



UNIVERSIDAD DEL MAR

CAMPUS PUERTO ESCONDIDO

**EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA INCLUSIÓN DE ACEITE DE
PESCADO Y *Leucaena leucocephala* SOBRE LA PRODUCCIÓN
DE METANO EN UNA DIETA A BASE DE FORRAJE**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADO EN ZOOTECNIA

PRESENTA

ALDO ABRAHAM SALAZAR MENDOZA

DIRECTOR DE TESIS

DR. SERAFÍN JACOBO LÓPEZ GARRIDO

PUERTO ESCONDIDO, OAX., ABRIL DE 2013



UNIVERSIDAD DEL MAR CAMPUS PUERTO ESCONDIDO

Puerto Escondido, Oax., Abril 2013

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

Después de realizar una revisión detallada de la tesis “**EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA INCLUSIÓN DE ACEITE DE PESCADO Y *Leucaena leucocephala* SOBRE LA PRODUCCIÓN DE METANO EN UNA DIETA A BASE DE FORRAJE**”, presentada por el pasante de la LICENCIATURA EN ZOOTECNIA, **ALDO ABRAHAM SALAZAR MENDOZA**, se considera que cumple con los requisitos y calidad para ser defendida en el examen profesional.

COMISIÓN REVISORA

Dr. Serafín Jacobo López Garrido
Universidad del Mar
Director de Tesis

Dr. José Luis Arcos García
Universidad del Mar
Revisor

M. en C. Julieta Karina Cruz Vázquez
Universidad del Mar
Revisor

Ph. D. Mario Antonio Cobos Peralta
Colegio de Postgraduados
Revisor

M. en C. Eliud Flores Morales
Universidad del Mar
Revisor

DEDICATORIA

A mis padres, Alfonso Armando Salazar Estrada y Antonia Ever Mendoza Cirigo, que a lo largo de mi vida me han guiado otorgándome lo más preciado del mundo su amor incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Serafín Jacobo López Garrido por guiarme durante la realización de la presente investigación, y principalmente por su amistad y apoyo incondicional.

Al Doctor Mario Antonio Cobos Peralta, por su apoyo en el análisis de las muestras de biogás total, y metano; así como por sus consejos en la realización de la presente tesis.

Al Doctor José Luis Arcos García por su apoyo y consejos en la realización de la presente tesis.

A la Maestra Julieta Karina Cruz Vázquez, por su amistad, consejos y apoyo en la realización de la presente tesis.

Al Maestro Eliud Flores Morales, por sus consejos y apoyo en la realización de la presente tesis.

A mis Hermanos Alfonso, Nadia, Jasmin, Rebeca y Mercedes, por ser mi ejemplo a seguir, por su cariño y apoyo en todo momento,

A Fátima Rocha Ocampo, por su amor, apoyo y la oportunidad de vivir estos grandes momentos a su lado.

A Abel Cristóbal Montaña Trujillo y Verónica Díaz Venegas por su amistad, cariño y apoyo incondicional a lo largo de toda la carrera, y sobre todo por ser parte especial en mi vida.

A todos los profesores quienes intervinieron en mi formación académica y profesional.

A mis amigos y compañeros Ulises Cortés Gómez, Diego Arturo Ramos Ramos, Ulises Hernández Díaz y Sergio Ayala Díaz por los miles de momentos vividos a lo largo de la carrera por sus consejos y apoyo en momentos difíciles.

A la Secretaria de Educación Pública (SEP), mediante el programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP), por el apoyo recibido a través del proyecto PROMEP PTC – 119 2010; titulado: **“Efecto de los parásitos gastroentéricos en la actividad ruminal de los bovinos en el trópico”**, registrado en el Instituto de Genética de la UMAR con clave programática **CUP 2IG1004**. De donde se derivó una segunda línea de investigación titulada: **“Evaluación *in vitro* de la inclusión de aceite de pescado y *Leucaena leucocephala* sobre la producción de metano en una dieta a base de forraje”**.

CONTENIDO

RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
Ambiente ruminal y metanogénesis.....	3
Bacterias metanogénicas ruminales.....	4
Protozoarios en el rumen.....	6
Estrategias para la reducción de la metanogénesis ruminal.....	6
Estrategias de manejo y alimentación.....	7
Uso de alimentos concentrados.....	8
Empleo de arbustivas forrajeras	10
Adición de lípidos.....	12
Biohidrogenación de las grasas.....	13
Adición de aceite de pescado.....	14
Pasto King grass CT-115.....	15
Digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia seca.....	16
Metodologías para medir la producción de metano.....	17
Leyes de los gases.....	20

Cromatografía de gases.....	21
OBJETIVOS.....	22
Objetivo general.....	22
Objetivos específicos.....	22
HIPÓTESIS	23
MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
Localización.....	24
Tratamientos experimentales.....	24
Montaje del sistema de producción de gas <i>in vitro</i>	24
Inóculo.....	27
Acoplamiento de biodigestores y trampas de gas.....	27
Variables a evaluar.....	28
Producción de CO ₂ y CH ₄	28
Concentración de ácidos grasos volátiles.....	29
Concentración de bacterias totales.....	29
Concentración de protozoarios.....	30
Concentración de bacterias celulolíticas.....	30
pH del medio de cultivo a 72 h de incubación.....	30
Digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia seca.....	31

Análisis de los datos.....	32
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
Desplazamiento de gas metano en las trampas de NaOH.....	33
Desplazamiento de biogás total (CO ₂ y CH ₄) en las trampas de solución salina ácida.....	35
Digestibilidad de la MS y pH.....	36
Concentración de bacterias totales.....	41
Concentración de bacterias celulolíticas.....	43
Concentración de protozoarios.....	45
Concentración de AGV en los tratamientos.....	47
Producción de CO ₂ y CH ₄ en los tratamientos.....	51
CONCLUSIONES.....	56
LITERATURA CITADA.....	57

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Tratamientos experimentales mas medio de cultivo para microorganismos ruminales a base de glucosa celobiosa, almidon y fluído ruminal (GCAFR) (Cuadro 2) descrito por (Cobos & Yokoyama 1995).....	25
Cuadro 2. Componentes del medio de cultivo glucosa, celobiosa, almidón y fluido ruminal (GCA-FR).....	26
Cuadro 3. Componentes del medio de cultivo para bacterias celulolíticas.....	31
Cuadro 4. Desplazamiento (ml) acumulado de gas metano en trampas de NaOH.....	33
Cuadro 5. Desplazamiento (ml) acumulado de biogás total en trampas de solución ácida	35
Cuadro 6. Digestibilidad <i>in vitro</i> de la materia seca y <i>pH</i>	37
Cuadro 7. Concentración de bacterias totales a diferentes tiempos (10^9 mL^{-1}).	41
Cuadro 8. Concentración de bacterias celulolíticas (10^6 mL^{-1}).....	43
Cuadro 9. Concentración de protozoarios a diferentes tiempos (10^6 mL^{-1}).....	45
Cuadro 10. Concentración AGV (10^6 mL^{-1}).....	48
Cuadro 11. Producción de CO_2 y CH_4	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ruta metabólica de la metanogénesis (Madigan <i>et al.</i> 2004).....	5
Figura 2. Sistema de producción de gas <i>in vitro</i>	28

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue evaluar mediante la técnica de producción de gas *in vitro* el efecto de la adición de aceite de pescado, *Leucaena leucocephala* y alimento concentrado en la fermentación *in vitro* de una dieta con alto contenido de forraje (King grass CT-115), mediante la técnica de producción de gas *in vitro*; las variables evaluadas fueron la producción de CH₄, CO₂, pH, AGV, bacterias totales, bacterias celulolíticas, protozoarios y DIVMS. Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado, con cinco tratamientos, y 3 repeticiones por tratamiento; los tratamientos fueron, T1= testigo (King grass CT-115); T2 = T1+ 0.5% de aceite de pescado; T3 = T1+ 5% de aceite de pescado; T4 = 70% pasto King grass CT-115 + 30% *L. leucocephala*; T5 = 60% pasto King grass CT-115 + 40% concentrado. La mayor producción de CH₄ ($P \leq 0.05$), se presentó en el T2, acompañado de una mayor concentración de AGV ($P \leq 0.05$), aumento la relación de acetato:propionato ($P \leq 0.05$). No se observó efecto ($P \geq 0.05$) sobre la población de bacterias celulolíticas y de protozoarios. Entre los tratamientos T1, T3 y T4 no se observaron diferencias ($P \geq 0.05$) en la producción de CH₄, en el número de bacterias celulolíticas, protozoarios, ni en las concentraciones de AGV totales y la relación acetato:propionato. La menor producción de CH₄ ($P \leq 0.05$), se observó en el T5, aumento la concentración de propionato, disminuyó la relación acetato:propionato. No se observaron diferencias en la DIVMS y bacterias celulolíticas, pero disminuyó la población de bacterias totales y el pH, en contraste, aumento la población de protozoarios. Se concluye que la incorporación de 30% de *L. leucocephala* no disminuyó ($P \geq 0.05$) la producción de CH₄. La adición de 5% de aceite de pescado no afectó ($P \geq 0.05$) las poblaciones de bacterias totales y celulolíticas; se observó una ligera disminución en la producción de metano. La incorporación de alimento concentrado en un 40% disminuyó la producción de metano en la fermentación *in vitro* de pasto King grass CT-115.

Palabras clave: King Grass, *Leucaena leucocephala*, aceite de pescado, metano.

ABSTRACT

The objective of this investigation was to evaluate the effect of the addition of fish oil, *Leucaena leucocephala* and concentrated feeding in vitro fermentation of a diet high in forage (King Grass CT-115), the variables evaluated were the production of CH₄, CO₂, pH, VFA, total bacteria, cellulolytic bacteria, protozoa and IVDMD. It was utilized a completely randomized design, with five treatments, with three replicates per treatment, the treatments were, T1 = control (King Grass CT-115), T2 = T1 +0.5% fish oil; T3 = T1 + 5% fish oil, T4 = 70% forage King Grass ct-115 + 30% *L. leucocephala*, T5 = 60% forage King Grass CT-115 + 40% concentrate. The higher production of CH₄ ($P \leq 0.05$), is present in T2, accompanied by increased VFA concentration ($P \leq 0.05$), increased acetate to propionate ratio, ($P \leq 0.05$), no effect ($P \geq 0.05$) on the population of cellulolytic bacteria and protozoa. No differences ($P \geq 0.05$) in the production of CH₄ in the number of cellulolytic bacteria, protozoa, or total VFA concentration and acetate to propionate ratio, between treatments T1, T3 and T4. The lower CH₄ production ($P \leq 0.05$), was observed in the T5, no differences were observed in IVDMD, cellulolytic bacteria, decreased total bacterial population and pH, increasing the population of protozoa. It is concluded that the incorporation of 30% of *L. leucocephala* not decreased ($P \geq 0.05$) CH₄ production. The addition of 5% fish oil did not affect ($P \geq 0.05$) populations of total and cellulolytic bacteria, there was a slight decrease in the production of methane. The addition of concentrate fell by 40% in methane production *in vitro* fermentation of King Grass CT-115.

Keywords: King Grass CT-115, *Leucaena leucocephala*, fish oil, methane.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad uno de los problemas de mayor interés que enfrenta el planeta es el calentamiento global, el cual es consecuencia del aumento de las emisiones de gases de efecto invernadero, como dióxido de carbono (CO_2), metano, (CH_4), óxido nitroso (NO_2), hidrofluorocarbonados (HFC), perfluorocarbonados (PFC) y hexafluoruro azufrado (SF_6), que son producto de las actividades humanas; los cuales dañan la capa de ozono y retienen la radiación infrarroja, lo cual incrementa el calentamiento del planeta. (Moss *et al.* 2000, Molano *et al.* 2008).

El CO_2 es el principal gas de efecto invernadero en volumen de producción, y el CH_4 ocupa el segundo lugar; en contraste, este último posee un potencial de calentamiento de 21 a 30 veces mayor que el CO_2 (McCaughey *et al.* 1997; Carmona *et al.* 2005). Las emisiones de CH_4 al ambiente pueden ser de origen fósil o antropogénico, destacando dentro de este último la ganadería que contribuye con un 15 a 20 % de las emisiones totales de CH_4 (Moss *et al.* 2000). Los rumiantes domésticos producen cerca del 97% del CH_4 generado por la ganadería, aproximadamente el 75% lo produce el ganado bovino y el resto otros rumiantes como el búfalo, las ovejas y las cabras (Lassey *et al.* 1997, Lockyer 1997, McCaughey *et al.* 1997). La producción de CH_4 es generada en un 90 % en el rumen y 10 % en el intestino grueso, lo cual es resultado de la fermentación de los carbohidratos del alimento (McAllister *et al.* 1996), por una población microbiana mixta integrada por microorganismos metanógenos (grupo Archaea) que usan el H_2 (80 %) y el formiato (18 %) como sustratos (Bryant 1979, Demeyer & Fievez 2000). Distintos autores como Zinder (1993), Wolin *et al.* (1997), Attwood & McSweeney (2008), afirman que los metanógenos mediante reacciones químicas reductivas transforman el CO_2 o el formiato hasta CH_4 . El 100% del CH_4 producido en el rumen es eructado por la boca y la nariz; en tanto, el 90 % del producido por el intestino, es transportado por la sangre hacia los pulmones para ser expirado por la boca (Lassey *et al.* 1997, Benchaar *et al.* 1998)

La producción de CH_4 representa un doble problema; por una parte, consiste un problema ecológico, y por la otra representa una pérdida de energía bruta del 10

% en promedio, del alimento que consumen los animales, lo cual disminuye su productividad (Anderson & Rasmussen 1998).

Debido a lo anterior se han desarrollado numerosas investigaciones para disminuir la producción de CH₄ en los rumiantes, entre las cuales destaca el uso de aceites vegetales y grasas animales, los cuales al competir con las bacterias metanogénicas por los equivalentes de reducción durante la biohidrogenación en el rumen (Czerkawski *et al.* 1966), pueden provocar una disminución en el número de protozoarios y tienen un efecto tóxico en las bacterias metanogénicas. Por otra parte, se ha practicado la defaunación, en la cual se ha obtenido una reducción de CH₄ hasta en un 50 % (McAllister *et al.* 1996); sin embargo, los métodos que se utilizan para eliminar a los protozoarios pueden afectar la salud de los rumiantes (Baker 1999). Por esta razón, en otros estudios se ha incorporado a la dieta de los rumiantes la *Leucaena leucocephala*, la cual representa una opción viable; debido a que los metabolitos secundarios presentes en esta planta actúan como agentes defaunantes (Gurbuz 2009), sin provocar daños a los animales (Galindo *et al.* 2008).

Por lo anterior, los estudios dirigidos a reducir las emisiones de CH₄ en los rumiantes, representan un reto importante y una estrategia para mitigar la generación de gases de efecto invernadero producto de las actividades pecuarias; así como mejorar la eficiencia de utilización de la energía de los alimentos por los rumiantes (Rodríguez 2009).

ANTECEDENTES

Ambiente ruminal y metanogénesis

Los rumiantes poseen un sistema digestivo que tiene la capacidad de aprovechar y convertir material fibroso con alto contenido de carbohidratos estructurales (Ramírez 2010), debido a la diversidad microbiana compuesta por bacterias, protozoarios, hongos anaerobios y bacteriófagos (Kamra 2005) que se encuentran en el rumen, los cuales mantienen una relación simbiótica con el rumiante; razón por la cual, la población microbiana depende del alimento que ingresa al rumen para disponer de los nutrientes necesarios para su desarrollo y actividad metabólica. Esta simbiosis requiere mantener ciertas condiciones fisicoquímicas intraruminales para un adecuado funcionamiento (Owens & Goetsch 1988).

La fermentación ruminal mantiene una osmolaridad entre 260 y 340 mOsm y un pH que puede variar de 5.5 a 7.2; aunque valores por debajo de 6.0 disminuyen o inhiben la actividad de las bacterias celulolíticas, y valores cercanos a 5.5 por periodos prolongados, ponen en riesgo la vida del animal; el potencial redox suele oscilar entre -250 y -450 milivolts (mV), lo cual indica la ausencia de oxígeno y el exceso de poder reductor, que asegura un ambiente anaerobio requerido por la mayoría de los microorganismos ruminales (Yokoyama & Johnson 1988). Las anteriores condiciones permite a los microorganismos degradar la materia orgánica; al inicio, mediante reacciones enzimáticas hidrolizan los componentes complejos de los alimentos como proteínas, lípidos y polisacáridos; en aminoácidos, péptidos, ácidos grasos, glicerol y monosacáridos. Posteriormente los compuestos solubles obtenidos son metabolizados por los microorganismos en ácidos grasos volátiles (AGV), principalmente acético, propionico y butírico, alcoholes, NH_3 , H_2 y CO_2 . Finalmente en una tercera etapa (metanogénesis) las bacterias metanogénicas transforman el ácido acético, H_2 y CO_2 en CH_4 (Weber *et al.* 1984).

