embalaje y transporte de un producto, lo convierta en un sustrato ambientalmente costoso, involucrando la emisión de GEI, aunque resulte exitoso en la mitigación de metano. En este sentido la búsqueda de forrajes con poca producción de metano, o de plantas con potencial defaunador, es una opción sustentable para la mitigación de metano en la producción ganadera.

En lo referente a la evaluación de los aceites de aguacate y *Thevetia peruviana*, es importante señalar que el estudio es pionero en la exploración del potencial alimenticio para los rumiantes de ambos aceites, y que la evaluación de su comportamiento *in vitro*, es un paso necesario para su posterior uso en estudios *in vivo*. Particularmente en el caso de *Thevetia peruviana*, que es una planta que se ha descrito como altamente toxica en sus hojas, tallos, inflorescencias y corteza. Por otra parte, el aceite de aguacate que se evaluó, fue producto de la extracción oleosa de frutos completos (pericarpio, mesocarpio, endocarpio y semillas), obteniéndose un producto distinto al que se comercializa industrialmente a partir de la pulpa de dicha fruta. El método de extracción, y la inclusión de otras partes del fruto, pudo ofrecer al final un aceite con algunos metabolitos secundarios ya

que su sabor y color lo indicaron, siendo necesario en ambos casos un análisis de dichos compuestos para poder caracterizar plenamente a ambos aditivos.

Los niveles de inclusión que permitieron una buena tasa de fermentación, y no afectaron la digestibilidad de la fibra se encuentran entre el 3 y 4 % para el aceite de aguacate, y en el 4 % para *Thevetia*, en este sentido, se puede partir para realizar estudios *in vivo*, con los niveles 3, 4 y 5% de ambos aceites sobre el contenido de materia seca.

El diseño del experimento se basó en emplear un solo tipo de forraje, y ningún tipo de alimento concentrado, situación que pudo inferir en el hecho de que a bajos niveles de inclusión de aceite, la fermentación en lugar de disminuir, llegó a mejorar y a mantenerse, ya que diversos estudios señalan que con un 3 % de fuentes lipídicas en los cultivos o raciones de ganado, se comienzan a observar disminuciones en el consumo, digestibilidad o tasa de fermentación.

## **CONCLUSION GENERAL**

El potencial nutricional y metanogénico *in vitro* de los pastos recolectados a inicios de su floración tanto de clima templado, como tropical es similar. La leguminosa forrajera *Leucaena esculenta*, disminuyó la tasa de fermentación, producción de metano y digestibilidad en condiciones *in vitro*, situación ligada a su alto contenido de metabolitos secundarios, aspecto que puede ser aprovechado en estudios dirigidos a reducir la metanogénesis ruminal.

Es posible realizar estudios *in vivo* utilizando aceites crudos de *Tevetia peruviana* y *Persea americana* como suplementos alimenticios para reducir la metanogénesis en rumiantes, ya que mantuvieron una buena producción de gas y digestibilidad de la materia seca y fibra detergente neutra en los niveles de inclusión del 1 al 4 %.

## REFERENCIAS COMPLEMENTARIAS

- Cottle, D.J., Nolan, J.V., Wiedemann, S.G. (2011). Ruminant enteric methane mitigation: a review. *Animal Production Science* 51:491-514.
- De Klein, C.A.M., Pinares-Patino, C., Waghorn, G.C. (2008). Greenhouse gas emissions. In: *environmental impacts of pasture-based farming*. Edited by Richard W. McDowell. CAB international publishing, London. U.K. 2, 11-12 pp.
- Eckard, R.J. (2009). Greenhouse accounting spreadsheets. Citado por Cottle, D.J., Nolan, J.V., Wiedemann, S.G. (2011) Ruminant enteric methane mitigation: a review. *Animal Production Science* 51:491-514.
- FAO (2009). Change in the livestock sector. In *The state of food and agriculture. Livestock in the balance*. FAO, Rome, pp.9-30
- Francis, J.K. (1988). *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. Guanacaste, earpod-tree. SO-ITF-SM-15. New Orleans, LA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station. 4 p.
- García, D.E., Medina, M.G. (2006) Composición química, metabolitos secundarios, valor nutritivo y aceptabilidad relativa de diez árboles forrajeros. *Zootecnia Tropical* 24:233-250.
- Guo, Y.Q., Liu, J.X., Lu, Y., Zhu, W.Y., Denman, S.E., McSweeney, C.S. (2008) Effect of tea saponin on methanogenesis, microbial community structure and expression of *mcrA* gene, in cultures of rumen micro-organisms. *Letters in Applied Microbiology* 47:421-426.
- Hegarty, R.S. (1999) Reducing rumen methane emissions through elimination of rumen protozoa. *Australian Journal of Agricultural Research* 50:1321-1327.
- Hegarty, R.S., Goopy, J.P., Herd, R.M., McCorkell, B. (2007) Cattle selected for lower residual feed intake have reduced daily methane production. *Journal of Animal Science* 85:1479-1486.
- Hernández I, Babbar L. (2001). Sistemas de producción animal intensivos y el cuidado del ambiente: situación actual y oportunidades. *Pastos y forrajes*. 24 (4).
- Hui-Ling, M., Jia-Kim, W., Yi-Yi, Z., Jian-Xin, L. (2010) Effects of addition of tea saponins and soybean oil on methane production, fermentation and microbial population in the rumen of growing lambs. *Livestock Science* 129:56-62.
- Koenig, K.M., Ivan, M., Teferedegne, B.T., Morgavi, D.P., Rode, L.M., Ibrahim, I.M. & Newbold, C.J. (2007) Effect of dietary *Enterolobium cyclocarpum* on microbial protein flow and nutrient digestibility in sheep maintained fauna-free, with total mixed fauna or with *Entodonium caudatum* monofauna *British Journal of Nutrition* 98:504-516.
- López-Villalobos, N. (2011) Breeding strategies for the genetic improvement of dairy cattle in a clean environment. En: *Memoria de la XXXIX Reunión*