La metanogénesis en rumen es realizada exclusivamente por bacterias metanogénicas y tiene una función importante, dado que es una ruta metabólica aceptora de electrones, que constantemente remueve el H^+ producido durante la

fermentación ruminal de carbohidratos y proteínas de la dieta, y por lo tanto, mantiene el ecosistema ruminal en un pH óptimo para que se realicen adecuadamente todas las actividades microbianas (Weimer 1998).

La metanogénesis ruminal, a pesar de estar ligada a la fermentación anaeróbica, no es un proceso fermentativo debido a que las bacterias metanogénicas no realizan fosforilación a nivel sustrato. En la metanogénesis el Adenosin Trifosfato (ATP) se produce por fuerza motriz de protones y en el proceso no intervienen citocromos, flavinas o quinonas para el transporte de electrones. La fuente de carbono en estas bacterias es el CO_2 el cual se reduce por hidrogenación enzimática (Baez 2010).

En la ruta de la metanogénesis (Figura 1), inicialmente el CO_2 es activado por la enzima que contiene el metanofurano (MF) y reducido al nivel de formilo. El grupo formilo se transfiere del MF a una enzima que contiene metanopterina (MP) y posteriormente es deshidratado y reducido en dos pasos distintos a metileno y metilo. Después, el grupo metilo se transfiere de la metanopterina a una enzima que contiene la coenzima M (CoM). Finalmente, el metil-CoM es reducido a metano por el sistema de la metil reductasa, en la cual dos coenzimas la F_{430} y la CoM están implicadas. La coenzima F_{430} elimina el grupo CH_3 del $\text{CH}_3\text{-CoM}$, formando un complejo $\text{Ni}^{2+} - \text{CH}_3$. Este es reducido por los electrones de la coenzima B (CoB) y un complejo disulfuro de CoM y CoB (CoM-S – S-CoB), en el proceso se produce, a través de la fuerza motriz de protones, una mol de ATP por mol de metano producido (Madigan *et al.* 2004).

Bacterias metanogénicas ruminales

Taxonómicamente las bacterias metanogénicas son organismos que pertenecen al dominio *Archea*, phylum *Euryarchaeota* y se clasifican en los órdenes *Methanococcales*, *Methanomicrobiales*, *Methanopyrales* y *Methanosarcinales* (Thauer 1988) siendo los géneros identificados en el rumen *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter*, *Methanomicrobium* y *Methanosarcina* (McAllister *et al.* 1996, Wolin *et al.* 1997); las principales especies son; *Methanobacterium formicum*, *Methanobacterium bryantii*, *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobrevibacter*

smithii, *Methanomicrobium mobile*, *Methanosarcina barkeri* y *Methanoculleus olentangyi* (Sosa *et al.* 2007).

La población de bacterias metanogénicas en el rumen se encuentra en una concentración de 10^6 bacterias mL^{-1} (McAllister *et al.* 1996), son organismos anaerobios estrictos y requieren un potencial de óxido reducción menor a -330 mV. La característica particular de estos microorganismos, es la producción de metano para la obtención de energía metabólica (Whitford *et al.* 2001). Los principales sustratos para la producción de CH_4 son el CO_2 y el H_2 como donador de electrones, aunque puede utilizar otros sustratos como metanol, formato, acetato y azúcares simples (Madigan *et al.* 2004).

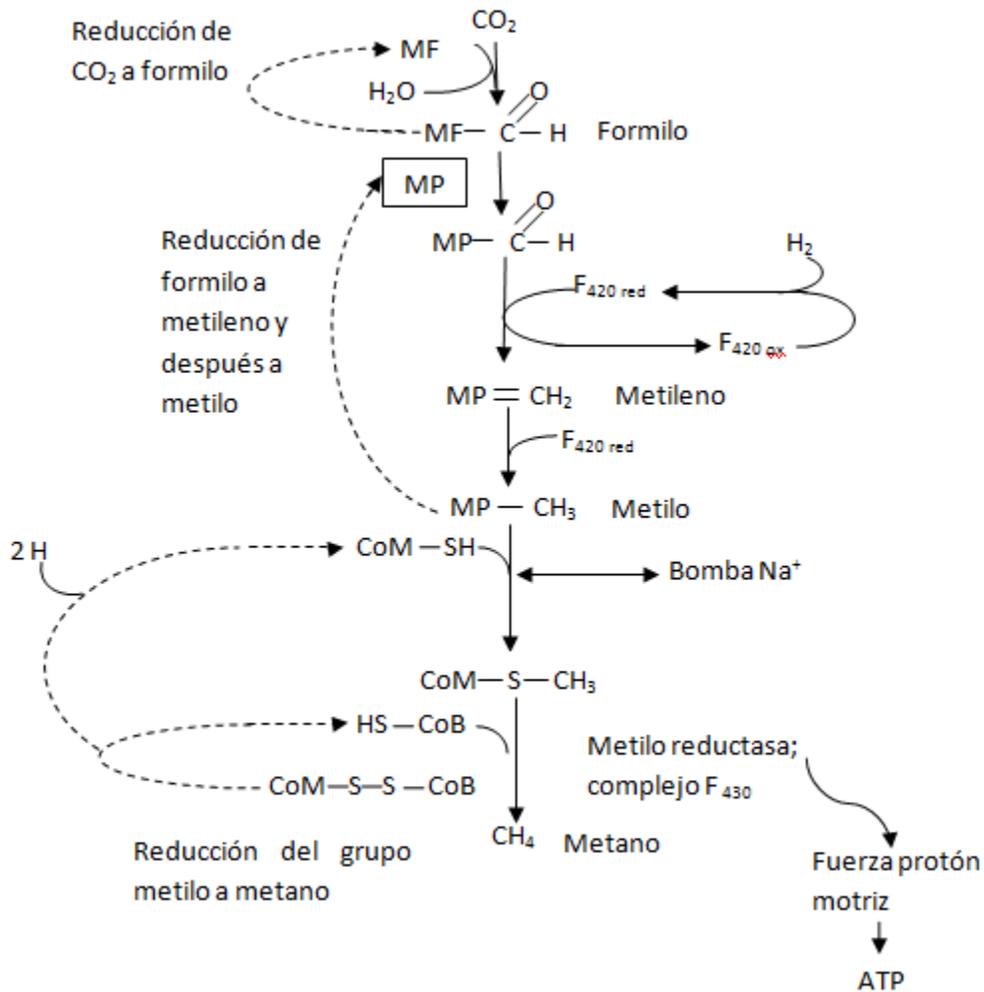


Figura 1. Ruta metabólica de la metanogénesis (Madigan *et al.* 2004).

Protozoarios del rumen

El número de protozoos en el rumen es de 10^5 a 10^6 células por mL^{-1} de fluido ruminal. Se calcula que los protozoarios pueden representar entre el 2 % del peso del contenido del rumen, el 40 % del N microbiano total y proporcionan el 60 % de los productos de la fermentación microbiana en el rumen (Yokoyama & Johnson 1988).

Los protozoarios tienen una importante función en la producción de CH_4 dada la estrecha relación con las bacterias metanogénicas, debido principalmente al fenómeno de transferencia interespecífica de H_2 (Johnson & Johnson 1995, Moss *et al.* 2000). Se han encontrado bacterias metanogénicas adheridas a la superficie de protozoarios de la familia *Ophioscolecidae* (orden *Entodinomorphida*) en los géneros *Diplodinium*, *Diploplastrum*, *Enoploplastron*, *Entodinium*, *Epidinium*, *Eremoplastrom*, *Ostracodinium* y *Polyplastrum* (Cobos 2007); se ha estimado que esta asociación es la responsable de la producción de 9 a 27% de metano en el rumen (Moss *et al.* 2000). En algunos estudios se ha determinado que la remoción de protozoarios del rumen o defaunación, puede disminuir la producción de metano hasta en un 50% (Moss *et al.* 2000, McAllister 1996). Sin embargo, los métodos utilizados para la defaunación pueden ser dañinos para los rumiantes (Baker 1999), debido que se ha demostrado que la presencia o ausencia de protozoarios en el rumen está en función del tipo de dieta y de los protozoarios predominantes (Cardozo 2005). Además, se ha observado que en los rumiantes alimentados con dietas a base de forrajes la eliminación de los protozoarios no ha logrado disminuir la producción de CH_4 en el rumen (Johnson y Johnson 1995).

Estrategias para la reducción de la metanogénesis ruminal

La disminución de metano en los rumiantes es una estrategia principal para disminuir las emisiones de gases de efecto invernadero generados por actividades agropecuarias (Hegarty 1999). La producción de CH_4 por los rumiantes no solo es un problema ecológico, además representa una pérdida de la energía bruta (2 al 12 %) del alimento consumido por los animales, disminuyendo su productividad (Soliva *et al.* 2003). Se han desarrollado diferentes estrategias para la disminución

de las emisiones de metano en los rumiantes (Demeyer & Fievez 2000, Anderson *et al.* 2003, Carmona *et al.* 2005, Beauchemin *et al.* 2008), entre las que destacan; el uso de vacunas, inhibidores enzimáticos, bacteriófagos, inducción de la homoacetogénesis, defaunación y metabolitos secundarios de los vegetales (Fievez *et al.* 2001, Greathead 2003, Galindo 2004); sin embargo, el mecanismo más estudiado ha sido la manipulación de la fermentación en el rumen mediante el empleo de aditivos en el alimento (Buddle *et al.* 2010), como antibióticos (ionóforos), análogos halogenados de CH₄, ácidos grasos insaturados y ácido fumárico; recientemente el uso de ácidos orgánicos precursores del propionato, así como bacterias acetogénicas que pueden usar H⁺ y CO₂ en la producción de acetato, como vías alternas para la utilización de H⁺ producido en rumen (Lopez *et al.* 1999, Kolver *et al.* 2004). Sin embargo, a pesar de los efectos demostrados en la adición de compuestos químicos para reducir la metanogénesis tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo* y su empleo a nivel global, hasta el momento no ha resultado una práctica económicamente viable para países en desarrollo (Sosa *et al.* 2007), por lo que una óptima fermentación ruminal debe basarse en la correcta formulación de raciones (Calsamiglia *et al.* 2005).

Estrategias de manejo y alimentación

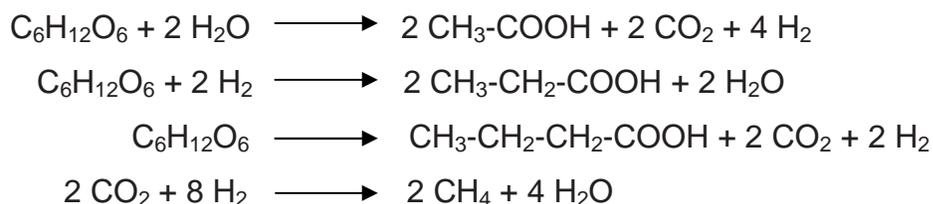
Los componentes de la dieta, al ser ingeridos por los rumiantes, afectan las condiciones ambientales del ecosistema del rumen y determinan la cantidad y el tipo de las poblaciones microbianas y sus interacciones metabólicas (Hart & Doyle 1985; Vlaeminck *et al.* 2006). Recientemente se han buscado alternativas para disminuir la producción de CH₄ en el rumen al mejorar la alimentación; debido que se ha demostrado que la calidad, el tipo y la digestibilidad de los alimentos, influyen en la cantidad de CH₄ que se produce en rumen (Beauchemin & McGinn 2005).

Uso de alimentos concentrados

Numerosas investigaciones orientadas a estudiar los procesos de formación de metano en rumen, así como los factores que intervienen, coinciden que el nivel de alimentación, el tipo de alimento y su digestibilidad son algunos de los factores que influyen en la cantidad de metano que se produce (Beauchemin & McGinn 2005).

Otras investigaciones en este sentido, argumentan que los rumiantes sometido a un sistema intensivo de alimentación, producen menores cantidades de metano que aquellos alimentados en sistemas extensivos (Clemens & Ahlgrimm 2001). Cuando el ganado es alimentado con dietas altas en granos se ha encontrado una menor concentración de bacterias metanogénicas; así, en los ovinos se han encontrado concentraciones de 10^7 a 10^8 células g^{-1} , y en bovinos concentraciones de 10^8 a 10^9 células g^{-1} (Morvan *et al.* 1996), con una producción de CH_4 anual de 35-55 Kg (Kinsman *et al.* 1995). Sin embargo, en dietas basadas en gramíneas en sistemas extensivos, se observan concentraciones de 10^9 a 10^{10} células g^{-1} para ambas especies (Joblin 2004), y se estima que la producción anual de CH_4 es de 60 a 120 kg, con pérdidas de energía de alrededor de 15 a 18 % (Kinsman *et al.* 1995).

Lo anterior puede ser explicado por la concentración de ácido acético y propiónico producidos durante la fermentación en el rumen, teniendo en cuenta que en dietas con alto contenido de forraje hay una mayor concentración de ácido acético, situación que favorece el crecimiento de las bacterias metanogénicas, debido que hay mayor disponibilidad de H_2 y de CO_2 ; en tanto que, la formación de propionato conserva hidrogeno y por tanto, reduce la producción de metano (Mendoza-Martinez *et al.* 2008); las siguientes ecuaciones de la fermentación muestran esta relación (Riquelme 1987).



Un análisis simple del número de carbonos, muestra como por cada mol de glucosa fermentado en rumen, se pierden cuatro carbonos de energía utilizable para el animal en forma de CO₂ al formar el acetato y dos carbonos al formar butirato, que también contribuye a la formación de metano, mientras que la formación de propionato conserva los carbonos y captura hidrógeno (Mendoza-Martinez *et al.* 2008). Tomando en cuenta el principio termodinámico de la producción de calor como la diferencia entre el calor de combustión de sustratos y el de los productos (Lehninger 1980), por cada mol de glucosa de 672 kcal/mol, se producirán dos de acetato (209 kcal/mol) lo que representaría un total de 418 kcal con un eficiencia del 62%. Para el propionato (367 kcal/mol) se tendrían 734 kcal con una eficiencia mayor al 100%, mientras que con el butirato (524 kcal/mol) la eficiencia sería de 77.9% (Mendoza-Martinez *et al.* 2008).

Se ha estimado que si tan solo se produjera ácido acético y no se produjera ácido propiónico, la producción de CH₄ en el rumen aumentaría hasta un 33 %; en contraste, al incrementar el alimento concentrado se producirá una mayor concentración de ácido propiónico, estimando que si la relación de ácido acético: propiónico fuera de 0.5 la pérdida energética se reduciría a 0% (Johnson & Johnson 1995).

El descenso en la población de bacterias metanogénicas al utilizar dietas con alto contenido de grano; puede deberse al efecto desfaunante que ejercen; distintos autores mencionan que dietas con 75% de concentrados disminuyen el crecimiento de protozoarios (Ley 2010). En contraste dietas con 40 y 60% de concentrados mantienen altas concentraciones de protozoarios (Franzolin & Dehority 1996). Aunque se ha observado que entre 2 ó 3 semanas los protozoarios son eliminados del rumen cuando los animales han sido alimentados con dietas altas en concentrado ofrecidas a libre acceso, algunos protozoarios inexplicablemente reaparecen 15 semanas después en animales que continuaron con el mismo tipo de alimentación (Hristov *et al.*, 2000); Franzolin & Dehority (1996), así mismo demostraron la presencia de protozoarios en dietas altas en granos; lo que indica un proceso de adaptación y pone en duda trabajos previos

que indican que dietas altas en granos mantienen al rumen libre de protozoarios (Moore & Dehority, 1993).

Empleo de arbustivas forrajeras

En años recientes, se ha sugerido la introducción de árboles, arbustos o algunos extractos de plantas, que poseen cualidades alimenticias para ser utilizadas como componentes de la dieta y con ello mejorar el valor nutritivo del alimento (Galindo *et al.* 2003b). En este contexto se encuentran muchas especies no leguminosas como la morera (*Morus alba*), el quebrabarriga (*Trichantera gigantea*) y el guasimo (*Guazuma ulmiflora*) entre otras; sin embargo son las leguminosas las de mayor uso potencial en condiciones tropicales (Carmona 2007); además de su amplio potencial forrajero, contienen principios activos (alcaloides, aminoácidos no proteínicos, saponinas, micotoxinas, terpenoides, esteroides, lecitinas, inhibidores de proteasas y fenoles) que modifican la fermentación ruminal, teniendo efectos en la reducción de metano (Cardozo, 2005), Sin embargo estos efectos varían con el tipo de metabolito secundario, su concentración y la fuente vegetal. Similar a esta variación entre las plantas, las diferentes especies de rumiantes varían en respuestas a los metabolitos secundarios (Gurbuz 2009).

Dentro de los efectos causados por los metabolitos secundarios destaca la disminución en el numero de protozoarios, se ha demostrado que las saponinas a través de su grupo hidroxilo (OH) tienen la capacidad de unirse al colesterol que se encuentra en las membranas de la célula de los protozoarios, ocasionando de esta manera su ruptura (Francis *et al.* 2002); sin embargo, quizá son los taninos, los compuestos que tienen una mayor importancia en las leguminosas forrajeras en el trópico (Carmona 2007). La literatura reporta un gran número de publicaciones donde los efectos de la suplementación con forrajeras que contienen taninos son de efectos variados; Tieman (2004) y Reed (1995), señalan que muchas leguminosas contienen concentraciones variables de taninos condensados que pueden tener efectos benéficos, perjudiciales o hasta tóxicos para los rumiantes.

Dentro de los efectos tóxicos de las arbustivas forrajeras, destacan la disminución de la digestibilidad de la proteína, carbohidratos estructurales y solubles (Reed 1982, Cardozo 2005); así como la reducción en la producción de AGV; cuando el consumo de taninos es alto se pueden presentar casos graves como necrosis renal, pancreática y de piel, que pueden llevar al animal a un estado comatoso y a la muerte (Carmona 2007).

En cuanto a los efectos benéficos se menciona la formación de un complejo con las proteínas, lo cual se debe a la gran cantidad de grupos hidroxilos (OH) de los compuestos fenólicos que los hace muy reactivos, proporcionándoles numerosos puntos de unión para formar puentes de hidrógeno, formando así asociaciones con las proteínas a pH de 3 a 7, liberándolas a un pH menor a 3, evitando de esta forma su degradación en el rumen (Carmona 2007); ocasionando disminución en la población de protozoarios, y disminución en la producción de metano (Min *et al.* 2006).

Leucaena leucocephala, es una leguminosa arbórea originaria del sureste de México y ampliamente distribuida en varias regiones del planeta como forraje para los rumiantes (Galindo *et al.* 2007), posee una alta palatabilidad, digestibilidad y sus rendimientos de materia seca son entre 8 y 16 t/ha/año, con niveles proteínicos entre 25-30%, y un alto aporte energético, de calcio y de azufre, el cual es benéfico para las poblaciones ruminales (principalmente hongos y bacterias celulolíticas) (Aregheore 1999, Galindo *et al.* 2008).

Los metabolitos secundarios presentes en esta especie actúan como agentes desfaunantes (Gurbuz 2009). Lo que en diversos estudios ha mostrado una reducción en la producción de CH₄; al respecto Galindo *et al.* (2008), reportan que al adicionar *L. leucocephala* en un 20% de la dieta (con base en pasto estrella *Cynodon nlemfuensis*), la población de protozoarios se redujo a 0.47 x10⁵ células mL⁻¹, en comparación al testigo 1.04 x10⁵ células mL⁻¹, sin embargo Galindo *et al.* (2003b), al incorporar *L. leucocephala* en un 30% de la dieta de bovinos en pastoreo reportan un aumento en la población de protozoarios a 9.55 células mL⁻¹ en comparación al testigo 6.92 células mL⁻¹; situación que se atribuye a la

variación que existe entre variedades de la misma especie así como a los factores relacionados con la especie forrajera, como el estado vegetativo, edad, fenología, época del año y otros, que influyen en las poblaciones microbianas ruminales. Con respecto a la población de bacterias metanogénicas Galindo *et al.* (2008), reportan que al adicionar *L. leucocephala* en un 25% la población de metanogénicos se redujo respecto al testigo (13.98 vs 40.22×10^7 UFC mL⁻¹) sin comprometer la población total de bacterias celulolíticas. Así mismo, se ha reportado un aumento del flujo de proteína al intestino delgado, resultando en una mejora en crecimiento y eficiencia de conversión alimenticia (Santra *et al.* 2003).

Adición de lípidos

El empleo de lípidos en la alimentación de rumiantes ha generado numerosas investigaciones (Johnson & Johnson 1995); los primeros estudios se centraron solo en la adición de los ácidos grasos en la dieta para llegar al rumen (Palmquist & Jenkins 1980), actualmente las investigaciones tratan de comprender el metabolismo de los lípidos por los microorganismos ruminales (Jenkins *et al.* 2008), mediante la manipulación fisicoquímica, considerando dos aspectos prácticos: 1) control de los efectos antimicrobianos de los ácidos grasos de manera que la grasa adicional en dietas de rumiantes, no tenga un efecto negativo en la fermentación ruminal y la digestión, y 2) la regulación de la biohidrogenación microbiana para alterar la absorción de ácidos grasos seleccionados que podría aumentar el rendimiento o mejorar las cualidades nutricionales de los productos alimenticios de origen animal (Jenkins *et al.* 1993).

Los estudios se han centrado en la inhibición de la producción de metano en el rumen por ácidos grasos insaturados de cadena larga (Jouany 1994, Czerkawski *et al.* 1966, McAllister *et al.* 1996). Sin embargo, algunos de los principales inconvenientes del uso de los lípidos en la alimentación de rumiantes, es que a dosis elevadas interfieren con la fermentación del alimento y la digestibilidad de la fibra, así como la disminución en el consumo de alimento, (Johnson & Johnson 1995, McGinn *et al.* 2004, Calsamiglia *et al.* 2005). Debido a ello la inclusión de grasas convencionales en las raciones de rumiantes deben usarse en cantidades

limitadas (Palmquist & Jenkins 1980); encontrándose la adición de grasas o aceites a la dieta en un rango de 2 a 5% (Johnson & Johnson 1995), lo que disminuye hasta en 36 % la producción de CH₄ en el rumen, los mecanismos que afectan la producción de CH₄ son diversos (Johnson & Johnson 1995), entre los cuales se encuentran la biohidrogenación de las grasas insaturadas, el aumento en la producción de ácido propiónico así como un efecto tóxico en los protozoarios (Czerkawski *et al.* 1966, Demeyer & Henderickx 1967, Carmona *et al.* 2005).

Distintas investigaciones han demostrado que la inhibición de protozoarios no es la causa principal de la reducción de metano en rumen, puesto que se ha reportado una disminución de metano en animales desfaunados alimentados con aceites, lo que indica que la eliminación de metanógenos asociados con protozoos no es la principal causa de la inhibición de la producción de metano (Nagaraja *et al.* 1997). Los ácidos grasos también tienen efecto tóxico en las bacterias metanogénicas (Dong *et al.* 1997). La toxicidad de estas sustancias en los metanógenos aumenta con su grado de insaturación (Prins *et al.* 1972). Se plantea también que los isómeros *cis* son mucho más activos que los isómeros *trans* o los ácidos grasos saturados (Demeyer & Van Nevel 1979).

Entre los aceites, los que más se emplean son los de linaza, coco, canola, rábano, girasol y aceites de pescado, basados en ácido n-3-eicosapentanoico y ácido n-3-docosahexanoico (Demeyer & Van Nevel 1979, Beauchemin & McGinn 2006).

Biohidrogenación de las grasas

A los lípidos de los alimentos les ocurren dos importantes transformaciones en el rumen las cuales son la lipólisis y la biohidrogenación. Durante la lipólisis se liberan mediante hidrólisis los ácidos grasos de los triglicéridos, glicolípidos y fosfolípidos. Los ácidos grasos liberados, normalmente insolubles en el medio ruminal, se adhieren a la superficie de las partículas del alimento, los de tipo insaturado, son sometidos a biohidrogenación por medio de la acción de enzimas "hidrogenasas extracelulares bacterianas" (Casals 1992); el resultado de estos procesos es la completa transformación de los ácidos grasos insaturados libres, en ácidos grasos saturados en rumen (Casals 1992). Este proceso es llevado a

cabo por bacterias que se encuentran presentes en el rumen, especialmente ciertas cepas de *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Bacteroides ruminicola*, *Ruminococcus albus* y *Ruminococcus flavefaciens*, también interviene el espiroqueto *Borrelia spp*, y en general los protozoos Holotricos (Maczulak *et al.* 1981).

Durante el proceso de hidrogenación también se produce la isomerización de algunos ácidos grasos, apareciendo formas *trans* de los ácidos grasos mono y poliinsaturados (Jenkins 1993) y que resultan tóxicas para las bacterias del rumen (Harfoot 1978). El efecto tóxico al parecer es mayor a cuando aumenta el grado de insaturación de los lípidos, especialmente con los ácidos grasos poliinsaturados. En estos casos, la degradación ruminal de los materiales fibrosos de la ración puede verse sensiblemente reducida, con una disminución en particular de la actividad celulolítica y provocando también una disminución de la población metanogénica y de la producción de ácido acético en el rumen (Orskov *et al.* 1977, Moore *et al.* 1986), situación que parece ser favorable energéticamente para el animal, debido que en el proceso existe una competencia por el hidrogeno y disminuye la formación de metano (Fernández 2007).

Adición de aceite de pescado

La adición de aceite de pescado en la dietas para rumiantes ha tenido como propósito incrementar el contenido energético de la dieta, aumentar la producción de leche o modificar el perfil de ácidos grasos presentes en la leche o la carne; esto como consecuencia de la actual necesidad de aportar alimentos saludables que contribuyan a la prevención de enfermedades en el humano (Fernández 2007).

Se ha demostrado que el aceite de pescado, es una fuente rica en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) n-3, que tienen efectos benéficos, relacionándolo con el sistema inmune, con la función reproductiva, la obtención de energía, el crecimiento de determinados órganos y tejidos (Fernández 2007).

A pesar de su aporte de ácido linolenico conjugado, los aceites de pescado no han sido muy utilizados para el caso de los rumiantes lecheros, dada la posibilidad de conferir sabores a la leche y sus productos derivados (Casals 1992). La

suplementación de la dieta con 1 % de aceite de pescado sin proteger tiene un efecto negativo sobre el contenido en la grasa de la leche y la digestibilidad del alimento (Loor *et al.* 2005), la adición del 2 % de aceite de pescado alcanza niveles máximos de ácido linolenico conjugado, pero disminuye la digestibilidad de la dieta de 57.8 a 50.6%, esta disminución no se presentó cuando se administró al 1 % combinado con 1 % de aceite de colza (Vafa *et al.* 2009). Otros estudios han demostrado que la adición del 1% aceite de pescado ofrecido en el agua de bebida no tuvo efecto sobre el consumo de materia seca (Osborne *et al.* 2008). Existen pocas evidencias del uso del aceite de pescado como aditivo para la reducción de metano; sin embargo tomando en cuenta que los aceites de origen marino se caracterizan por su riqueza (>35 %) en ácidos grasos poliinsaturados de 20 y 22 carbonos (Martínez 2011); y que su grado de hidrogenación en el rumen es elevado, representa una opción para la disminución de la metanogénesis en el rumen.

Pasto King grass CT-115

La ganadería del trópico se caracteriza por una alimentación basada en el pastoreo de agostaderos, en este sistema las especies forrajeras dominantes son gramíneas, caracterizadas por tener un bajo nivel nutricional (Piñeiro–Vázquez *et al.* 2009), por lo que se ha optado a la incorporación de nuevas especies acompañada por la aplicación de diferentes sistemas de utilización de forrajes (Dios-vallejo 2001), sobresaliendo el sistema de corte y acarreo, que permite tener disponibilidad de forraje todo el año así como reducir las pérdidas de forraje por pastoreo, por lo que se han introducido en años recientes especies de gramíneas forrajeras mejoradas, tal es el caso de King grass (*Pennisetum purpureum* x *P. thyphoides*) CT-115 (Ramírez *et al.* 2007, Silva 2010).

El pasto King grass CT-115 es un clon obtenido mediante la técnica de cultivo de tejidos, a partir de callos embriogénicos, provenientes de conos apicales de King grass. El clon CT 115 es una gramínea forrajera con vocación de corte adaptada a condiciones tropicales y hasta alturas de 1000 a 1500 msnm, con un rango amplio de distribución de lluvias y de fertilidad de suelos, incluyendo suelos ácidos

de baja fertilidad natural (Díaz 2007). El clon cuba CT-115 se caracteriza por poseer menor altura que otros cultivares de la misma especie, además, de un mayor ahijamiento, relación hoja-tallo y contenido de azúcares; florece muy poco y una de las características más importante es que responde bien después del pastoreo, lo que favorece su consumo directo en el pastizal (Martinez *et al.* 1996, Carrasco *et al.* 2002).

Silva (2010), reporta que la edad óptima de corte para el cultivar CT-115 es de 60 días, con una producción por hectárea de 78 toneladas de materia verde, con valores de materia seca (MS) de 17.58%; proteína cruda de 7.02 % para tallos, 5.56% para hojas; fibra detergente neutra de 67.15 % para hojas, 69.01 para tallos; fibra detergente neutra 40.89 para hojas, 42.37 para tallos; extracto etéreo 2.00% para hojas, 1.35% para tallos y una digestibilidad de 57.96 para hojas, 56.11 para tallos. Sin embargo, aún no existe información acerca de su efecto sobre los principales parámetros de fermentación ruminal como son AGV, producción de CH₄, CO₂, así como su efecto sobre los microorganismos ruminales.

Digestibilidad *in vitro* de la materia seca

El valor nutritivo potencial de un alimento puede ser determinado, en primera instancia, por el análisis químico proximal, pero el valor del mismo para el animal solo se puede lograr a través de un análisis de las pérdidas inevitables que ocurren durante la digestión, absorción y metabolismo (Arce *et al.* 2003).

Los parámetros de la cinética de fermentación describen la digestión y caracterizan propiedades intrínsecas del alimento que limitan su disponibilidad para el rumiante, determinan la proporción de nutrientes consumidos que pueden ser absorbidos y utilizados por el animal, y dependen de un activo crecimiento y desarrollo de la población microbiana del rumen (Bruni & Chilibroste 2001). Sin embargo, la determinación *in vivo* de la digestibilidad es un proceso laborioso y costoso, y que requiere el empleo de grandes cantidades de alimento, por lo que se han propuesto distintos métodos *in vitro* para su estimación (Bochi-Brum *et al.* 1999).

La digestibilidad de los alimentos se ve afectada por distintos factores, entre los que destacan el tipo de ración, tasa de ingestión de los alimentos, la especie animal y el estado fisiológico de los animales; los factores relacionados con el tipo de ración administrada a los animales, ha sido uno de los más estudiados.

En estudios recientes se ha propuesto que al incrementar la digestibilidad del alimento se pueden reducir las emisiones de CH₄, se ha observado que al ofrecer forrajes con digestibilidad diferente de la materia orgánica, de una mezcla de heno de leguminosa y gramínea, heno de gramínea de mediana calidad y heno de gramínea de baja calidad, se encontró que la producción de CH₄ se incrementó conforme la digestibilidad se redujo, correspondiendo una producción de 47.8, 63.7 y 83.2 L Kg⁻¹ de materia orgánica digestible consumida, respectivamente (Boadi & Wittenberg 2002).

Moysés do Nascimento *et al.* (2007), reportan que tras evaluar el efecto del grado de madurez de heno de *Brachiaria brizantha* cortado a 15, 45 y 90 días y ofrecido a novillos Nellore, no encontraron diferencias de la edad al corte sobre la producción de CH₄, siendo ésta de 17.38, 23.41 y 20.02 g Kg MS⁻¹, respectivamente, resultados similares a los reportados por Hart *et al.* (2009), al ofrecer el mismo tipo de zacate producido para tener alta o baja digestibilidad: 816 y 706 g/Kg MS, respectivamente, ofrecidos al libre acceso a vaquillas encastadas de Charolais en confinamiento, se encontró un consumo mayor del pasto de alta digestibilidad 7.66 Kg MS d⁻¹ en comparación con el pasto de baja digestibilidad 5.38 Kg MS d⁻¹; sin embargo, la producción de CH₄ fue similar entre tratamientos. Los indicadores de la fermentación ruminal y la población microbiana tampoco fueron distintos debido a la digestibilidad del pasto.

Metodologías para medir la producción de metano

Para desarrollar estrategias que mitiguen las emisiones de CH₄ en la ganadería, debe ser posible cuantificar estas emisiones bajo un amplio rango de circunstancias (Carmona *et al.* 2005). Las técnicas *in vivo* para medir la producción de biogás, CO₂ y CH₄, en el rumen requieren de instalaciones especiales, equipos y animales; en cambio las técnicas *in vitro*, que únicamente

simulan la fermentación de los alimentos en biodigestores, son efectivas y eficientes por su rapidez y bajo costo de operación (Baez 2010, Ramírez 2010), además de que permite determinar la extensión y la cinética de la degradación del alimento a través del volumen de gas producido durante el proceso fermentativo, bajo condiciones controladas (Posada & Noguera 2005).