- Anual de la Asociación Mexicana de Producción Animal y Seguridad Alimentaria, A. C. Mayo 4-6. Chapingo, México. 4 pp.
- Magaña, V., Conde, C., Sánchez, O., Gay, C. (1997) Assessment of current and future regional climate scenarios. *Climate Research* 9:107-114.
- Martin, C., Morgavi, D.P., Doreau, M. (2010) Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal* 4: 351-365.
- McMichael A. J., Powles J. W., Butler C. D., Uay R. (2007) Food, livestock production, energy, climate change, and health. *The Lancet* 370: 1253-1263.
- Miller, T.L., Wollin, M.J. (2001) Inhibition of growth of methane-producing bacteria of the ruminant forestomach by hydroxymethylglutaryl-ScoA reductase inhibitors. *Journal of Dairy Science* 84:1445-1448.
- Mohammed, N., Ajisaka, N., Lila, Z.A., Hara, K., Mikuni, K., Hara, K., Kanda, S., Itabashi, H. (2004) Effect of Japanese horseradish oil on methane production and ruminal fermentation *in vitro* and in steers. *Journal of Animal Science* 82:1839-1846.
- Nápoles, R.P. (2011) Estimación de los costos relativos de las emisiones de gases de efecto invernadero en las ramas de la economía mexicana. *El Trimestre Económico* 309: 173-191.
- OECD. (2008) Climate Change: Meeting the Challenge to 2050. Policy Brief. February bulletin. <http://www.oecd.org/dataoecd/6/21/39762914.pdf>.
- Ogino, A., Kaku, K., Osada, T., Shimada, K. (2004) Environmental impacts of the Japanese beef-fattening system with different feeding lengths as evaluated by a life-cycle assessment method. *Journal of Animal Science* 82:2115-2122.
- Prato, T., Zeyuan, Q., Pederson, G., Fagre, D., Bengston, L.F., Williams, J.R. (2010) Potential economic benefits of adapting agricultural production systems to future climate change. *Environmental Management* 45:577-589.
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2009). Resumen nacional población ganadera, avícola y apícola. Disponible en [http://www.campomexicano.gob.mx/portal\\_siap/Integracion/EstadisticaBasica/Pecuario/PoblacionGanadera/Resumen/Resumen.pdf](http://www.campomexicano.gob.mx/portal_siap/Integracion/EstadisticaBasica/Pecuario/PoblacionGanadera/Resumen/Resumen.pdf) consulta 16 de julio de 2011.
- Steinfeld, H., Gerber, P., Wassenaar, T., Castel, V., Rosales, M., De Haan, C. (2009) La larga sombra del Ganado. Problemas ambientales y opciones. LEAD-FAO. Roma, Italia. 464 p.
- Thornton P. K. (2010). Livestock production: recent trends, future prospects. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 365, 2853-2867
- Zamora, S., García, J., Bonilla, G., Aguilar, H., Harvey, C., Ibrahim, M. (2001) Uso de frutos y follaje arbóreo en la alimentación de vacunos en la época seca en Boaco, Nicaragua. *Agroforestería en las Américas* 8:31-38.

**ANEXOS**

# 2015

UNIVERSIDAD  
MICHOACANA DE SAN  
NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE  
INVESTIGACIONES  
AGROPECUARIAS Y  
FORESTALES

LABORATORIO DE  
PRODUCCIÓN ANIMAL

## [ MANUAL DE TÉCNICAS DE LABORATORIO PARA PRODUCCION DE GAS IN VITRO, Y ANÁLISIS DE METANO ]

---

*Autores: MC Karlos Edmundo Orozco Durán*

*MVZ Yveet Sierra Aguilar*

## I.-PROCESAMIENTO DE FORRAJES PARA ANÁLISIS BROMATOLÓGICOS

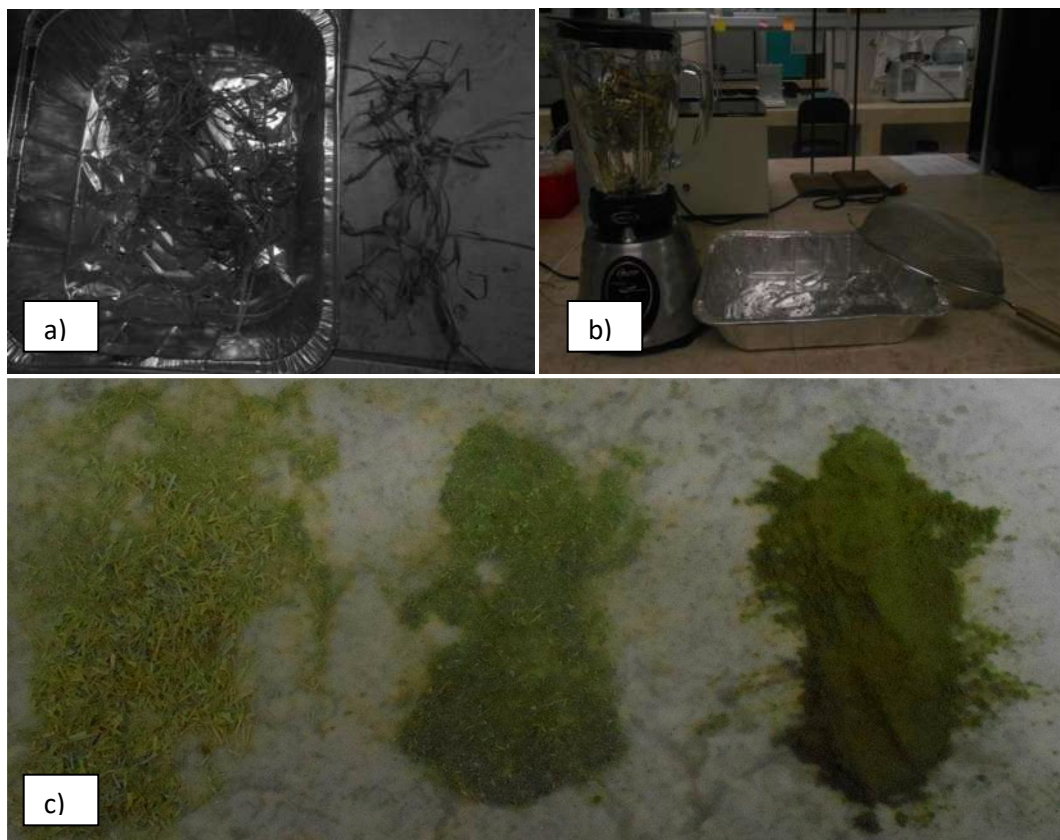
De acuerdo al análisis o estudio que se pretenda realizar, Los criterios de selección y métodos de conservación de los forrajes son fundamentales para conseguir una muestra representativa que conserve los nutrientes, metabolitos o características organolépticas de la forma primaria del pasto o forraje en cuestión. En este sentido la etapa fenológica, cantidad de materia seca, condiciones ambientales al momento del corte, métodos de corte, embalaje y transporte al laboratorio son algunos de los factores de mayor importancia a considerar para tener éxito en la conservación y análisis de forrajes.