La cuantificación de la producción de gas y su contenido de CO₂ y CH₄ en las técnicas *in vitro* generalmente se realiza por medio de transductores de presión, jeringas volumétricas, trampas para captura de gas (Pell & Schofield 1993; Theodorou *et al.* 1994; Jawed & Tare 1999, Hindrichsen *et al.* 2004, Eun *et al.* 2004). Los transductores de presión y las jeringas volumétricas tienen como desventaja, que la alta presión interna que se acumula en el interior de los bioreactores altera la solubilidad de los gases en solución acuosa en forma directamente proporcional a la presión generada en el interior de los bioreactores (France *et al.* 1993, Theodorou *et al.* 1994, Shofield & Pell 1995, Getachew *et al.* 1998). Esto provoca que se realicen mediciones erróneas de la cantidad de biogas que se produce por la fermentación de un sustrato (Baez 2010). Sin embargo cuando se usan biodigestores acoplados a trampas de gas se puede medir la producción de biogas, CO₂ y CH₄ equilibrando la presión interna de los biorreactores con la presión atmosférica por medio de una válvula de alivio evitando de esta forma que la solubilidad de los gases altere las mediciones (Menke *et al.* 1979 Jawed & Tare 1999, Gaviria *et al.* 2003).

La caracterización del biogás comúnmente se realiza con el uso de equipos complejos como lo es la cromatografía de gases, que tienen como desventaja un alto costo además de que requiere de un personal capacitado técnicamente, (Ramirez 2010). Por lo que una alternativa es estimar el metano a través de cálculos usando de ecuaciones de predicción (Carmona 2005).

Wolin (1960) reporta un método que permite calcular las emisiones de metano a través de la distribución molar de los AGV. En donde se estima que 57.5 moles de glucosa producen 65 moles de acético + 20 moles de propiónico + 15 moles de butírico + Y moles de CO₂ + Z moles de CH₄. Para calcular la producción de CO₂ y CH₄ (Y y Z) se usan las ecuaciones siguientes.

$$Y = \frac{Ma}{2} + \frac{Mp}{4} + \frac{3Mb}{2}$$

Dondé:

Y = moles de CO₂

Ma = proporción molar de ácido acético

Mp = proporción molar de ácido propiónico

Mb = proporción molar de ácido butírico

Para el cálculo de CH₄, la propuesta de Wolin (1960) es la ecuación:

$$Z = Ma + 2Mb - Y$$

Donde:

Z = moles de CH₄

Y = moles de CO₂

Ma = proporción molar de ácido acético

Mb = proporción molar de ácido butírico

Sin embargo esta metodología asume que todo el exceso de H₂ es convertido en metano y no hay hidrógeno asociado con la síntesis de células microbiales y que de la fermentación de los sustratos no carbohidratados no se producen AGV. Cuando las células microbiales son incluidas en la estequiometría de la fermentación, los estimativos de la producción de metano pueden disminuir (Carmona *et al.* 2005).

Otras metodologías consideran las características del alimento para calcular la producción de metano. La ecuación de Blaxter & Claperton (1969), consideró inicialmente las características del alimento y es la base de la cual la mayoría de los estimativos de producción de metano se han derivado. Otra ecuación fue propuesta por Moe & Tyrrel (1979), la cual también incorpora las características del alimento. Se deriva de mediciones realizadas en ganado con raciones diarias

de alta calidad y su relación con residuos solubles, hemicelulosa y celulosa en la producción de metano (Johnson & Johnson 1995). Esta se determina como sigue:
 $CH_4 = 3.406 + 0.510 (\text{residuo soluble}) + 1.736 (\text{hemicelulosa}) + 2.648 (\text{celulosa})$
Donde el CH_4 está en $MJ \text{ día}^{-1}$ y los residuos solubles, hemicelulosa y celulosa en $Kg/día$.

En términos generales se ha señalado que las ecuaciones de predicción de producción de metano en el ecosistema ruminal requieren información de consumo de materia seca, composición química de la dieta (incluyendo solubilidad y tasa de degradabilidad) y otras variables como la tasa de pasaje de las fracciones sólida y líquida del rumen, volumen ruminal y pH (Benchaar *et al.* 1998).

Leyes de los gases.

Para medir la producción de biogas, que se genera cuando se simula la fermentación *in vitro* de un sustrato, es necesario considerar las leyes fisicoquímicas que rigen el comportamiento de los gases; se ha demostrado que con base en las leyes generales de los gases, es posible cuantificar la cantidad de CH_4 y CO_2 (Baez 2010, Ramírez 2010).

En primer lugar es necesario considerar la ley de las presiones parciales, la cual menciona que la presión de vapor total (P_t) de una mezcla de gases en el interior de un recipiente, es igual a la suma de las presiones parciales de cada uno de sus componentes:

$$P_t = P_1 + P_2 + P_3 + \dots P_n$$

La ley de los gases ideales, indica que todos los gases idealmente se comportan en forma similar cuando existen cambios de temperatura y presión pudiendo de esta forma expandirse o contraerse entre límites muy amplios lo cual no sucede en sólidos o líquidos, esta ley se resume en la siguiente expresión:

$$PV = nRT$$

Donde P es la presión que ejerce el gas en atmosferas (atm), V es su volumen en litros (L), n es el numero de moles en litros (L), R es la constante de los gases ideales (0.0821 L x atm/°K*mol) y T es la temperatura en K.

Cromatografía de gases

La determinación del biogás se realiza tradicionalmente mediante cromatografía de gases (Steele *et al.* 1987), Pecsok & Shields (1990), mencionan al respecto que la aplicación de la cromatografía de gases para la investigación de la cinética y el mecanismo de las reacciones orgánicas es fundamental. Esto se debe a su gran versatilidad como técnica analítica y a sus ventajas en cuanto a tamaño de muestra, sensibilidad, rapidez de análisis (Mahy 1979), sin embargo esta técnica requiere de personal capacitado técnicamente, así como métodos específicos por analito (Ramírez 2010).

El poder de la cromatografía de gases proviene de su capacidad de separar componentes individuales de una mezcla inyectada en la columna cromatográfica identificando los analitos uno a uno, tal como salen de la columna (Baird 2001). La separación ocurre bajo la influencia de la temperatura de la columna y de la superficie cromatográfica. Un gas denominado gas portador o fase móvil fluye a través de la columna y los compuestos gaseosos sufren una serie de interacciones no destructivas ligeramente diferentes, con la superficie cromatográfica, el resultado es la obtención de un tiempo de tránsito distinto para cada compuesto y por tanto un tiempo de retención individual (Baird 2001).

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar *in vitro* la adición de aceite de pescado, *Leucaena leucocephala* y alimento concentrado, sobre la producción de CH₄ y las principales variables fermentativas y microbiológicas de fermentación ruminal, en una dieta a base de pasto King grass CT-115 (*Pennisetum purpureum* x *Pennisetum thyphoides*).

Objetivos específicos

Determinar el efecto *in vitro* de la adición de aceite de pescado en la producción de metano (CH₄), dióxido de carbono (CO₂), ácidos grasos volátiles (AGV), potencial de hidrogeno (pH), en la fermentación *in vitro* de en una dieta a base de pasto King grass CT-115.

Determinar el efecto *in vitro* de la inclusión de *Leucaena leucocephala* en la producción de CH₄, CO₂, AGV, pH, en la fermentación *in vitro* en una dieta a base de pasto King grass CT-115.

Determinar el efecto *in vitro* de la inclusión de alimento concentrado en la producción de CH₄, CO₂, AGV, pH en la fermentación en una dieta a base de pasto King grass CT-115.

HIPÓTESIS

La adición de aceite de pescado en una dieta a base de pasto King grass CT-115, disminuye la producción de CH₄ en la fermentación *in vitro*.

La adición de *Leucaena leucocephala* en una dieta a base de pasto King grass CT-115 disminuye la población de protozoarios, y por lo tanto la producción de CH₄ en la fermentación *in vitro*.

La adición de alimento concentrado en una dieta a base de pasto King grass CT-115 disminuye la producción de CH₄ en la fermentación *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Bioquímica y Nutrición de la Universidad del Mar Campus Puerto Escondido, ubicado en el Campo Experimental de la comunidad de Bajos de Chila, localizado en el Kilómetro 128.1 de la carretera Federal Pinotepa Nacional-Puerto Escondido, cuyas coordenadas son 15° 55' 33.4" N y 97° 09' 03.5" O, y altitud de 12 m. (Robles 2010). El clima de la región se ubica entre los climas A(c)w2 y Aw0, con dos estaciones bien diferenciadas (secas y lluvias), con una precipitación media anual entre 839.1 y 1587.1 mm y una temperatura media anual entre los 24 y 27.2°C (Serrano-Altamirano *et al.* 2005). Los análisis químicos de las muestras se realizaron en el laboratorio de Microbiología Ruminal y Genética Microbiana, del Colegio de Postgraduados, ubicado en Montecillo, Texcoco, Estado de México.

Tratamientos experimentales

Se elaboraron cinco tratamientos experimentales; T1, 100 % de pasto King grass CT-115; T2, 99.5% de forraje + 0.5 % de aceite de pescado; T3, 95% de forraje + 5.0 % de aceite de pescado; T4, 70 % de pasto King grass CT-115 + 30 % de *Leucaena leucocephala*; T5, 60% de pasto King grass CT-115 + 40 % de alimento concentrado (Cuadro 1).

El material vegetal del pasto King grass CT-115 se colectó a los 90 días de crecimiento, en una parcela experimental establecida en el Campo Experimental de la comunidad de Bajos de Chila.

Montaje del sistema de producción de gas *in vitro*.

Para medir la producción de biogas total se usaron 15 viales serológicos de vidrio de 100 ml como biodigestores, los cuales se dividieron en 5 grupos de 3 biodigestores cada uno. De forma aleatoria a cada grupo de 3 viales se les asignaron los tratamientos respectivos a evaluar (Cuadro 1).

Después de agregar las dietas, y bajo condiciones de anaerobiosis se adicionaron 45 ml de medio de cultivo GCAFR (Cuadro 2). Los viales fueron sellados con tapones de plástico y arillos de aluminio. Se esterilizaron a 121°C y 1.5 atm durante 15 min posteriormente fueron sometidos a prueba de esterilidad en una incubadora marca RIOSSA, modelo E-71D, a una temperatura de 39 °C por 48 h. Para las trampas de biogás total se utilizaron 15 viales de 100 mL a los cuales se les agrego solución salina ácida (400 g L⁻¹ de NaCl + HCl 2 N hasta disminuir el pH a 2, y 0.5 % de anaranjado de metilo como indicador) hasta su llenado total; también se utilizaron 15 viales de 100 mL, con una solución de NaOH 1N, con pH final de 13.36, posteriormente, todos los viales fueron sellados con tapones de goma y arillos de aluminio.

Cuadro 1. Tratamientos experimentales mas medio de cultivo para microorganismos ruminales a base de glucosa celobiosa, almidon y fluído ruminal (GCAFR) (Cuadro 2) descrito por (Cobos & Yokoyama 1995).

Tratamiento	Características
T1	45 ml (GCAFR) + 1.0 g de pasto King grass CT-115 (criba de 1 mm) + 5 ml de fluido ruminal fresco.
T2	45 ml (GCAFR) + 0.995 g de pasto King grass CT-115 (criba de 1 mm) + 5 ml de fluido ruminal fresco + aceite de pescado (0.5 %).
T3	45 ml (GCAFR) + 0.95 g de pasto King grass CT-115 (criba de 1 mm) + 5 ml de fluido ruminal fresco + aceite de pescado (5%).
T4	45 ml (GCAFR) + 0.7 g de pasto King grass CT-115 (criba de 1 mm) + <i>Leucaena leucacephala</i> (0.3 g) + 5 ml de fluido ruminal fresco.
T5	45 ml (GCAFR) + 0.6 g de pasto King grass CT-115 (criba de 1 mm) + 0.4 g de alimento concentrado comercial + 5 ml de fluido ruminal fresco.

Cuadro 2. Componentes del medio de cultivo glucosa, celobiosa, almidón y fluido ruminal (GCA-FR)

Ingrediente	Cantidad en 100 mL
Agua destilada	56.2
Fluido ruminal clarificado ¹	30.0
Solución mineral I ²	5.0
Solución mineral II ³	5.0
Resarzurina al 0.1%	0.1
Trypticase peptona	0.2 g
Extracto de levadura	0.1 g
Glucosa	0.06 g
Celobiosa	0.06 g
Almidón	0.06 g
Carbonato de sodio 8%	5.0
Solución de sulfato cisteína ⁴	2.0

¹ Fluido ruminal clarificado: líquido ruminal filtrado en gasa a cuatro capas, centrifugado 15 min a 8,000 rpm y esterilizado 35 min a 15 psi y 121 °C (el proceso se realizó tres veces).

² Solución mineral 1: 6 g de K_2HPO_4 por cada 1000 ml de agua destilada.

³ Solución mineral 2: 6 g de KH_2PO_4 ; 6 g $(NH_4)_2SO_4$; 12 g NaCl; 2,45 g $MgSO_4$ y 1,6 g de $CaCl_2 \cdot H_2O$; por cada 1000 ml de agua destilada.

⁴ Solución de sulfato-cisteína: Agregar 2.5 g de L-cisteína en 50 ml de agua destilada, ajustar el pH a 10 con solución de NaOH al 10 % (4 N), añadir 2.5 g de $Na_2S \cdot 10H_2O$ y aforar a 200 ml. Pasar la mezcla a un matraz de bola, calentar con flujo de CO_2 y se esteriliza 15 min a 121°C.

Cobos & Yokoyama (1995).

Inóculo

La fuente de inóculo utilizado fue fluido ruminal fresco obtenido de una vaca canulada en el rumen, de una cruce de Cebú x Pardo Suizo, estabulada y alimentada durante 21 días con una dieta a base de pasto King Grass CT-115 y agua a libre acceso. El fluido ruminal fue extraído a las 08:30 h, se filtró en gasa a cuatro capas con la finalidad de eliminar las impurezas y se depositó en un termo cerrado herméticamente para transportarlo al laboratorio. El fluido fue depositado en un matraz bola con flujo de CO₂ a 39 °C. La concentración de bacterias totales en el inóculo fue 9.25×10^9 bacterias ml⁻¹ de fluido y la concentración de protozoarios fue 26.33×10^6 protozoarios ml⁻¹ de fluido, el pH del inóculo fue de 7.21; el tiempo transcurrido entre la extracción del fluido y su aplicación en los biodigestores fue de 50 min;

Acoplamiento de biodigestores y trampas de gas

Los biodigestores fueron colocados en un baño maría RIOSSA modelo BMME hasta que se estabilizó la temperatura a 39 °C; la inoculación se realizó con jeringas estériles desechables de 10 ml, se aplicaron 5 ml de fluido ruminal en cada biodigestor por medio de punción con jeringa hipodérmica en una campana de flujo laminar Tecni-lab modelo LMGE7CM, bajo flama de mechero. Cada biodigestor se acopló una trampa de gas por medio de mangueras de Taygon® de 45 cm de largo (diámetro externo e interno de 3.63 x 2.38 mm), a la cual le fue colocado en sus extremos agujas hipodérmicas (marca Nipro 20G x 31.8 mm). La manguera Taygon® fue asegurada con una pinza para evitar pérdidas de gas antes del montaje del sistema de producción de gas *in vitro*.

Las trampas contaron con una válvula de alivio (aguja hipodérmica 20G x 31.8 mm) para igualar la presión atmosférica. Finalmente, la trampa de gas fue colocada en forma invertida sobre una probeta de plástico de 50 ml, para medir el desplazamiento de la solución interna en la trampa de gas. Con la finalidad de evitar el estrangulamiento de la manguera, se adaptaron la probetas recortando, en forma de triángulo la parte superior de la probeta; el sistema de producción de

gas *in vitro* fue cubierto con un lienzo de tela oscuro para evitar la entrada de luz (Figura 2).



Figura 2. Sistema de producción de gas *in vitro*.

Variables a evaluar

Producción de CO₂ y CH₄

Se registró el volúmen de solución salina desplazada a diferentes tiempos, a las 0, 6, 12, 24, 48 y 72 h de incubación (Rodríguez 2009). Posteriormente, las trampas salinas se almacenaron en refrigeración a 4°C hasta su posterior análisis. Las septas fueron cubiertas con parafilm, evitando así la pérdida de biogás. El gas capturado en las trampas de solución salina fue sometido a conductividad térmica por cromatografía de gases para determinar el porcentaje de CH₄ y CO₂. Se utilizó un cromatografo de gases Perkin Elmer modelo Clarus 500, con detector de conductividad térmica (TCD) y una columna PE 6'x1/8 ODSS: Propak 080/100. Se inyectó 0.1 ml de muestra de forma manual. Las características y condiciones del método fueron: a) temperatura de la rampa en el horno de inicio 28 °C min⁻¹, rampa 2.5°C min⁻¹, final 80°C 0.5 min⁻¹; b) temperatura del inyector TCD 130 °C; c) volumen de inyección 0.1 ml, d) flujo del gas acarreador (helio) 23.5 ml min⁻¹, y e) tiempo de retención fue: CH₄ 1 min ± 0.05 y CO₂ 2 min ± 0.05.

Concentración de ácidos grasos volátiles

La concentración de AGV se determinó después de 72 h de incubación. Se transfirieron 1 mL de cada una de las muestras en tubos Eppendorf de 2.0 mL que contenían 0.25 mL de ácido metafosfórico al 25 %. En una centrifuga Eppendorf 5810R, se centrifugaron a 11, 000 rpm por 10 min a 4°C. Posteriormente, se tomó el sobrenadante y se colocó en viales para cromatografía. La concentración de AGV se determinó en un cromatografó de Gases Perkin Elmer modelo Clarus 500 con automuestreador y una columna capilar Elite FFAP. Las condiciones usadas fueron: velocidad del gas acarreador nitrógeno, 15 mL min⁻¹; volúmen de inyección, 1µL de muestra; temperaturas de inyector, detector y horno, 200, 250 y 140 °C, respectivamente, tiempo de retención del acetato 2.19 min, propionato 2.62 min, butirato 3.14 min y un tiempo total de corrida de 5 min (Pérez 2006).

Concentración de bacterias totales

La determinación de la concentración de bacterias se realizó a las 0, 6, 12, 24, 48, 72 h de incubación (Stewart *et al.* 1997), por método directo en una cámara Neubauer-improved y un microscopio óptico marca MOTIC, modelo DMB3, a una magnificación total de 100X, determinando el número de bacterias en 5 cuadros de la cuadrícula central de la cámara con un área de 0.04 mm² y una profundidad de 0.1 mm, el número de bacterias mL⁻¹ se estimó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Bacterias por mL}^{-1} = \bar{X} \times 25 \times \text{FD} \times 50000$$

Dónde:

\bar{X} : Promedio de células contadas en los 5 cuadros

FD: Factor de dilución

25: Numero de cuadros en la cuadrícula central

50000: Constante de la camara

Concentración de protozoarios.

La determinación de la concentración de protozoarios se realizó a las 0, 6, 12, 24, 48, 72 h de incubación (Stewart *et al.* 1997), por método directo en una cámara Neubauer-improved y un microscopio óptico marca MOTIC, modelo DMB3, a una magnificación total de 40X, determinando el número de protozoarios en 5 cuadros con un área de 1mm^2 y una profundidad de 0.1 mm. El número de protozoarios mL^{-1} se estimó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Protozoos por mL} = \text{NP} \times \text{FD} \times 50000$$

Dónde:

NP: Numero de protozoarios contados

FD: Factor de dilución

50000: Constante de la camara

Concentración de bacterias celulolíticas.

La concentración de bacterias celulolíticas se estimó por el método del número más probable (NMP) según Harrigan & McCance (1979) después de 72 h de incubación. Se utilizó el medio de cultivo para bacterias celulolíticas (Cuadro 3), la prueba se realizó por triplicado con diluciones de 0.5 mL en tubos de 13 X 100 mm que contenían 4.5 mL de medio de cultivo para bacterias celulolíticas. Las diluciones fueron de 10^{-1} a 10^{-10} de medio de cultivo para bacterias celulolíticas. Se consideró como crecimiento positivo de bacterias celulolíticas a aquellos tubos de cultivo que presentaron degradación de la tira de papel y turbidez después de los 7 días de incubación a 39°C .

pH del medio de cultivo a 72 h de incubación

El pH se determinó después de 72 h de incubación (Lana *et al.* 1998) en cada biodigestor con un potenciómetro marca HANNA modelo HI2210, calibrado a dos puntos (4.0 y 7.0).

Cuadro 3. Componentes del medio de cultivo para bacterias celulolíticas.

Ingrediente	Cantidad en 100 mL
Agua destilada	56.2
Fluido ruminal clarificado	30.0
Solución mineral 1	5.0
Solución mineral 2	5.0
Resarzurina al 0.1%	0.1
Trypticasa peptona	0.2 g
Extracto de levadura	0.1 g
Carbonato de sodio 8%	5.0
Solución de sulfato cisteína	2.0
Papel Wathman 541	1 tira

Digestibilidad *in vitro* de la materia seca

Después de las 72 h de incubación (McAllister *et al.* 1994), se filtro el contenido de los biodigestores; con un equipo de filtración con bomba de vacío GAST, modelo DOA-P704-AA, el residuo se seco en una estufa FELISA a 75 °C por 48 h; para obtener el peso constante y se pesó en una balanza analítica.

Se determinó la digestibilidad de la materia seca (MS) por medio de la siguiente fórmula (Mellenberger *et al.* 1970);

$$DIV \% = 100 \left[\frac{MSi - (PMS - (DB + PS))}{MSi} \right]$$

Donde:

DIV %= Digestibilidad in vitro en porcentaje

MSi = Materia seca inicial (muestra)

PS = Peso constante del papel

DB = Digestibilidad de los blancos

PMS = Peso del papel más el residuo de la muestra

Análisis de los datos

Para el análisis de los datos se usó un diseño completamente aleatorio, se consideraron como unidades experimentales a los biodigestores, los cuales fueron asignados de manera aleatoria a uno de los cinco tratamientos experimentales con tres repeticiones. Se analizaron por medio del procedimiento GLM del paquete estadístico SAS (2010) y para la comparación de medias se usó la prueba de Tukey (Steel & Torrie 1988). Para las variables de concentración de bacterias totales, bacterias celulolíticas y protozoarios, se realizó una transformación logarítmica para normalizar los datos.

El modelo estadístico fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_j + E_{ij}$$

Y_{ij} = Variable respuesta.

μ = Media general.

T_j = Efecto del j -ésimo tratamiento.

E_{ij} = Error experimental.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Desplazamiento de gas metano en las trampas de NaOH

El desplazamiento acumulado en las trampas de solución de NaOH (Cuadro 4), presentó diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos a las 12, 24, 48 y 72 horas. A las 6 horas no existieron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre tratamientos; a las 12 horas el T2 desplazó mayor ($P < 0.05$) cantidad de solución de NaOH, en relación con el T3; a las 24 horas el T2 desplazó mayor ($P < 0.05$) cantidad de solución de NaOH, en relación con el T1, T3 y T4; a las 48 horas el volumen desplazado por T1, T3 y T4 fue menor ($P < 0.05$), al volumen desplazado por el T2; a las 72 horas el volumen desplazado por T2 es superior ($P < 0.05$) al T3.

Cuadro 4. Desplazamiento (ml) acumulado de gas metano en trampas de NaOH.

Tratamientos	Tiempo de incubación (h)				
	6	12	24	48	72
T1	8.28	12.15 ^{ab}	15.62 ^b	18.98 ^b	20.95 ^{ab}
T2	14.27	22.83 ^a	27.73 ^a	31.60 ^a	32.12 ^a
T3	7.13	11.34 ^b	12.43 ^b	13.57 ^b	15.06 ^b
T4	8.57	11.77 ^{ab}	14.73 ^b	18.47 ^b	19.90 ^{ab}
T5	6.97	13.20 ^{ab}	18.23 ^{ab}	23.43 ^{ab}	26.43 ^{ab}
Media	9.04	14.26	17.75	21.21	22.89
EEM	2.234	2.448	2.540	2.656	2.751

^{a, b} medias con diferentes literales en una misma columna son diferentes ($P < 0.05$).

EEM; Error estándar de la media.

T1: 100% forraje King grass CT-115 (control).

T2: 99.5% forraje King grass CT-115 más 0.5% de aceite de pescado.

T3: 95% forraje King grass CT-115 más 5% de aceite de pescado.

T4: 70% forraje King grass CT-115 más 30% de *Leucaena leucocephala*.

T5: 60% forraje King grass CT-115 más 40% de alimento concentrado.

El resultado obtenido en el tratamiento 1 del presente experimento, a las 24 horas de fermentación mostro resultados similares con González *et al.* (2007), quienes reportan en es misma hora un volumen de 14.72 mL de gas metano para una

muestra de pasto King grass CT-115; también coinciden con los resultados obtenidos por Rodríguez (2010), al utilizar una dieta de iguales características, reporta a las 24 h de fermentación, un desplazamiento de 16.34 mL de gas metano. En contraste, Galindo *et al.* (2003a), en la fermentación *in vitro* de una dieta de 100% de pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*), a las 24 horas obtuvo un volumen de 35.00 mL de gas metano, lo cual podría ser explicado por la baja calidad del forraje que influyó en una mayor producción de metano.

En el T2 al adicionar 0.5% de aceite de pescado a la dieta, presentó el mayor volumen desplazado en las trampas a las 72 h; esto podría explicarse por la baja concentración de aceite de pescado adicionado, el cual aparentemente funciona como fuente de energía para las bacterias sin ocasionar efectos tóxicos y además potencializó la producción de metano; sin embargo, se observó en el T3 una disminución en el volumen desplazado, esta diferencia en la producción de metano coincide con resultados reportados por Dong *et al.* (1997), al adicionar 10% de aceite de hígado de bacalao en una dieta de 100% de heno, observaron una disminución en la producción de metano; por otra parte, Machmüller & Kreuzer (1998), mencionan que al incrementar el porcentaje de aceite de coco en una dieta para rumiantes la producción de metano disminuye. La disminución observada en el desplazamiento de gas metano en el T3 del presente estudio, tal vez pueda ser explicado por la presencia del ácido eicosapentaenoico (EPA; 20:5) y ácido docosahexaenoico (DHA; 22:6) presentes en el aceite de pescado (Dohme *et al.* 2003), a altos niveles de inclusión se ha demostrado disminución del 50 % en la lipólisis; además de producir toxicidad sobre bacterias celulolíticas y metanogénicas, debido a la presencia de dobles enlaces que causan daño a la estructura de los lípidos de la pared bacteriana, provocando con ello una menor producción de gas metano (Maia *et al.* 2007).

En el T4 de este estudio, el volumen desplazado a las 24 horas produjo resultados similares descritos por Ramírez (2010), quien reporta un volumen de gas metano de 16.7 mL en una dieta de 70% de pasto King grass CT-115 y 30% de *Leucaena leucocephala*, sin encontrar diferencias ($P < 0.05$) con una dieta con el 100% de pasto.

El volumen desplazado en el T5 no presento diferencias significativas ($P < 0.05$) con respecto al T1, Bonilla-Cárdenas *et al.* (2012) reportan que no encontraron diferencias en la producción de metano entre tratamientos; sin embargo, al ajustar la producción de metano por gramo de MS degradada en rumen, observaron diferencias entre los tratamientos, por lo cual este valor podría disminuir si se tomara en cuenta la MS degradada durante el proceso de fermentación.

Desplazamiento de biogás total (CO₂ y CH₄) en las trampas de solución salina ácida

Cuadro 5. Desplazamiento (ml) acumulado de biogás total en trampas de solución ácida.

Tratamientos	Tiempo de incubación (h)				
	6	12	24	48	72
T1	36.97	69.07	86.47	90.95	91.65
T2	20.00	44.83	55.27	60.07	62.47
T3	48.85	81.12	98.02	102.05	102.97
T4	29.67	60.13	73.88	75.43	76.02
T5	59.30	81.00	92.13	93.80	94.42
Media	38.96	67.23	81.15	84.46	85.50
EEM	8.575	11.320	14.031	14.517	14.983

EEM; Error estándar de la media.

T1: 100% forraje King grass CT-115 (control).

T2: 99.5% forraje King grass CT-115 más 0.5% de aceite de pescado.

T3: 95% forraje King grass CT-115 más 5% de aceite de pescado.

T4: 70% forraje King grass CT-115 más 30% de *Leucaena leucocephala*.

T5: 60% forraje King grass CT-115 más 40% de alimento concentrado.

En el Cuadro 5 se puede observar el desplazamiento en las trampas de solución salina ácida, la cual determinó la producción de biogás, que comprendió el bióxido de carbono más metano, cuyos valores no presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre tratamientos a los diferentes tiempos.

Los resultados obtenidos por Sosa *et al.* (2010) durante la fermentación *in vitro* de una dieta con 100% de pasto King Grass CT-115, indicaron una producción de gas

total a las 24 horas de 69.68 mL, lo cual contrasta con los resultados de este estudio ya que, a 24 h se encontró un volumen de 86.47 mL de biogás total.

Por otra parte, Rodríguez (2010), encontró diferencias en la producción de gas total, entre una dieta de 100% de forraje y una dieta con 30% de *L. leucocephala* y 70% de pasto, lo cual también difieren con los datos observados en este experimento.

Las diferencias en la producción de biogás total con respecto a otros estudios, pueden deberse al tipo de técnica de medición utilizada; al respecto, Getachew *et al.* (1998), mencionan que el uso de transductores de presión y jeringas volumétricas tienen como desventaja, que la alta presión interna acumulada en el interior de los biodigestores altera la solubilidad de los gases en la solución acuosa, generando de esta forma mediciones erróneas (Baez 2010). En este experimento, las trampas de biogás evitan la acumulación de biogás en el biodigestor y por tanto, la presión atmosférica se mantiene muy similar a la presión atmosférica ambiental que es aproximadamente de una atmósfera de presión, por tanto, no se tiene problema con un aumento de la presión dentro de los biodigestores y los resultados son más confiables.

La producción de gas es generalmente proporcional con la tasa de fermentación de la partícula (Owens & Goetsch 1988), por lo que se esperaba que la producción de gas en el T5 fuera menor al resto de los tratamientos.

Digestibilidad *in vitro* de la materia seca y pH

El valor de pH (Cuadro 6) en T2 fue mayor ($P < 0.05$) al resto de los demás tratamientos; a su vez el pH del T3 fue superior ($P < 0.05$) a T1, T4 y T5, con valores de 6.55, 6.24, 6.12, 6.16, 6.09 respectivamente. En los valores de DIVMS % no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los distintos tratamientos, el valor promedio fue de 49.55 (Cuadro 6).

Cuadro 6. Digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) y pH.

Tratamientos	pH	DIVMS %
T1	6.12 ^c	49.32
T2	6.55 ^a	49.23
T3	6.24 ^b	47.14
T4	6.16 ^c	49.05
T5	6.09 ^c	52.99
Media	6.23	49.55
EEM	0.016	1.365

a, b, c medias con diferentes literales en una misma columna son diferentes (P<0.05).

EEM; Error estándar de la media.

T1: 100% forraje King grass CT-115 (control).

T2: 99.5% forraje King grass CT-115 más 0.5% de aceite de pescado.

T3: 95% forraje King grass CT-115 más 5% de aceite de pescado.

T4: 70% forraje King grass CT-115 más 30% de *Leucaena leucocephala*.

T5: 60% forraje King grass CT-115 más 40% de alimento concentrado.

El valor de pH promedio entre tratamientos fue de 6.23, lo cual indica que se mantuvieron las condiciones adecuadas para la actividad de las bacterias celulolíticas y metanogénicas (Yokoyama & Johnson 1988). Sin embargo, en el T5 el pH del medio mostro un valor de 6.09 y es probable que la actividad de las bacterias celulolíticas fue afectado negativamente, Rusell & Wilson (1996), observaron una disminución en la celulolisis cuando el pH descendió por debajo de 6. Diversos mecanismos pueden explicar el efecto del pH sobre la población de bacterias celulolíticas; Shriver *et al.* (1986) y Hoover (1986), observaron que disminuciones moderadas del pH, debilitaban la adhesión de las bacterias celulolíticas a las estructuras vegetales, disminuyendo considerablemente la degradación y arrastrando las bacterias hacia al abomaso. Por otro lado Russell & Dombrowski (1980), atribuyeron la baja concentración de las bacterias celulolíticas en condiciones de pH desfavorables, a un aumento en los gastos de mantenimiento y daño en la membrana celular.

La DIVMS (%) de la dieta de 100% de forraje King grass CT-115, fue inferior a los resultados de otras investigaciones; Silva (2010) con condiciones similares edafoclimáticas e igual edad de corte, reportó un valor de DIVMS de 58.6 %; por otra parte, Rodríguez (2010) con condiciones similares, reportó un valor de DIVMS de 40.03 %. Los resultados de T1 de este estudio son similares a los obtenidos por Valenciaga *et al.* (2001), quienes obtuvieron valores de DIVMS de 50.14 % con una edad de corte de 65 días. Valenciaga *et al.* (2009), menciona que el clon King Grass CT-115 presenta mayor contenido de carbohidratos estructurales y desarrollo de la pared celular a medida que avanza su edad, por lo que en el presente estudio se esperaría una disminución en la digestibilidad del forraje.