Henificado, Deshidratación y Molienda de forrajes.

Aspectos a considerar

1. Aunque el corte de forrajes incluye partes de la planta que regularmente no son consumidas por el ganado en condiciones normales de pastoreo, es importante realizar una selección del forraje, eliminando las partes que se encuentren sucias, en estado de descomposición o excesivamente lignificadas (figura 1). En el caso de leguminosas tropicales, es importante eliminar tallos gruesos y semillas, puesto que pueden resultar altas en metabolitos secundarios, o dar valores distintos de digestibilidad, proteína o fibra, respecto a las hojas y tallos delgados. Si el forraje llega al laboratorio en base fresca, debe someterse a un proceso de henificado para eliminar el exceso de humedad antes de someterse al secado en horno eléctrico. Pastos y forrajes de tallos anchos (King grass, llanero, caña de azúcar, sorgo y maíz) deben de picarse desde el momento en que se reciben dado que dichos tallos son reservorios de humedad. Una forma económica, práctica y relativamente rápida de pre-secar los forrajes, es el secado al sol en rejillas, charolas perforadas o en superficies de concreto. Dependiendo del forraje y de las condiciones ambientales, dicho pre-secado va 1 a 3 días, guardando el forraje por la tarde-noche para evitar la humedad del sereno o rocío.
2. La deshidratación en hornos de secado se realiza con forrajes en forma de heno o henolaje utilizando charolas de aluminio perforadas, bolsas de papel perforadas o cualquier recipiente que permita la salida de humedad de la muestra durante el secado. Si una muestra de forraje contiene un alto

grado de humedad por fuera o dentro del forraje y no se separa o ventila en el horno de secado, se corre el riesgo de la fermentación o descomposición de la muestra.



**Figura 1.** Procesamiento de Pastos y Forrajes. a) partes del pasto que se descartan por las condiciones en el que se encuentran. b) molienda de forraje .c) La imagen muestra tres tamaños de partícula, el adecuado para la producción de gas *in vitro*, cercano a 1mm es el que se encuentra al centro de la imagen.

3. La molienda o cribado de los forrajes, se facilita con muestras perfectamente deshidratadas. Sin embargo se debe de considerar la naturaleza del forraje (dureza, lignificación, cutículas protectoras de semilla, entre otros). La elección del molino va en función del tipo de muestra y de la cantidad a procesar. Para trabajar rastrojos y pajas, resulta ideal una pre-molienda con molinos eléctricos y mecánicos con un tamaño de partícula de 2 cm, posteriormente en el pulverizador, licuadora u otro molino pequeño se puede ajustar el tamaño de la muestra. En el caso de semillas, granos u alimentos peletizados el molino manual es la mejor elección. Finalmente el tamaño de partícula deseado y la naturaleza del forraje determinaran el tiempo de procesamiento y la calidad final de la molienda.

## MATERIALES

Báscula granataria

Balanza analítica

Capsulas de pesaje

Charolas de secado

Horno desecador

Licuadora eléctrica

Molino Manual

Pulverizador eléctrico con balines de acero

Tamiz o colador metálico

Bolsas de cierre hermético

Desecador con Perlas de silica o Cloruro de calcio granulado.

## PROCEDIMIENTO

1.-Colocar el forraje pre-secado en charolas de aluminio perforadas con capacidad aproximada de 3 l, esparciéndolo en la superficie de las mismas. El horno de secado se programa a 65°C por un mínimo de 24h en función del contenido de humedad de la muestra. En el caso de semillas, vainas, granos y alimentos peletizados las charolas perforadas no son necesarias. Es conveniente abrir la ventila superior del horno de secado cuando la humedad de los forrajes es alta. Pasado el tiempo de secado, las charolas se colocan en desecadores plásticos con perlas de silica, o cloruro de calcio granulado para su enfriamiento o transporte.

2.- El proceso de molido en los forrajes se debe realizar con muestras secas y frías. En función del tipo de forraje, es la elección del proceso de molienda. Cuando se trabajan cantidades de forraje que oscilen los 500g de muestra, con el uso de una licuadora con vaso de vidrio es suficiente. Algunas licuadoras con motor reversible facilitan el proceso de acomodo del forraje cuando las aspas se saturan de muestra. Es importante no colocar más de 50g de forraje en el vaso de molienda por la saturación de las aspas. Para obtener un molido uniforme se debe permitir que durante la molienda el forraje se mueva y circule por la fuerza de las aspas. Inmediatamente después del molido es importante tener el tamiz o cernidor junto con una charola o contenedor, para colocar la muestra molida y separar las partículas mayores a las deseadas, las cuales se someten nuevamente al proceso de molido. El ajuste de tamaño de partícula en algunos alimentos duros (semillas de leguminosas) o lignificados (pajas, rastrojos) se obtiene con mayor uniformidad al someterse al proceso de molienda en un pulverizador con balines de acero. Para el uso del

pulverizador se colocan 30g de forraje pre-molido dentro de los contenedores con 10 balines de acero, el equipo se programa a 500 rpm, durante 1 minuto, para verificar el tamaño de partícula, en caso de alimentos o forrajes duros es conveniente aumentar el tiempo. Cuando la muestra de forraje se somete al pulverizado por más de 3 min, se corre el riesgo de que el tamaño de partícula sea excesivamente pequeño  $\geq 0.2\text{mm}$  situación que puede alterar los valores de producción de gas, digestibilidad *in vitro* de la fibra u otros análisis posteriores de la muestra. En todos los procesos de molienda es conveniente contar con el tamiz o cernidor y el contenedor. Toda vez que finaliza el proceso de molienda las muestras se deben colocar en bolsas plásticas herméticas con la identificación de cada forraje y la fecha de procesamiento.

3. Cálculo de materia seca. Cuando se desea estimar el contenido de humedad de la muestra antes de someterse al proceso de deshidratación (forraje fresco) es conveniente pesar la cantidad total de pasto o forraje a procesar. Para estimar la materia seca de los forrajes para la producción de gas *in vitro*, resulta conveniente realizar dicho análisis con las muestras deshidratadas y molidas, mantenidas en almacenamiento por más de 2 días en condiciones ambientales, o por más de 12 h cuando éstas se conservan en el desecador. Para el cálculo de materia seca las cápsulas de pesaje de aluminio se deben tener a peso constante (mantenidas en el horno de secado 12h a 65°C y mantenidas en un desecador). Se debe identificar la cápsula, se registra su peso, y se colocan 5g del forraje o alimento, posteriormente se lleva al horno de secado a 65°C durante 24 h. Una vez terminado el proceso, las capsulas con muestra se colocan en un desecador hasta obtener un peso constante (enfriamiento). Registrándose el peso final.