La DIVMS del King Grass CT-115 utilizado durante este experimento se considera relativamente alta para una gramínea tropical, al considerar su composición nutrimental (Herrera 1997), este podría ser uno de los factores por los cuales la producción de metano suele ser menor comparado con otros forrajes tropicales.

Los resultados obtenidos en DIVMS en este ensayo en la adición de 0.5 % de aceite de pescado (T2), así como la adición de 5.0 % de aceite de pescado (T3) son similares a los obtenidos por Dong *et al.* (1997), quienes reportan que no se presentaron diferencias en la DIVMS al agregar 10 % de aceite de hígado de bacalao, resultados similares fueron reportados por Osborne *et al.* (2008), quienes agregaron 1% de aceite de pescado en el agua de bebida y no encontraron diferencias en la DIVMS de la dieta. Sin embargo, en algunas investigaciones se han reportado efectos negativos sobre la DIVMS al adicionar bajos niveles de lípidos suplementarios (< 3%). Vafa *et al.* (2009), al adicionar 2 % de aceite de pescado a la dieta, obtuvo una disminución en la DIVMS; en contraste, no encontró efecto al administrar 1 % de aceite de pescado combinado con 1 % de aceite de colza. Machmüller & Kreuzer (1998) observaron que la digestibilidad se redujo debido a la incorporación de 2.5 % de grasa extra en forma de semilla de girasol, pero no se afectó por la inclusión de la misma cantidad de grasa en forma de aceite de coco, semilla de colza o semilla de lino. Lo cual hace suponer que el efecto en la digestibilidad de la dieta depende del grado de insaturación del aceite, la forma de presentación (semillas oleaginosas vs aceites), tipo de procesado de

las semillas (enteras vs extrusionadas) (Martínez 2011), así como la proporción y tipo de forraje utilizado (Sackmann *et al.* 2003).

Los resultados obtenidos en el presente experimento sugieren que al adicionar mayor cantidad de aceite de pescado, la DIVMS tiende a disminuir, lo cual se explica, porque a medida que se aumenta el nivel de aceite en la dieta se reduce la digestibilidad de la fibra (Doreau & Chilliard 1997); debido a que el aceite recubre las partículas de forraje, causando así una menor adhesión por parte de las bacterias celulolíticas y con ello disminuir la degradación de la fibra (Yokoyama & Johnson 1988).

Los resultados obtenidos en el T4 de este experimento, donde se incluyó 30% de *L. leucocephala* y 70% de forraje King Grass CT-115, difieren de lo reportado por otras investigaciones, en donde se ha encontrado que la adición de *L. leucocephala* mejora la digestibilidad de forrajes de mala calidad (Vergara-López *et al.* 2006, Galindo *et al.* 2007); por su parte Rodríguez (2010), al utilizar una dieta en las mismas proporciones, observó un incremento en la digestibilidad *in vitro* al adicionar esta leguminosa; en otro estudio similar Vergara-Lopez *et al.* (2006), reporta un aumento en la digestibilidad *in vitro* al incluir *L. leucocephala* en la dieta. Al respecto Razz *et al.* (2006), mencionan que esta leguminosa posee paredes celulares rápidamente degradables, en este mismo sentido Ramírez *et al.* (2007), mencionan que elevadas cantidades de proteína, permiten incrementar la fermentación ruminal, resultando en un incremento de la digestibilidad; explicando de esta forma la mejora en la digestibilidad por parte de esta leguminosa.

Las diferencias existentes en la digestibilidad de *L. leucocephala* en las distintas investigaciones, se deben a la variedad en estudio, al contenido de taninos, así como a la época del año (Sánchez *et al.* 2008), al respecto García *et al.* 2008, reportan diferencias en la digestibilidad entre variedades de la misma especie, debidas principalmente al contenido de proteína, los componentes de la pared celular, y metabolitos secundarios; en contraste La O *et al.* (2003) mencionan que al no existir diferencias en la digestibilidad entre ecotipos de esta especie, si se presentan diferencias en el contenido de paredes celulares las cuales están compuestas por lignina, hemicelulosa y celulosa entre los ecotipos en distintas

épocas del año, mostrando un mayor contenido de paredes celulares en la época con menor precipitación.

Papi *et al.* (2011), mencionan al respecto que el incremento de la proporción de alimento concentrado aumenta la digestibilidad de la dieta, efecto similar fue reportado por Salinas-Chavira *et al.* 2011, quienes al disminuir la cantidad de fibra en la dieta encontraron que aumentaba la digestibilidad; sin embargo la alta digestibilidad en estas dietas podría generar un pH ácido en rumen, causando problemas de acidosis ruminal, por lo que resulta necesario incluir un adecuado nivel de forraje que permita mantener el pH en condiciones óptimas para la fermentación ruminal.

Las diferencias entre los resultados obtenidos en la DIVMS de la presente investigación con respecto a las investigaciones anteriormente citadas pueden deberse a la metodología utilizada, Sanginés (2001), menciona al respecto que la acumulación de gases puede inhibir el proceso de fermentación; tomando en cuenta que la mayoría de los estudios se basan en la metodología propuesta por Theodorou *et al.* (1994), en donde la presión acumulada no se libera, se podría afectar negativamente a la fermentación microbiana (Martínez 2009).

Las condiciones de manejo de los animales donantes, su dieta y el momento de recogida del inóculo pueden afectar los resultados; al respecto Bochi-Brum *et al.* (1999), mencionan que la procedencia del inóculo ruminal se considera la mayor fuente de variación en la determinación de la digestibilidad *in vitro*. En este sentido, la ración ingerida por los animales empleados como donantes ha sido señalada como uno de los principales factores que afectan al número y actividad de los microorganismos ruminales y que, consecuentemente, pueden afectar los valores de la DIVMS de los alimentos (Weiss, 1994).

No obstante, que la evaluación del método para la determinación de la DIVMS no fue un objetivo, los resultados indican que el método utilizado puede ser una alternativa para el cálculo de las digestibilidades *in vitro* de forrajes tropicales.

Concentración de bacterias totales

La concentración inicial de bacterias totales en todos los tratamientos fue de 9.25×10^9 células mL^{-1} . A las 6 horas se observó una mayor ($P < 0.05$) concentración de bacterias en el T2, siendo de 28.33×10^9 células mL^{-1} ; en comparación con el T1 y T4; pero similar ($P > 0.05$) a T3 y T5 (Cuadro 7). A las 12 horas la concentración de bacterias fue similar ($P > 0.05$) en todos los tratamientos. A las 24 horas se observó una mayor concentración ($P < 0.05$) en T2, en relación a T3, T4 y T5, la menor ($P < 0.05$) concentración se presentó en el T5. A las 48 horas el T2 presentó una mayor ($P < 0.05$) concentración en comparación a los demás tratamientos, presentándose la menor ($P < 0.05$) concentración en T4 y T5. A las 72 horas se observó una mayor concentración de bacterias en T1 y T2, que fueron superiores ($P < 0.05$) al T3, T4 y T5.

Cuadro 7. Concentración de bacterias totales a diferentes tiempos (10^9 mL^{-1}).

Tratamiento	Tiempo de incubación				
	6	12	24	48	72
T1	13.75 ^c	28.75	27.50 ^{ab}	24.25 ^b	24.17 ^a
T2	28.33 ^a	24.75	42.08 ^a	37.17 ^a	31.75 ^a
T3	21.50 ^{ab}	28.08	19.67 ^{bc}	17.71 ^b	15.75 ^b
T4	15.67 ^{bc}	27.42	17.25 ^{bc}	15.17 ^c	14.75 ^b
T5	19.50 ^{abc}	23.92	14.00 ^c	12.75 ^c	11.50 ^b
Media	19.82	26.58	24.10	21.41	19.58
EEM	2.1×10^9	1.7×10^9	3.4×10^9	1.7×10^9	1.8×10^9

a, b, c; medias con diferentes literales en una misma columna son diferentes ($P < 0.05$).

EEM; Error estándar de la media.

T1: 100% forraje King grass CT-115 (control).

T2: 99.5% forraje King grass CT-115 más 0.5% de aceite de pescado.

T3: 95% forraje King grass CT-115 más 5% de aceite de pescado.

T4: 70% forraje King grass CT-115 más 30% de *Leucaena leucocephala*.

T5: 60% forraje King grass CT-115 más 40% de alimento concentrado.

En todos los tratamientos evaluados, la concentración de bacterias totales estimada, se mantuvo en 10^9 células por mL del medio de cultivo, encontrándose dentro del rango normal (Yokoyama & Johnson 1988). Al adicionar 0.5% de aceite de pescado se presentó un aumento en el número de bacterias totales siendo similar únicamente al T1, este resultado coincide con los datos reportados por Dong *et al.* (1997), quienes al adicionar 10 % de aceite de hígado de bacalao a una dieta a base de heno, encontraron una mayor concentración de bacterias totales, aunque no encontraron diferencias significativas. De manera similar Galindo *et al.* (2009), al adicionar 7.5% de aceite de coco, no encontraron diferencias en la concentración de bacterias totales, sin embargo se puede observar que la mayor concentración de estas se presentó al adicionar aceite de coco; en este mismo sentido Machmüller & Kreuzer (1998), al adicionar el 7% de aceite de coco observaron un incremento en el número de bacterias totales. Lo anterior puede ser explicado por el contenido de ácidos grasos poliinsaturados (Martínez *et al.* 2010), los cuales son rápidamente hidrogenados en el rumen, al ser suministrado el aceite de coco en pequeñas cantidades puede potencializar el crecimiento de las bacterias celulolíticas.

Un efecto distinto se observó en el tratamiento 3 al adicionar 5% de aceite de pescado, en donde el número de bacterias totales a las 72 h disminuyó, en relación al T1, lo cual podría ser consecuencia del contenido de ácidos grasos contenidos del aceite de pescado. Dohme *et al.* (2003), observaron altos contenidos de EPA y DHA en aceites de pescado, los cuales disminuyen la lipólisis y por consecuencia la hidrogenación, provocando un efecto tóxico, al encontrarse una mayor cantidad de ácidos grasos insaturados en el medio; dentro de los efectos tóxicos que afectan a las bacterias Maczulak *et al.* (1981), mencionan que el mecanismo de acción se encuentra relacionado a la adsorción del ácido oleico sobre la superficie bacteriana impidiendo el ingreso de nutrientes a la célula.

En numerosas investigaciones al adicionar *L. leucocephala* se ha reportado una disminución en el número de bacterias totales, Galindo *et al.* (2003b), al adicionar

L. leucocephala en la misma proporción que el presente estudio, reportan una disminución en el número de bacterias totales en comparación con una dieta de 100% de forraje, resultado similar al reportado por Galindo *et al.* (2008), quienes encontraron una disminución lineal conforme al aumento de la proporción de esta leguminosa en la dieta, presentándose el menor número de bacterias totales al incorporar el 30% de esta leguminosa efecto similar al encontrado en la presente investigación.

La disminución en la concentración de bacterias totales en el T5, puede ser explicada por el descenso en pH del medio, que aun que no llego a valores menores de 6.0, Lana *et al.* (1998) mencionan al respecto que el pH es el parámetro ambiental más importante que afecta la población microbiana.

Concentración de bacterias celulolíticas

En la concentración de bacterias celulolíticas (Cuadro 8) no se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$).

Cuadro 8. Concentración de bacterias celulolíticas (10^6 ml^{-1}).

Tratamiento	Concentración
T1	7.93
T2	29.66
T3	4.96
T4	5.66
T5	3.78
Media	10.40
EEM	0.35

EEM; Error estándar de la media.

T1: 100% forraje King grass CT-115 (control).

T2: 99.5% forraje King grass CT-115 más 0.5% de aceite de pescado.

T3: 95% forraje King grass CT-115 más 5% de aceite de pescado.

T4: 70% forraje King grass CT-115 más 30% de *Leucaena leucocephala*.

T5: 60% forraje King grass CT-115 más 40% de alimento concentrado.

En general, la concentración de bacterias celulolíticas de todos los tratamientos, se encuentra dentro de un rango óptimo para medios de cultivo anaerobios (Yokoyama & Johnson 1988).

El resultado obtenido en el T1, el número de bacterias celulolíticas fue de $7.93 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$; resultado similar a lo reportado por Galindo *et al.* (2003b), quienes observaron una concentración de bacterias celulolíticas de $2.69 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$, al fermentar una dieta de 100% de pasto estrella (*Cynodon nlenfuensis*), también coinciden con los resultados obtenidos por Galindo *et al.* (2007), quienes reportan una concentración de $2.93 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$ para bacterias celulolíticas.

Numerosas investigaciones hacen referencia la disminución en la población de bacterias celulolíticas al incorporar aceites a la dieta (Maczulak *et al.* 1981, Broudiscou *et al.* (1994), siendo las principales causas, el aumento del grado de insaturación y la presencia de grupos carboxilos libres (Casals 1992, Jenkins 1993), sin embargo Chalupa *et al.* (1984), mencionan que concentraciones de 3-5% de aceite pueden ser toleradas por los microorganismos ruminales, en este mismo sentido, Dong *et al.* (1997), mencionan al respecto que el efecto de los aceites en la población de bacterias celulolíticas depende mas de las propiedades individuales de los acidos grasos que del grado de insaturación. Smith y Harris (1993), observaro que un alto contenido de forraje en la dieta disminuyen el efecto negativo de las fuentes de grasas sobre las bacterias ruminales, lo anterior podría explicar el por que la concentración de bacterias celulolíticas no se vio afectada en la presente investigación.

El resultado del T4 de la presente investigacion concuerda con lo reportado por Galindo *et al.* (2007) y Galindo *et al.* (2008), quienes no observaron diferencias en el número de bacterias celulolíticas al adicionar 30 % de *L. leucocephala* en una dieta a base de pasto estrella.

En dietas con altos contenidos de concentrado, en donde la velocidad de digestión y producción de acidos es alta, se observa una reducción en la población de bacterias celulolíticas (Van Soest 1982), sin embargo muchas bacterias aminolíticas (cepas de *Fibrobacter succinogenes*, *Prevotella ruminicola*, *Butirivibrio*

fibrisolvens) son también celulolíticas (Hungate 1966); por lo que las poblaciones celulolíticas pueden resistir fluctuaciones moderadas en el pH con una leve disminución de su actividad, (Casamilga et al 2002, Hoover 1986), lo cual podría explicar el por que no se encontraron diferencias en el T5.

Concentración de protozoarios

La concentración inicial de protozoarios de todos los tratamientos fue de 26.33×10^6 células mL⁻¹; entre las 6 y 48 horas no se encontraron diferencias significativas (P>0.05) entre tratamientos (Cuadro 9); a las 72 horas se observó una mayor concentración (P<0.05) en el T5 y T3, en relación al T1.

Cuadro 9. Concentración de protozoarios a diferentes tiempos (10⁶ ml⁻¹).

Tratamiento	Tiempo de incubación				
	6	12	24	48	72
T1	10.00	8.33	8.33	8.33	0.00 ^b
T2	18.33	16.66	10.00	5.00	1.66 ^{ab}
T3	11.67	16.66	11.67	8.33	5.00 ^a
T4	16.66	15.00	25.00	6.66	1.66 ^{ab}
T5	8.33	6.66	20.00	15.00	10.00 ^a
Media	13.33	12.67	15.00	8.67	3.67
EEM	3.6×10^6	4.1×10^6	5.4×10^6	3.4×10^6	1.6×10^6

^{a, b}; medias con diferentes literales en una misma columna son diferentes (P<0.05).

EEM; Error estándar de la media.

T1: 100% forraje King grass CT-115 (control).

T2: 99.5% forraje King grass CT-115 más 0.5% de aceite de pescado.

T3: 95% forraje King grass CT-115 más 5% de aceite de pescado.

T4: 70% forraje King grass CT-115 más 30% de *Leucaena leucocephala*.

T5: 60% forraje King grass CT-115 más 40% de alimento concentrado.

El resultado obtenido en el T3 difiere de lo reportado por otras investigaciones, en donde al adicionar aceites a la dieta, se observó una disminución en el número de protozoarios, Machmüller & Kreuzer (1998), observaron una disminución en el número de protozoarios al adicionar 7% de aceite de coco. Por su parte, Yang et

al. (2009), compararon la inclusión de 4% de aceite de soja, 4% de aceite de lino y 4% de una mezcla de ambos en cantidades iguales en la dieta de vacas, y observaron una disminución de los protozoarios en las dietas con aceite en relación a una dieta control, sin embargo el papel de los protozoarios en la biohidrogenación de las grasas aun no está claro, al respecto Zapata *et al.* (2012) mencionan que la participación de los protozoarios en la biohidrogenación está orientada primeramente en la lipólisis y posteriormente realizan la isomerización de algunos compuestos, los entodinomorfos son los encargados de estas funciones. Pruebas realizadas con ácidos poliinsaturados mostraron la importancia de los protozoos, al ser capaces de degradar entre el 50 y 85% del EPA y DHA, ácidos grasos altamente tóxicos para las bacterias, permitiendo de esta manera su viabilidad y lo cual podría explicar el aumento de protozoos en el presente estudio. Martínez *et al.* (2010) menciona al respecto que el efecto de las fuentes de grasa no protegidas sobre los microorganismos ruminales depende tanto del grado de insaturación como de la forma de presentación.