Para el cálculo de la materia seca se usa la siguiente fórmula:

$$\% \text{humedad} = \frac{(\text{peso muestra BF} + \text{peso charola}) - (\text{peso seco (muestra+charola) total})}{\text{Peso muestra BF}}$$

$$\% \text{MS} = (100) - (\% \text{humedad})$$

**Tabla1.** Base de datos para el cálculo de materia seca en los forrajes.

		peso charola	peso muestra	peso seco	peso total	% humedad	% MS
1	alfalfa	1.578	5.009	6.367	6.587	4.39%	95.61%
2	leucocefala	1.536	5.005	6.241	6.541	5.99%	94.01%
3	parota	1.538	5.008	6.234	6.546	6.23%	93.77%
4	esculenta	1.576	5.013	6.313	6.589	5.51%	94.49%
5	taiwan	1.551	5.017	6.298	6.568	5.38%	94.62%
6	estrella	1.5799	5.0018	6.4115	6.5817	3.40%	96.60%
7	llanero	1.619	5.014	6.355	6.633	5.54%	94.46%



**Figura 2.** Cápsulas de pesaje con muestras de **forraje** dentro del desecador después del proceso de deshidratación.

## II.-TÉCNICA DE PRODUCCIÓN DE GAS *IN VITRO* PARA EVALUAR FORRAJES

Esta técnica descrita por Tilley y Terry (1963), Menke *et al.* (1979). Universidad de Höhenheim (Alemania), Menke y Steingass (1988) y Theodorou *et al.* (1994). Institute of Grassland and Environmental Research (IGER) en el Reino Unido; Permite la evaluación de cualquier alimento o forraje para rumiantes y se ha utilizado para determinar el valor nutritivo de los forrajes.

El principio de esta técnica radica en que la cantidad de gas liberada, cuando una muestra de alimento es incubada *in vitro* con fluido ruminal, es directamente proporcional con la digestibilidad o la degradación del substrato de la muestra y por lo tanto con el valor energético del alimento (Menke *et al.*, 1979; Menke y Steingass, 1988; Blümmel y Ørskov, 1993;; Krishnamoorthy *et al.*, 1995).

Aspectos a Considerar.

1.-El tamaño de la partícula, el lote de forraje y la conservación del mismo no deben de tener variación en las repeticiones que se vayan a realizar con ésta técnica, ya que son factores de variación.

2.-Es imprescindible contar con al menos 2 rumiantes donadores de jugo ruminal (ovinos, bovinos o caprinos). Los cuales deben estar alimentados con forraje y alimento concentrado en un nivel mínimo de mantenimiento de peso, para obtener una buena calidad de líquido ruminal. De acuerdo al método de colecta de jugo ruminal (sonda o cánula ruminal) pueden existir variaciones en la calidad y cantidad de jugo ruminal. El horario de alimentación y de colecta del fluido ruminal son aspectos a considerar, ya que en animales con un ayuno mayor a 12 h, el líquido ruminal es escaso cuando se utiliza la sonda orogástrica. Por lo que bajo este método es conveniente alimentar al ganado y realizar la colecta alrededor de 2 h después. El acondicionamiento del jugo ruminal con algún tipo de forraje o aditivo antes de la colecta es otro aspecto a considerar cuando se pretende realizar la incubación in vitro con aditivos alimenticios, forrajes tratados o alimentos poco comunes.

## MATERIALES

Sonda Orogástrica con punta roma diámetro de 0.5" para bovinos y 0.25" para ovinos y caprinos.

Funda protectora de acero inoxidable para la sonda.

Bomba manual de vacío.

Contenedor plástico

Embudo y filtros

Contenedores térmicos, herméticos y color ámbar para el transporte de jugo ruminal.

Tranquilizante químico (xilazina, acepromacina)

Sogas para contención.

Baño maría

Estufa de cultivo

Botellas séricas de policarbonato o vidrio de 120 ml de capacidad

Tapones plásticos

Anillos de acero y anilladora

Jeringas de 3, 10 y 60 cm<sup>3</sup>

Agujas desechables (22-21 G)

Tanque con carga de CO<sup>2</sup> grado alimenticio y mangueras plásticas

Termoagitadores magnéticos

Contenedores, matraces, vasos de precipitado, probetas y cristalería.

Reactivos para soluciones.

Manómetro digital con transductor desmontable acoplado a una aguja

## PROCEDIMIENTO

1. En los frascos de vidrio para cultivo se deben pesar 0.999 gr de MS del pasto, alimento o forraje a analizar.
2. El medio de cultivo (solución saliva artificial) se compone de reactivos y soluciones que se muestran en la **tabla 2**; se debe seguir el orden estricto que se marca. La solución buffer, macromineral y micromineral pueden conservarse hasta por 3 semanas antes de mezclarse en refrigeración (4°C) y en ausencia de luz. La solución reductora se debe preparar en el momento que se monte la técnica. Hay que descartar cualquier solución que presente sólidos o turbidez.

El orden de la preparación de la saliva artificial es la siguiente:

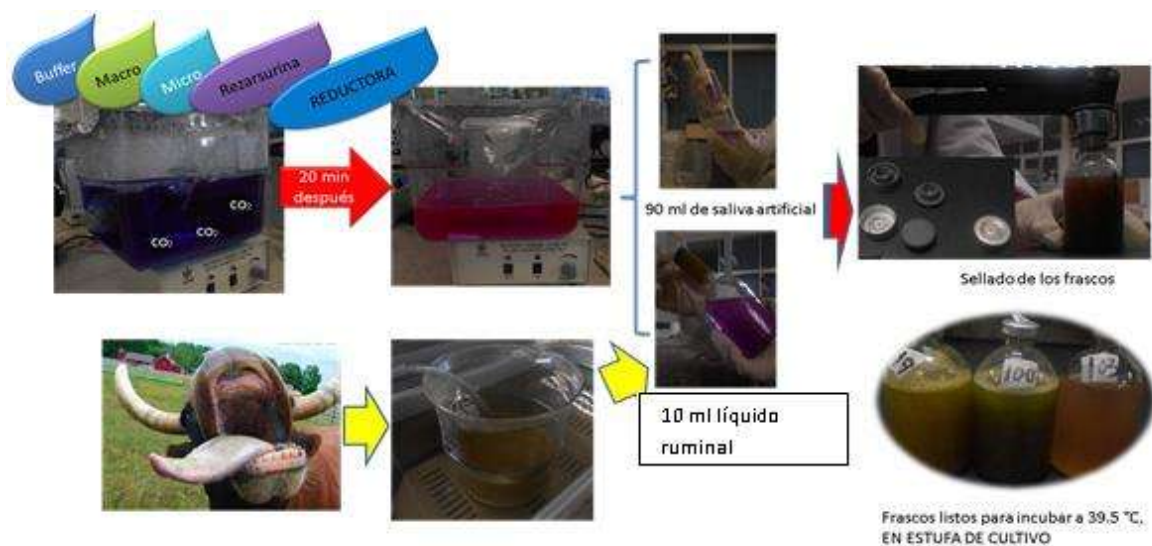
- Agua destilada (1) + Solución Buffer (2) + Solución Elementos Principales (3) + Solución Elementos Traza (4) + Solución de Resazurina (5)
- Gasear con CO<sub>2</sub> (AL MENOS 20 MIN)
- Agregar la Solución Reductora

Todas las soluciones se deben mantener a 39°C al momento de mezclarse, después del gaseado y la adición de la solución reductora, la solución final debe pasar de un color azul-morado a un color fucsia-rosado, indicando el pH óptimo para el cultivo (**Figura 3**)

3. La extracción de líquido ruminal por sonda orogástrica, se debe realizar en animales previamente tranquilizados (0.25mg/kg de clorhidrato de xilazina vía intramuscular). Los animales se deben contener con sogas y se introduce la sonda protegida por vía oral hasta la faringe, a partir de

dicho segmento se debe deslizar la sonda plástica por vía esofágica hasta el retículo-rumen. Los bovinos se deben sujetar por los ollares. Con una bomba manual de vacío acoplada al frasco contenedor, se debe aplicar succión hasta observar la salida de jugo ruminal. Una vez recolectado el líquido ruminal, se filtra en una tela de una porosidad  $\leq 1$  mm para evitar el paso de partículas grandes de fibra. El líquido se debe depositar en un frasco con tapa hermética, manteniéndose a 39° C. Cuando el jugo ruminal llega al laboratorio es importante mantenerlo a temperatura en un baño maría y se introduce una manguera con liberación constante de CO<sup>2</sup>, antes de realizar la inoculación de los frascos.

4. En los frascos de vidrio con la muestra de forraje se agregan 90 ml de la solución saliva artificial (ya descrita en el paso 2 y 3) y posteriormente los 10 ml de líquido ruminal. Los frascos se deben sellar herméticamente con el tapón de goma y la anilladora, nivelando la presión interna con una aguja, para finalmente colocarlos dentro de la estufa de cultivo a 39°C (figura 3 y 4a).
5. La lectura de la producción de gas, se realiza en tiempo real, puncionando con la aguja acoplada al transductor los tapones de los frascos. El tiempo de incubación y el intervalo de las primeras 8 mediciones se realizan en función del tipo de alimento incubado. En general en las primeras 8 h de cultivo se realiza la medición cada hora, posteriormente las mediciones se realizan a intervalos de 4 horas, hasta las 96 o 120 horas de cultivo. Las mediciones se realizan en PSI (Libra por pulgada cuadrada del inglés pounds-force per square inch). Al medir el gas, la válvula del manómetro debe estar cerrada (horizontal y paralela al tubo de escape). Al finalizar la lectura, se debe liberar el gas de los frascos con la propia válvula de paso, o con una aguja directamente. Antes de colocar los frascos en la estufa de cultivo, estos se agitan para despegar los residuos sólidos del fondo. Dado que las mediciones se realizan en PSI, se requiere conocer el volumen de gas en cm<sup>3</sup>. Para dicho análisis es preciso realizar la conversión, mediante una ecuación de regresión. La ecuación de calibración se obtiene con inyecciones sucesivas de biogás ruminal, registrando los valores en PSI, bajo las mismas condiciones de temperatura y presión.
6. Finalmente al concluirse la producción de gas *in vitro*, los frascos se deben enfriar (4°C) para inactivar los microorganismos, y después se pasan al proceso de digestibilidad *in vitro* de la materia seca.



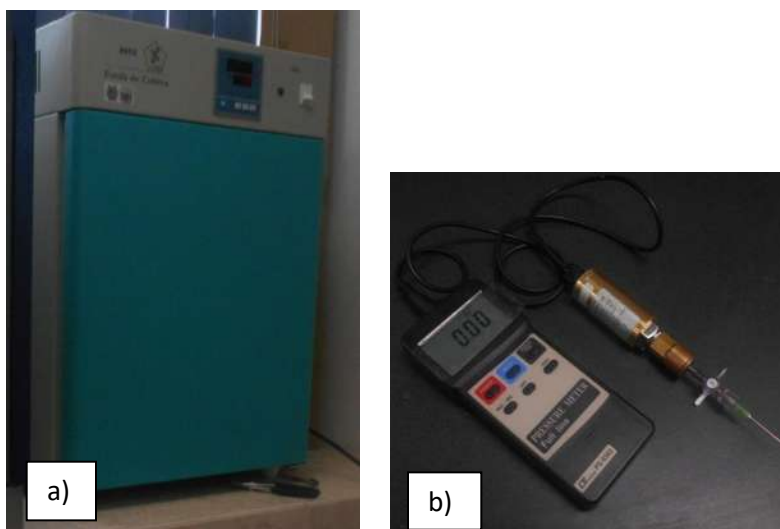
**Figura 3.** Diagrama general del montaje de técnica de producción de gas *in vitro*.

**Tabla 2.** Orden de los reactivos y cantidades para la preparación del medio de cultivo (saliva artificial) y cantidad necesaria por frasco de cultivo.