La concentración de protozoarios en el T4 difiere de lo reportado por Galindo *et al.* (2007) y Galindo *et al.* (2008), en donde se observó una disminución significativa con respecto a una dieta de 100% de forraje. Recientemente se ha observado variaciones entre ecotipos de la misma especie en el contenido de taninos, digestibilidad, contenido nutricional; al respecto Galindo *et al.* (2003b), observaron un aumento en la concentración de protozoarios, lo cual fue atribuido a factores relacionados con la leguminosa, como el estado vegetativo, edad, fenología, época del año; En otros estudios se ha demostrado que cuando los taninos de algunas especies tropicales presentan poca capacidad para precipitar proteínas, resultan inocuos para el sistema digestivo de los animales (Makkar & Becker 1998).

La incorporación de alimento concentrado en un 40% de la dieta, presento un aumento en la concentración de protozoarios. Yokoyama & Johnson (1988), mencionan que en dietas con mayor cantidad de concentrado, aumenta la concentración de protozoarios totales; no obstante, cuando la inclusión de

concentrado se incrementa a más de 70 - 80% de la MS, y el valor de pH cae por debajo de 6.0, la concentración de protozoarios disminuye drásticamente (Dennis *et al.* 1983). Se ha reportado que el incremento en la población de protozoarios evita los cambios drásticos en el pH, debido a que tienen un efecto depredador sobre la población de bacterias totales, celulolíticas y amilolíticas del rumen (Mendoza *et al.* 1993), esto explicaría el descenso de la concentración de bacterias totales, observadas en el presente estudio.

Concentración de AGV en los tratamientos

La producción total de AGV fue mayor ($P < 0.05$) en T2, en comparación con T1, T3 y T4; pero similar a T5 (Cuadro 10). La concentración de acetato fue mayor ($P < 0.05$) en T2, en comparación a T1, T3 y T5; pero similar ($P > 0.05$) a T4; presentándose la menor concentración ($P < 0.05$) en el T5. La concentración de ácido propiónico en T5 fue mayor ($P < 0.05$) al resto de los tratamientos, en tanto que, la menor concentración ($P < 0.05$) fue producida en el T2. La concentración de butirato fue mayor en el T2, presentándose la menor concentración en el T5. La relación acetato:propionato fue mayor ($P < 0.05$) en T2, observándose la menor ($P < 0.05$) en el T5.

Los resultados de producción de AGV totales, a excepción del T2, se encuentran dentro del rango normal de 80-120 mol L⁻¹, reportado para rumiantes (Fahey & Berger 1988). Park *et al.* (1994) reportan que la concentración de AGV incrementan conforme incrementa la digestibilidad de los forrajes; lo cual podría explicar las diferencias entre el resultado del T1 y las concentraciones de AGV reportadas para forrajes de menor calidad, Galindo *et al.* (2003b) reportan para pasto estrella un valor de 98.81 mmol L⁻¹. Galindo *et al.* (2003a) reportan para el mismo pasto proporciones de acetato de 67.37%, propionato de 19.93% y butirato de 9.5%, resultados que se encuentran en el rango normal al suministrar dietas a base de forrajes, sin embargo el resultado observado en el T1 presenta una menor producción de acetato de 57.32% y superior en el caso del propionato de 33.48%, lo cual podría ser a causa de la calidad del forraje. Al respecto Relling & Mattioli

(2003), mencionan que cuando lo que predomina es contenido celular de alta disponibilidad, aunque el animal se alimente de forraje el aporte de fibra es bajo y las condiciones ruminales resultantes serán más semejantes a dietas suplementadas con almidón, con menor pH y mayor producción de AGV, en particular de propionato.

Cuadro 10. Concentración AGV en los tratamientos después de 72 h de incubación.

Tratamiento	Total AGV mol L ⁻¹	Acetato %	Propionato %	Butirato %	Acetato:Propionato
T1	115.40 ^b	57.32 ^b	33.48 ^b	9.20 ^b	1.71 ^b
T2	125.70 ^a	61.21 ^a	25.62 ^c	13.17 ^a	2.39 ^a
T3	114.00 ^b	57.12 ^b	34.03 ^b	8.85 ^c	1.68 ^b
T4	110.97 ^b	59.16 ^{ab}	31.99 ^b	8.85 ^c	1.85 ^b
T5	119.94 ^{ab}	54.15 ^c	37.83 ^a	8.02 ^d	1.43 ^c
Media	117.20	57.79	32.59	9.62	1.81
EEM	2.145	0.518	0.538	0.059	0.042

a, b, c, d; medias con diferentes literales en una misma columna son diferentes (P<0.05).

EEM; Error estándar de la media.

T1: 100% forraje King grass CT-115 (control).

T2: 99.5% forraje King grass CT-115 más 0.5% de aceite de pescado.

T3: 95% forraje King grass CT-115 más 5% de aceite de pescado.

T4: 70% forraje King grass CT-115 más 30% de *Leucaena leucocephala*.

T5: 60% forraje King grass CT-115 más 40% de alimento concentrado.

En este estudio al incorporar aceite de pescado, se observó en T2 un aumento en la cantidad de AGV totales, que fue acompañada con una mayor producción de acetato y butirato, menor producción de propionato, y un aumento en la relación acetato:propionato, con relación a los demás tratamientos. Martínez (2011), menciona al respecto que la inclusión de fuentes de grasa no protegidas en la dieta modifica las concentraciones y las proporciones molares de los AGV, el efecto de estas fuentes de lípidos sobre los AGV son variables. Por otra parte, Beauchemin *et al.* (2007 no hallaron ningún efecto en la concentración ruminal de

AGV totales y en las concentraciones de acetato, propionato y butirato al incluir alguna fuente de grasa en la dieta; en otras investigaciones no se ha demostrado un efecto de las grasas en las concentraciones totales de AGV y la relación acetato:propionato (Avila *et al.* 2000, Ueda *et al.* 2003, Montgomery *et al.* 2008), sin embargo Mohammed *et al.* (2004), reportan un incremento en la concentración de AGV totales al adicionar aceite de caballo de mar, incrementando la concentración de propionato y una reducción en las concentraciones de acetato y butirato.

El incremento en las concentraciones de acetato y butirato podría ser explicada por el aumento en la concentración de bacterias celulolíticas, aun cuando el aumento no fue significativo; Owens & Goetsch (1988), mencionan que una intensa digestión de celulosa y fermentación de los carbohidratos solubles por las bacterias sacarolíticas, provoca una elevada producción de acetato.

Dong *et al.* (1997), no encontraron diferencias al adicionar 10 % de aceite de pescado en la concentración de AGV totales, acetato y propionato, encontrando diferencias únicamente en la concentración de butirato; resultados similares fueron obtenidos en el T3 del presente estudio, donde solo se encontraron diferencias en la concentración de butirato; la relación acetato:propionato presentó una ligera disminución con relación al T1; Doreau & Chilliard (1997), mencionan que la suplementación con lípidos en la dieta produce disminución en la digestión de la fibra, con aumento en la concentración de ácido propiónico y disminución de los ácidos acético y butírico, los efectos mencionados dependen de la cantidad de grasa añadida, se han observado efectos negativos al adicionar menos del 5% de grasa en la dieta; también influye la fuente de lípidos y la naturaleza de la dieta basal.

Existe poca información acerca del efecto de la incorporación de *L. leucocephala*, sobre la producción de AGV. En el presente estudio no se encontraron diferencias en la concentración de AGV totales, en la proporción de propionato y en la relación acetato:propionato; sin embargo se puede observar una disminución en la proporción de butirato y un aumento en la producción de acetato; con respecto al T1. Galindo *et al.* (2007) no encontraron diferencias en las concentraciones de

acetato, propionato y butirato, al asociar el 30% de *L. leucocephala* en un pastizal. Estrada-liévano *et al.* (2009), reportaron un incremento en la producción de propionato y butirato al incorporar *L. leucocephala* a una dieta con pasto estrella. Por su parte Rodríguez (2010), al utilizar un dieta en las mismas proporciones a las de este estudio, no encontró diferencias significativas en la producción de AGV totales, ni en las proporciones de acetato, propionato y butirato así como en la relación acetato:propionato, con respecto a un dieta con 100% de forraje King Grass.

Rodríguez (2010), menciona que los efectos de las leguminosas arbustivas depende de la naturaleza química de los taninos (estructura, grado de polimerización y reactividad) y de su concentración en el alimento, de esta forma el forraje de leguminosas con cantidades moderadas o altas de taninos tienden a tener menores relaciones acético:propiónico que aquellas con bajos contenidos de taninos (Mbugua *et al.* 2008). En este mismo sentido García *et al.* (2008), mencionan que existe una gran variación en el contenido de taninos entre ecotipos de *L. leucocephala*.

En el T5, no se encontraron diferencias en la concentración de AGV totales, sin embargo, la concentración de acetato, fue la menor; mientras que la proporción de propionato fue superior a los demás tratamientos; Bedolla (2010), menciona respecto que cuando la adición de granos no supera el 30 a 35 % del total de materia seca consumida, existe un efecto positivo en la concentración total de AGV, además de que favorece la digestión de la celulosa contenida en la pared celular, sin alterar el pH ni las características productivas del rumen. Por otra parte, Mc Geough *et al.* (2010), observaron una disminución en la concentración de acetato, el cual disminuyó al aumentar el alimento concentrado en la dieta. Beauchin *et al.* (2005), reportan un aumento en la producción de AGV totales y propionato, así como una disminución en la concentración de acetato, en dietas con altos contenidos de concentrado en relación a un dieta con alto contenido de forraje. Fahey & Berger (1988), mencionan que la tendencia en la producción de propionato se presenta al reducir la proporción forraje:concentrado, sin embargo los resultados varían dependiendo de la composición del alimento. Estos

resultados podrían indicar una reducción en la producción de metano, al respecto Mendoza-Martinez *et al.* 2008 mencionan que la formación de propionato conserva hidrógeno, lo cual reduce la producción de CH₄.

Producción de CO₂ y CH₄ en los tratamientos

La producción de CO₂ (Cuadro 11) fue mayor (P<0.05) en el T3, en comparación con los demás tratamientos; la concentración de CH₄ (Cuadro 11) fue mayor (P<0.05) en el T2 en relación a los demás tratamientos, observándose la menor concentración (P<0.05) en el T5, la cual fue similar al T3, pero inferior a la concentración del T1, T2 y T4. Al ajustar la concentración de CH₄ con los valores de la digestibilidad *in vitro*, se determinó que la concentración de CH₄ fue mayor (P<0.05) en el T2, encontrándose la menor (P<0.05) cantidad en el T5.

Cuadro 11. Producción de CO₂ y CH₄ (mmol) en los tratamientos.

Tratamiento	Concentración de CO ₂ (mmol)	Concentración de CH ₄ (mmol)	Concentración de metano mmol g ⁻¹ de MSD
T1	58.65 ^b	28.69 ^b	58.17 ^b
T2	57.40 ^b	38.70 ^a	78.61 ^a
T3	71.35 ^a	27.92 ^{bc}	59.31 ^b
T4	56.43 ^b	28.86 ^b	58.88 ^b
T5	58.24 ^b	25.94 ^c	49.17 ^c
Media	60.41	30.02	60.83
EEM	1.080	0.589	1.806

a, b, c; medias con diferentes literales en una misma columna son diferentes (P<0.05).

EEM; Error estándar de la media.

T1: 100% forraje King grass CT-115 (control).

T2: 99.5% forraje King grass CT-115 más 0.5% de aceite de pescado.

T3: 95% forraje King grass CT-115 más 5% de aceite de pescado.

T4: 70% forraje King grass CT-115 más 30% de *Leucaena leucocephala*.

T5: 60% forraje King grass CT-115 más 40% de alimento concentrado.

La mayor producción de metano se observó al adicionar 0.5% de aceite de pescado (T2), lo cual contrasta con otras investigaciones; Beauchemin *et al.* (2007), reportan una disminución del 17% de la producción de metano al adicionar aceite de girasol, sebo y semillas de girasol, atribuyéndolo a una disminución en la digestibilidad de la fibra. Machmüller & Kreuzer (1998) observaron una disminución en la producción de metano al adicionar a la dieta 3.5% y 7% de aceite de coco, atribuyendo esta disminución a una menor digestibilidad de la fibra, así como una disminución en el número de bacterias metanogénicas y protozoarios. Sin embargo, en el presente estudio no se observaron diferencias en la digestibilidad *in vitro* de la materia seca, ni en el número de protozoarios con respecto al T1. Mohammed *et al.* (2004), al agregar aceite de caballo de mar en la dieta, reportan valores similares con lo observado en la presente investigación, un incremento en el número de bacterias totales, el número de bacterias celulolíticas y protozoarios no presentaron diferencias con respecto al testigo, sin embargo reporta un aumento en la concentración de propionato, y una disminución en la producción de metano atribuida a la competencia por los electrones debido a la biohidrogenación de ácido graso, lo cual originó una disminución en el número de bacterias metanogénicas.

Los resultados de la presente investigación sugieren que el aumento en la producción de metano puede ser atribuido a un ligero aumento en la concentración de bacterias celulolíticas, ello puede explicar el aumento en la concentración de acetato, el cual favorece la producción de metano (Mendoza-Martinez *et al.* 2008). El resultado observado en el T3 de la presente investigación coincide con lo reportado por Swainson *et al.* (2007), quienes no encontraron una disminución importante en la producción de CH₄ al adicionar 3% de aceite de coco en una dieta de forraje fresco de *Lolium perenne* o de *Chicorium intybus*; sin embargo, numerosas investigaciones reportan una disminución considerable de la producción de metano; así Johnson & Johnson (1995), señalan que la grasa en la dieta de los rumiantes afecta la producción de metano por diversos mecanismos, incluyendo la biohidrogenación de los ácidos grasos insaturados, el aumento en la producción de ácido propiónico y la inhibición del desarrollo de protozoarios; de

igual manera Dohme *et al.* (2000), señalan que grasas con altas concentraciones de ácidos grasos de cadena media pueden ser efectivos en la reducción de metano y de las poblaciones de protozoarios; otros estudios consideran que la reducción de metano en la dieta se debe a la disminución de sustrato fermentable y no a un efecto directo sobre la metanogénesis (Machmüller & Kreuzer 1998, Beauchemin *et al.* 2007).

Dong *et al.* (1997), enfatizan que la biohidrogenación por sí sola no puede explicar la reducción en la producción de metano; y que el recubrimiento de la ración con aceite y la prevención de la adhesión bacteriana no era responsable de la menor producción de metano en la dieta, por lo que la disminución de metano, tal vez, es debida a un cambio en la fermentación hacia una mayor producción de propionato, así como al efecto tóxico característico de cada tipo de aceite sobre la población de bacterias metanogénicas. Lo anterior podría explicar la ligera reducción en la producción de metano observada en el T3, puesto que se observó una disminución en la concentración de acetato y butirato.

El resultado obtenido en el T4 difiere de lo reportado por Sallam *et al.* (2010), quienes observaron una disminución en la producción de metano; en cambio Rodríguez (2010), no observó una reducción significativa al adicionar taninos de *L. leucocephala* en la fermentación de pasto King grass CT-115. Este efecto, como ya fue mencionado, puede ser explicado por la variación entre ecotipos, al respecto Fortes *et al.* (2003), mencionan que las diferencias entre los ecotipos están relacionadas con el contenido de factores antinutricionales. Singh *et al.* (2005), mencionan que las diferencias entre los ecotipos están relacionadas con el contenido de factores antinutricionales; Ley (2010), menciona que en algunos casos los metabolitos secundarios de algunas plantas no ocasionan efecto tóxico en los microorganismos del rumen, e inclusive se puede observar un incremento.