ORDEN	REACTIVO	CANTIDAD POR LITRO	UNIDAD DE MEDIDA	CANTIDAD POR FRASCO	UNIDAD DE MEDIDA
1	Agua destilada	520.2	ml	46.82	ml
2	Solución Amortiguadora o Buffer	208.1	ml	28.73	ml
2.1	Agua destilada	1000	ml		
2.2	Bicarbonato de Sodio (NaHCO <sub>3</sub> )	35	g		
2.3	Carbonato de Amonio(NH <sub>4</sub> )HCO <sub>3</sub>	4	g		

<b>3</b>	<b>Solución de Elementos Principales o Macromineral</b>	<b>208.1</b>	<b>ml</b>	<b>28.73</b>	<b>ml</b>
3.1	Agua destilada	1000	ml		
3.2	Fosfato de Sodio dibásico (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	5.7	g		
3.3	Fosfato de Potasio monobásico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	6.2	g		
3.4	Sulfato de Magnesio (Mg SO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O)	0.6	g		
<b>4</b>	<b>Solución de Elementos Traza o Micromineral</b>	<b>0.104</b>	<b>ml</b>	<b>0.009</b>	<b>ml</b>
4.1	Agua destilada	100	ml		
4.2	Cloruro de calcio (CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O)	13.2	g		
4.3	Cloruro de Manganeso (MnCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O)	10	g		
4.4	Cloruro de Cobalto (CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O)	1.0	g		
4.5	Cloruro Férrico (FeCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O)	0.8	g		
<b>5</b>	<b>Solución Resazurina</b>	<b>1</b>	<b>ml</b>	<b>0.017</b>	<b>ml</b>
5.1	Agua destilada	100	ml		
5.2	Resazurina polvo	100	mg		
<b>6</b>	<b>Solución Reductora</b>	<b>62.4</b>	<b>ml</b>	<b>5.619</b>	<b>ml</b>
6.1	Agua destilada	950	ml		
6.2	Cisteina HCL	6.25	g		
6.3	Hidróxido de Sodio 0.1 Normal (NaOH .1N)	40	ml		
6.4	Sulfuro de Sodio (Na <sub>2</sub> S x 9 H <sub>2</sub> O )	6.25	g		

**Nota:** para la preparación del NaOH .1N, se deben diluir 4g de Hidróxido de sodio granulado en 1000 ml de agua destilada.



**Figura 4.** Equipo de laboratorio para técnica de producción de gas. a) Estufa de cultivo. b) Manómetro desmontable con la válvula abierta.

### III.-ANÁLISIS DE METANO POR CROMATOGRAFÍA DE GASES

En las diferentes investigaciones sobre digestión anaerobia que tienen lugar en los pre-estómagos de los rumiantes, una de las variables a medir es la concentración porcentual de los gases producidos, por lo general  $\text{CO}_2$  y  $\text{CH}_4$ . Dichos gases representan más del 90% del gas generado. Todos los gases producidos en la fermentación anaeróbica en su conjunto reciben el nombre de biogás. Las técnicas utilizadas desde hace poco más de cuatro décadas para determinar la producción de  $\text{CH}_4$  en rumiantes comprenden la espectroscopia de infrarrojo cercano, espectroscopia de masas, gases trazadores, calorimetría, estequiometría y cromatografía de gases.

Esta última técnica es útil para la cuantificación de la proporción de metano en las muestras de biogás, siempre y cuando éstas se encuentren capturadas. Permite la inyección controlada de la cantidad de biogás, además de que la repetibilidad y confiabilidad es alta ( $\geq 95\%$ ). A continuación se describe la técnica de cuantificación de  $\text{CH}_4$  a partir de muestras de biogás ruminal obtenido *in vitro*.

### MATERIALES

Tubos cónicos plásticos de 15 ml

Tapones de goma (suba seal septa red rubber #4).

Solución salmuera ácida (pH 4).

Jeringas desechables con aguja (22G, 3 cm<sup>3</sup>)

Potenciómetro.

Jeringas con aguja de vidrio para cromatografía de gases (0.5 ml)

Cromatógrafo de gases con columna empacada de acero inox. 6.7m de longitud X 1/8" rellena sílica gel.

Dos detectores: TCD (termal conductivity detector) para CO<sub>2</sub> y FID (Flame ionized detector) para CH<sub>4</sub>

Gases de acarreo: Aire comprimido extra seco, H<sup>2</sup> grado cromatográfico y N<sup>2</sup> grado cromatográfico.

Septas de goma para el inyector del cromatógrafo

Equipo de cómputo y software Galaxie workstation versión 1.9.

## PROCEDIMIENTO

1. Se procede a capturar 2 ml de biogás de los frascos de cultivo, inyectándose inmediatamente en tubos de 15 ml de capacidad herméticamente sellados y previamente succionados al vacío con 13 ml de salmuera ácida (pH=4)(**Tabla 3**) para la conservación de la muestra. Toda vez que la muestra se introduce, el tubo se invierte en posición vertical, dejando el fondo del tubo hacia la parte superior. Los tubos se colocan en un contenedor que evite el paso de la luz y los mantenga de manera vertical a temperatura ambiente.

**Tabla 3.** Soluciones y proporciones para preparar salmuera acida (Ph=4)

	<b>Solución</b>	<b>Cantidad</b>	<b>Unidad de medida</b>
1	Agua destilada	1	L
2	Sal de grano	A saturación (20-80)	g
3	Ácido clorhídrico	Variable (0.05-0.1)	ml

**Nota:** El pH se mide con un potenciómetro, el ácido clorhídrico y la sal pueden variar en cantidades, ya que la sal se usa a saturación y el ácido solamente como ajustador del pH.

2. Para la preparación del cromatógrafo, se requiere el acondicionamiento previo y la programación de los métodos de análisis, calibrando el equipo con gases puros ( $\text{CH}_4$  al 99.99%) y  $\text{CO}_2$  de alta pureza y grado cromatográfico. Realizándose inyecciones sucesivas de dichos gases para determinar los tiempos de retención de cada gas y probar con inyecciones de biogás con proporciones desconocidas de  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$ . Antes de encender el cromatógrafo es importante revisar el estado de la septa del inyector, reemplazándola en caso de ser necesario antes de elevar la temperatura de dicho componente. El método de encendido y acondicionamiento permite verificar la temperatura del inyector, horno, columna y detectores, así como los valores de flujo. Cuando se alcanzan dichos valores programados el cromatógrafo se muestra listo para los análisis. En dicho momento se debe de cargar el método de análisis, el cual contiene valores programados de temperatura y presión de los componentes del equipo. Toda vez que el método cargado se encuentra listo, se procede a correr una secuencia de línea base, es decir sin inyectar muestra, presionando únicamente el switch del inyector. Revisando los valores del cromatograma que deben trazar una línea baja de señal que se mantiene a lo largo del análisis, subiendo al final por la rampa de temperatura.
3. La inyección de las muestras de biogás se debe realizar toda vez que el equipo se encuentre listo para la inyección, la toma de la muestra se realiza con la jeringa para cromatografía, invirtiendo la posición del tubo e introduciendo el bisel perforando el círculo marcado por el tapón, se procede a realizar una succión y expulsión de biogás al interior de la jeringa para uniformizar la muestra y entonces se toma el volumen fijado para la inyección al **cromatógrafo**, manteniendo la jeringa con la aguja hacia abajo desde la toma de muestra, hasta que se realiza la inyección, la cual debe hacerse rápidamente introduciendo la aguja en posición vertical recta e inyectando el biogás presionando el switch del inyector simultáneamente y retirando inmediatamente la aguja toda vez que se expulsa al interior el contenido de la muestra.
4. Al programarse la secuencia de trabajo en el software, se determina igualmente el tiempo de análisis para cada inyección. Al finalizar dicho proceso, el cromatógrafo se autoajusta en temperatura y flujo de columna, marcando el momento de una segunda inyección. Cada vez que concluye

un tiempo de análisis, el software genera un archivo de cromatograma, en el cual se registra el tiempo de retención y los valores de los cromatogramas en  $\mu\text{Volt}/\text{min}$  los picos correspondientes a los componentes del biogás. Debido al peso molecular, el primer pico en aparecer es el del  $\text{CO}_2$ , el cual es proporcionalmente mayor al de  $\text{CH}_4$ . Por otra parte, dado que la muestra de biogás pasa en primer lugar por el TCD, para conducirse posteriormente al FID (**Figura 4**) se genera en el cromatograma un tiempo de retención y área de cromatogramas para TCD y para FID de manera separada. Es importante escribir en la secuencia de trabajo el nombre o identificación de la muestra, el tiempo de análisis y el volumen de biogás inyectado, para poder realizar los cálculos correspondientes para las proporciones de  $\text{CO}_2$  y  $\text{CH}_4$  en las muestras analizadas.

**Nota: El equipo para cromatografía no se debe operar en condiciones de cambios de voltaje, lluvias, tormentas eléctricas o ante cualquier falla en el servicio eléctrico. Antes de encender el equipo se deben verificar y anotar en la bitácora la presión de los gases de acarreo. Al finalizar el análisis, el equipo debe someterse al proceso de apagado, en el cual aumenta la ventilación y flujo de la columna para el enfriamiento del inyector, horno de la columna y detectores. Al apagar el equipo, éste se debe desconectar de la corriente eléctrica.**

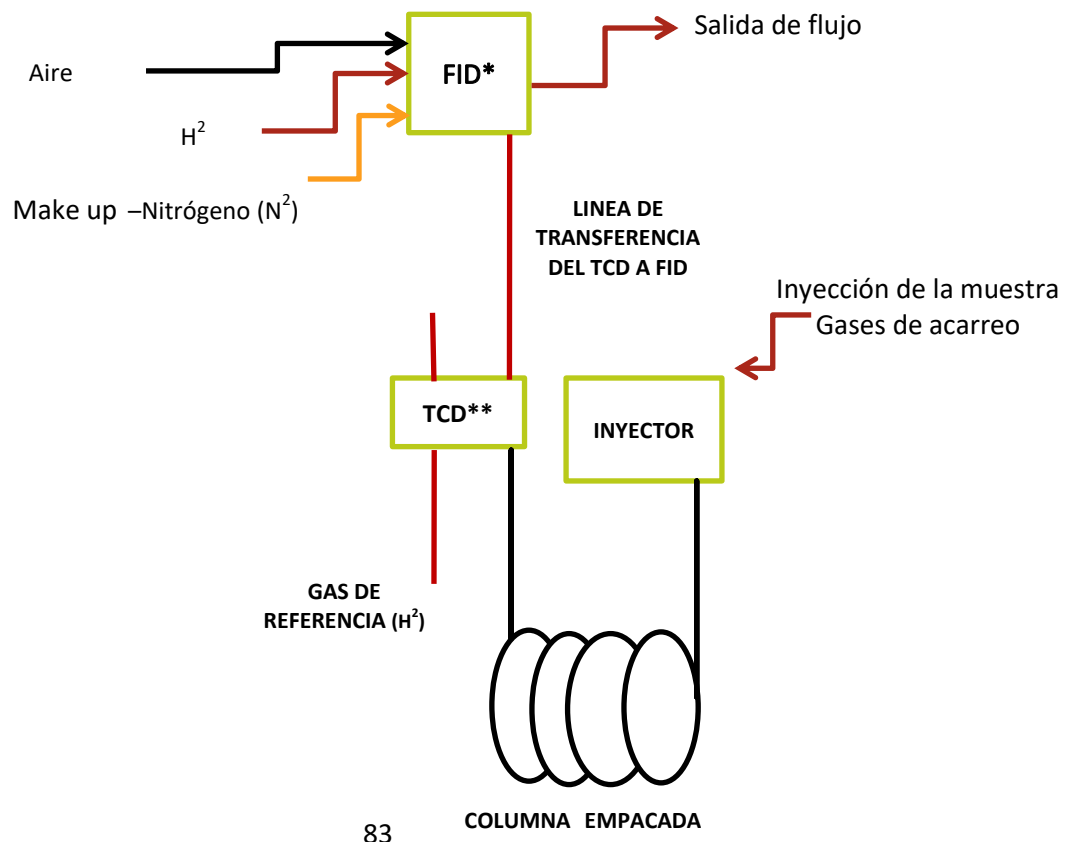


Figura 5.- Diagrama general del funcionamiento del cromatógrafo de gases.

\*FID (Detector con ionizador de flama)

\*\*TCD (Detector de conductividad térmica).

#### **IV.-ANÁLISIS DE FIBRA DETERGENTE NEUTRA Y DIGESTIBILIDAD *in vitro* DE LA MATERIA SECA**

Una vez finalizado el periodo de incubación, los residuos sólidos del forraje se someten a un análisis de fibra detergente neutra (Van Soest *et al.*, 1991). Ya que el análisis y evaluación de forrajes debe complementarse al estudiar su digestibilidad de la fibra detergente neutra (FDN).

Algunas premisas de su importancia son:

- La investigación ha demostrado que los rumiantes en etapas productivas consumen una mayor cantidad de materia seca, siempre y cuando se cubran los requerimientos nutricionales, podrán alcanzar las metas de productividad, aspecto directamente relacionado con el contenido de FDN de los forrajes utilizados (Church *et al.*, 2003).
- Segundo, mientras las estimaciones de lignina y fibra detergente ácido (FDA) han sido usadas en el pasado para estimar indirectamente la digestibilidad potencial de la FDN y digestibilidad total del forraje, actualmente se ha demostrado que FDA y lignina no consideran todas las variaciones en la digestibilidad de la FDN del forraje (Van Soest, *et al.*, 2001).
- La digestibilidad del forraje estimada en las tablas de requerimientos de nutrientes para rumiantes (AFRC, 2001) se calcula usando una aproximación aditiva donde la contribución de energía proveniente de proteína, grasa, carbohidratos no-fibrosos (NFC), y FDN son sumadas. Una predicción de la digestibilidad del FDN es requerida para usar una predicción de la energía de los forrajes.

#### **MATERIALES**

Filtros Wahtman No. 54 125mm de diámetro libres de ceniza

Solución Detergente Neutra (**Tabla 4**)

Acetona, grado reactivo

Embudos de porcelana

Matraz de toma

Bomba de vacío con mangueras y llaves

Septas y empaques de caucho

Agua destilada

Horno de secado

Charolas de aluminio

Desecador

Báscula analítica

Perlas de sílica.

Frascos de vidrio de 350ml

Papel aluminio o parafilm

Autoclave

Cristalería y termoagitador magnético.

Bolsas ANKOM para análisis de fibra

Analizador de fibra ANKOM.

Procedimiento:

1. Se debe preparar La solución detergente neutra, en función del número de frascos previamente cultivados para el análisis, ya que el requerimiento por frasco de dicha solución es de 50 ml. Si bien se puede preparar dicha solución a partir de etilendiamintetracetato de sodio, borato de sodio, fosfato de sodio dibásico y trietilenglicol, resulta más práctico y económico adquirir el reactivo preparado para solución neutra detergente de Ankom technologies, USA.

**Tabla 4.** Orden, proporción y reactivos para la solución detergente neutra de Ankom.

Orden	Reactivo	Cantidad	Unidad de medida
1	Agua destilada	20	L
2	Neutral Detergent Solution, Concentrate	1199.6	g

	(Part 1 of 2) Marca ANKOM Technology		
3	Triethylene Glycol (Part 2 of 2) Marca ANKOM Technology	200	ml

2. Se deben identificar y pesar individualmente cada filtro para colocar la muestra correspondiente a cada frasco de cultivo.
3. El contenido total de cada frasco de cultivo se debe verter en frascos con mayor capacidad (350-500ml) adicionando 50 ml de solución FDN. Con agua destilada se deben enjuagar los frascos de cultivo para evitar que se queden adheridos residuos de fibra en digestión. Los frascos identificados se tapan con papel aluminio y se someten a una digestión térmica y por presión en una autoclave a 105 ° C y 15 PSI de presión durante 50 min.
4. Una vez pasado el proceso de enfriamiento el contenido de los frascos se vierte a los filtros previamente colocados en un embudo de porcelana montado sobre un matraz kitasato, el cual se debe conectar mediante mangueras flexibles a un sistema de succión por vacío, con una bomba eléctrica, el líquido se debe filtrar, quedando únicamente el residuo sólido de la producción de gas, tanto el frasco de digestión como el residuo se deben enjuagar con agua destilada. Al momento de pesar los filtros, se debe incluir un filtro blanco, el cual no llevará residuos de la producción de gas, pero será sometido a los procesos que sufren el resto de los filtros. Finalmente los residuos de fibra se bañan con acetona para eliminar la fracción lipídica y se envían al horno de secado a 65°C durante 24 h. al finalizar el secado, los filtros se colocan en un desecador y se pesan toda vez que alcancen un peso constante.

Para calcular el porcentaje de la Digestibilidad *in vitro* en base de Materia Seca (%DIVMS) se emplea la siguiente fórmula:

**%DIVMS**= (MS inicial-(Peso del residuo-Peso del filtro blanco) X 100)/ Peso MS inicial.

5. Se debe realizar una comparación de éste análisis con contenido total de FDN en las muestras intactas de cada forraje. Para lo cual, una vez estimada la materia seca, se pesa 1g de MS de cada forraje y se coloca en una bolsa para análisis de fibra (F57 Ankom filter bags) previamente identificada. Las bolsas se sellan herméticamente con temperatura y presión, para colocarse de manera ordenada dentro de los contenedores

en forma de carrusel del analizador (digestor) de fibra ANKOM 200. El contenedor de dicho equipo se llena con 2 l de solución detergente neutra, el equipo se programa a 105°C con agitación por 50 min, posteriormente se abre la válvula de presión y la solución se descarta, las bolsas de fibra se sumergen en un baño de acetona y se envían al horno de secado a 65°C durante 24 h, para realizar un pesaje final a peso constante. Es preciso pesar una bolsa blanco, a la que no se le agrega forraje para estimar el factor final de corrección.

$$\%FDN = \frac{(W_3 - (W_1 \times C_1))}{W_2} \times 100$$

Donde:

$W_1$  = Peso de la bolsa

$W_2$  = Peso de la muestra inicial

$W_3$  = Peso seco de la bolsa con fibra después de la digestión

$C_1$  = Factor de corrección de la bolsa blanco (Peso final de la bolsa seca dividido por el peso original de la bolsa blanco).

## V.-BIBLIOGRAFÍA

- Blümmel M., Ørskov E.R. (1993). Comparison of *in vitro* and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. *Animal Feed Science and Technology*. 40:109–119.
- Church D.C., Pond W.G., Pond K.R. (2003). Métodos comunes de análisis de nutrientes y alimentos para ganado. En: *Fundamentos de nutrición y alimentación de Animales*. Segunda edición. Limusa Wiley. México, D.F. pp. 25-31.
- Krishnamoorthy U., Soller H., Steingass H., Menke K.H. (1995). Energy and protein evaluation of tropical feedstuffs for whole tract and ruminal digestion by chemical analyses and rumen inoculum studies *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology*. 52: 177-188.
- Menke K.H., Raab L., Salewski A., Steingass H., Fritz D., Schneider W. (1979). The estimation of the digestibility and metabolisable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor. *Journal agricultural science*. 93:217–222.
- Menke K. H., Steingass H. (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development*. 28: 7-55.

- Theodorou K. M., Williams A.B., Dahona S.M., McAllan B.A., France J. (1994). A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal feed science and technology*. 48: 185-197.
- Tilley J.M.A., Terry R.A. (1963). A two-stage technique for the digestion of forage crops. *British Journal of Grassland Society*. 18:104–111.
- Van Soest P.J., Robertson J.B., Lewis B.A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of dairy science*. 74: 3583-3597.