El resultado obtenido en el T1, en donde no se observaron diferencias en la producción de metano puede estar relacionado con la calidad del alimento suministrado; se ha demostrado que cuando los rumiantes son alimentados con dietas que contienen una alta proporción de forrajes de baja digestibilidad (alto contenido de paredes celulares) se genera mayor cantidad de ácido acético e H₂

(Janssen *et al.* 2010) lo que a su vez aumenta la cantidad de metano producido por unidad de alimento ingerido; por el contrario, dietas que contienen una mayor cantidad de granos o de carbohidratos de fácil fermentación, el principal producto de la fermentación es ácido propiónico (Beauchemin & McGinn 2005). Los resultados de la concentración de AGV obtenidos en el T1 de este experimento, al ser comparados con otros estudios en condiciones similares difieren notablemente; por su parte, Galindo *et al.* (2003b), al trabajar con pasto estrella, reportan concentraciones para acetato de 73.50 %, para propionato de 10.60 % y para butirato 14.20 %; en contraste, las concentraciones obtenidas en la presente investigación son de 57.32 % para acetato, 33.48 % para propionato y 9.20 % para butirato; por tal razón, no hubo un efecto importante en la adición de aceite de pescado y la incorporación de *L. leucocephala*. Boadi & Wittenberg (2002), al ofrecer forrajes con alta (61.5 %), media (50.7 %) o baja (38.5 %) digestibilidad, encontró que la producción de CH₄ se incrementó conforme la digestibilidad del forraje se redujo; en tanto que Swainson *et al.* (2007), mencionan que es posible disminuir significativamente la producción de CH₄ en dietas a base de forraje con una digestibilidad mayor al 50 %.

McGeugh *et al.* (2010), mencionan que al aumentar la relación de concentrado y granos en la dieta, causa una disminución en las emisiones de metano. Por su parte, Lopez *et al.* (2011), observaron que esta reducción de metano es afectada por la fuente de almidón añadida a la dieta, Beauchemin & McGinn (2005), mencionan que la sustitución de grano de cebada por grano de maíz reduce las emisiones de metano. Miramontes *et al.* (2010), mencionan que la proporción de forraje:concentrado 40:60, de la dieta permite el crecimiento de las poblaciones de bacterias acetogénicas en el rumen, y una mayor producción de propionato, lo cual puede explicar la disminución en la producción de metano; Moss *et al.* (2000), señalan que la formación de propionato puede ser considerada como una forma competitiva en el uso del H₂ en el rumen. McGeugh *et al.* (2010), concluyeron que al aumentar el contenido de almidón de la dieta es un método eficaz para la reducción de metano sin afectar el rendimiento del animal. Otras investigaciones señalan que la incorporación de alimento concentrado en la dieta trae como

consecuencia la acidificación del contenido ruminal (Cobos *et al.* 2005), cambios en la composición de la población microbiana, que incluyen una disminución de la concentración de las bacterias celulolíticas y un aumento en la concentración de bacterias amilolíticas; como consecuencia, se reduce la digestión de la fibra y se altera el tipo de fermentación hacia la formación de una menor concentración de ácido acético y una mayor concentración de ácido propiónico lo cual concuerda con los resultados obtenidos en en el T5 de la presente investigación, en donde la concentración de bacterias totales disminuyó con respecto al T1, el pH fue el menor con respecto a los demás tratamientos y se observó una ligera disminución en la concentración de bacterias celulolíticas, además, en este tratamiento se obtuvo un aumento en la concentración de propionato y una menor concentración de metano.

CONCLUSIONES

De acuerdo con las condiciones de la presente investigación se concluye que:

La adición de 5% de aceite de pescado en la dieta, redujo la producción de metano sin afectar la DIVMS; sin embargo, al expresar la producción de metano en función de la de digestibilidad de la dieta, no se mostro una reducción en la producción de metano.

La adición de 0.5 % de aceite de pescado en la dieta, no tuvo impacto sobre las variables fermentativas ruminales, produciendo ademas una mayor cantidad de metano.

La incorporación de *L. leucocephala* en la dieta, no tuvo impacto sobre la producción de metano y las variables fermentativas ruminales, espesificamente sobre la población de protozoarios.

La incorporación de alimento concentrado en un 40% de la dieta, es apropiada para disminuir la producción de metano, mejorando las variables fermentativas ruminales.

Se recomienda realizar estudios *in vitro* aumentando el porcentaje de adición de aceite de pescado a la dieta, así como evaluar su efecto en dietas con forrajes de menor calidad. Se sugiere realizar estudios *in vivo* para observar el efecto producido sobre el consumo de la dieta.

LITERATURA CITADA

- Anderson R.C. & M.A. Rasmussen. 1998. Use of a novel nitrotoxinmetabolizing bacterium to reduce ruminal methane production. *Bioresource Technology*. 64: 89-95.
- Anderson R.C., T.R. Callaway, J.A. Van Kessel, Y.S. Jung, T.S. Edrington, & D.J. Nisbet. 2003. Effect of select nitrocompounds on ruminal fermentation; an initial look at their potential to reduce economic and environmental costs associated with ruminal methanogenesis. *Bioresource Technology*. 90:59.
- Arce C., T. Arbaiza., F. Carcelén. & O. Lucas. 2003. Estudio comparativo de la digestibilidad de forrajes mediante dos métodos de laboratorio. *Rev. Inv. Vet. Perú*. 14 (1): 7 - 12.
- Aregheore E.M. 1999. Nutritive and antinutritive value of some tree legumes used in ruminant livestock nutrition in pacific island countruies. *Journal of South Pacific Agriculture*. 6 (2): 50 - 61.
- Attwood, G. & C. McSweeney. 2008. Methanogen genomics to discover targets for methane mitigation technologies and options for alternative H₂ utilization in the rumen. *Australian J. Exp. Agric*. 48:28.
- Avila C.D., E.J. DePeters, H. Perez-Monti, S.J. Taylor & R.A. Zinn. 2000. Influences of saturation ratio of supplemental dietary fat on digestion and milk yield in dairy cows. *J. Dairy Sci*. 83: 1505-1519.
- Baez J. L. 2010. Uso de levaduras y fumarato para disminuir la metanogénesis en la fermentación de alfalfa. Tesis de doctorado. Colegio de Postgraduados.
- Baird C. 2001. *Quimica ambiental*. Reverté. Barcelona, España. 648 p.
- Baker SK. 1999. Rumen methanogens, and inhibition of methanogenesis. *Austrian Journals of Agricultural Research*. 50: 1293-1298.

- Beauchemin, K.A. & S.M McGinn. 2005. Methane emissions from feedlot cattle fed barley or corn diets. *J. Anim. Sci.* 83:653
- Beauchemin K.A. & S.M. McGinn. 2006. Methane emissions from beef cattle: effects of fumaric acid, essential oil and canola oil. *J. Anim. Sci.* 84:1489.
- Beauchemin K.A., M. Kreuzer, F. Mara, & T.A. Mc Allister. 2008. Nutritional management for enteric methane abatement's review. *Australian J. Experimental Agric.* 48:21.
- Beauchemin K.A., S.M. McGinn & H.V. Petit. 2007. Methane abatement strategies for cattle: Lipid supplementation of diets. *Can. J. Anim. Sci.* 87: 431-440.
- Bedolla E. 2010. Efecto de la suplementación de dos tipos de ácidos grasos sobre la composición de la leche en vacas f1 (*Bos Taurus x Bos indicus*) durante el posparto temprano. Tesis de doctorado. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Benchaar C., J. Rivest, C. Pomar & J. Chiquette. 1998. Prediction of methane production from dairy cows using existing mechanism model and regressions Equations. *J. Anim. Sci.* 33:94-99.
- Blaxter K.L. & J.L. Clapperton. 1969. Prediction of the amount of methane produced by ruminants. *Br. J. Nutr.* 19: 511 - 522.
- Boadi D.A., & K.M. Wittenberg. 2002. Methane production from dairy cattle and beef heifers feed forages differing in nutrient density using the sulphur hexafluoride (SF6) technique. *Can J Anim Sci.* 82: 201- 206.
- Bochi-Brum, O., M.D. Carro, C. Valdés, J.S. González & S.López. 1999. Digestibilidad in vitro de forrajes y concentrados: Efecto de la ración de los animales donantes de líquido ruminal. *Arch. Zootec.* 48: 51-61.
- Bonilla-Cárdenas J.A., C.Lemus-Flores, M.F. Montaña-Gómez, V. M. González-Vizcarra & J. Ly-Carmenatti. (2012). Fermentación ruminal, digestibilidad y producción de metano en ovinos alimentados con cuatro niveles de rastrojo de maíz. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 15: 499-509.

- Broudiscou L., S. Pochet & C. Poncet. 1994. Effect of linseed oil supplementation on feeddegradation and microbial synthesis in the rumen of ciliate-free and refaunated sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 49: 189-202.
- Bruni M. & P. Chilibroste. 2001. Simulación de la digestión ruminal por el método de la producción de gas. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 9: 43-51.
- Bryant M.P. 1979. Microbial methane production: Theoretical aspect. *J. Anim. Sci.* 48:193.
- Buddle B.M., M. Denis, G.T. Attwood, E. Altermann, P.R. Janssen & R.S. Ronimus. 2010. Strategies to reduce methane emissions from farmed ruminants grazing on pasture. *Veterinary Journal*.
- Calsamiglia S., A. Ferret & M. Devant. 2002. Effects of pH fluctuations on microbial fermentation and nutrient flow from a dual-flow continuous culture system. *J. Dairy Sci.* 85: 574 - 579.
- Calsamiglia S., L. Castillejos & M. Busquet. 2005. Estrategias nutricionales para modificar la fermentación ruminal en vacuno lechero. Pp:161-185, *In: XXI curso de especialización, FEDNA, Madrid España.*
- Cardozo P.W. 2005. Efectos de los extractos de plantas sobre las características de fermentación microbiana ruminal en sistemas *in vitro* e *in vivo*. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Carmona J.C. 2007. Efecto de la utilización de arbóreas y arbustivas forrajeras sobre la dinámica digestiva en bovinos. *Revista Lasallista de investigación.* 4(1): 40 - 50.
- Carmona J.C., D.M. Bolívar & L.A. Giraldo. 2005. El gas metano en la producción ganadera. Alternativas para medir sus emisiones y aminorar su impacto a nivel ambiental y productivo. *Rev. Coloma. Cienc. Pec.* 18:49
- Carrasco E., R. Garcia-Lopez, A.V. Enrique & D. Fonte. 2002. Compración de dos tiempos de reposo en el pastoreo de CT-115 (*Pennisetum purpureum*) para la producción de leche en el periodo poco lluvioso. *Rev. Cub. De Cienc. Agric.* 36 (4): 337-340.

- Casals R. 1992. Efectos de la utilización de lípidos protegidos en la alimentación de ovejas de ordeño durante los periodos de lactación y cubrición. Tesis doctorado. Universitat autònoma de Barcelona.
- Chalupa W. B. Rickabaugh, D. S. Kronfeld, & D. Sklan. 1984. Rumen Fermentation *in vitro* as influenced by long chain fatty acids. *J Dairy Sci.* 67:1439 -1444.
- Clemens J. & H.J. Ahlgrimm. 2001. Greenhouse gases from animal husbandry: Mitigation options. *Nutr.Cycl.Agroecosys.* 60:287
- Cobos M.A. & T. Yokoyama. 1995. *Clostridium paratrificum var. ruminantium*: colonization and degradation of shrimp carapaces *in vitro* observed by scanning electron microscopy. In Wallace R. J. & Lahlou-kassi. Rumen ecology research planning. Proceedings of a workshop held at international livestock research institute (ILRI), Addis Ababa, Ethiopia. 151-161.
- Cobos M.A. 2007. Interacciones entre microorganismos ruminales. Pp. 498-516. In: Microbiología agrícola: Hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico y planta microorganism. R. Ferrera-Cerrato y A. Alarcon. (ED) Editorial Trillas México.
- Cobos M.A., E. Guerra, S.J. López, Baez J.L., S.: González & G.D. Mendoza. 2005. Evaluación *in vitro* de dos amortiguadores y un ionoforo sobre variables fermentativas y microbiológicas. *Agrociencia* 39 (001): 1-9.
- Czerkawski J.W., K.L. Blaxter, & F.W. Wainman. 1966. The metabolism of oleic, linoleic and linolenic acids by sheep with reference to their effects on methane production. *Br. J. Nutr.* 20: 349-362.
- Demeyer D.I & H.K. Henderickx. 1967. The effect of C18 unsaturated fatty acids on methane production *in vitro* by mixed rumen bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism.* 137: 484.
- Demeyer D.I. & C.J. Van Nevel. 1979. Effect of defaunation on the metabolism of rumen micro-organisms. *Br. J. Nutr.* 42: 515.

- Demeyer, D.L. & V. Fievez. 2000. Ruminants et environnement: la méthanogenèse. *Ann. Zootech.* 49:95.
- Dennis S.M., M.J. Arambel, E.E. Bartley & A.D. Dayton. 1983. Effect of energy concentration and source of nitrogen on numbers and types of rumen protozoa. *J. Dairy Sci* 66:1248-1254.
- Díaz D. 2007. Evaluación agronómica de nuevas variedades de *Pennisetum purpureum* en condiciones de sequia el valle del cauto. Tesis de maestría. Universidad de Matanzas.
- Dios-Vallejo O.O. 2001. Ecofisiología de los bovinos en sistemas de producción del trópico húmedo. Colección de José N. Roviroso, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco. 376 pp.
- Dohme F., A. Machmüller, A. Wasserfallen & M. Kreuzer. 2000. Comparative efficiency of various fats rich in medium-chain fatty acids to suppress ruminal methanogenesis as measured with RUSITEC. *Canadian Journal of Animal Science.* 80: 473-482.
- Dohme F., V. Fievez, K. Raes & D. Demeyer. 2003. Increasing levels of two different fish oils lower ruminal biohydrogenation of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid *in vitro*. *Anim. Res.* 52: 309 - 320.
- Dong Y., H.D. Bae, T.A. McAllister, G.W. Mathison & K.J. Cheng. 1997. Lipid-induced depression of methane production and digestibility in the artificial rumen system (RUSITEC). *Can. J. Anim. Sci.* 77: 269.
- Doreau M & Y. Chilliard. 1997. Digestion and metabolism of dietary fat in farm animals. *Br.J. Nutr.* 78: S15-S35.
- Estrada-Liévano J.M., A. C. Sandoval-Castro, L. Ramírez-Avilés & C.M. Capetillo-Leal. 2009. *In vitro* fermentation efficiency of mixtures of *Cynodon nlemfuensis*, *Leucaena leucocephala* and two energy sources (maize or sugar cane molasses). *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 10: 497-503.

- Eun J. S., V. Feller & M. L. Gumpertz. 2004. Methane production by mixed ruminal cultures incubation in dual-flow fermentors. *J. Dairy Sci.* 87: 112 - 121.
- Fahey G.C. & L.L. Berger. 1988. Los carbohidratos en la nutrición de los rumiantes. In: *El rumiante: Fisiología Digestiva y Nutrición*. C.D. Church (Ed.). Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. 305-337 pp.
- Fernández J.R. 2007. Suplementación de la dieta con aceite de pescado rico en ácidos grasos poliinsaturados n-3. Estrategias a practicar para potenciar su consumo. Tesis doctoral. Universidad de Granada.
- Fievez V., L. Mbanzamihiyo, F. Piattoni, & D. Demeyer. 2001. *Clover saponins as methane inhibitors and their effect on rumen utilisation efficiency as studied in vitro and in vivo*. *Meded Rijksuniv.Gent.Fak.Landbouwkd.Toegep.Biol. Wet.* 66.
- Fortes D., O. La O, B. Chongo & I. Scull. 2003. Una nota acerca de la composición química de seis ecotipos de *Leucaena leucocephala*. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 37(1): 51-54.
- France J., M. S. Dhanoa, M. K. Theodorou, S. J. Lister, D. R. Davies & D. Isaac. 1993. A model to interpret gas accumulation profiles associated with *in vitro* degradation of ruminant feeds. *J. Theor. Biol.* 163: 99 - 111.
- Francis G., Z. Kerem, P. Harinder, S. Makkar, & K. Becker. 2002. The biological action of saponins in animal systems: a review. *Br. J. Nutr.* 88: 587- 605.
- Franzolin, R. & Dehority. 1996. Effect of prolonged high-concentrate feeding on ruminal protozoa concentrations. *J. Anim. Sci.* 74: 2803 - 2809.
- Galindo J. 2004. Fermentación microbiana ruminal y pasaje hacia las partes bajas del tracto gastrointestinal de árboles, arbustos y leguminosas. Pp. 132, *In: Memorias del Curso Sistemas Sivopastoriles, una opción sustentable*. Mérida, México.
- Galindo J., A. Elías, T. Palenzuela, M.C. Pérez & A.I. Aldama. 2003a. Efecto del monensín en la producción de metano in vitro en tres sistemas ecológicos ruminales. *Rev. Cubana de Ciencia Agrícola*. 37 (2): 183-188.

- Galindo J., C. García, Y. Marrero, E. Castillo, A. I. Aldana, V. Torres, & L. Sarduy. 2007. Efecto de la composición del pastizal de *Leucaena leucocephala* con gramíneas en la población microbiana ruminal de toros. *Rev. Cubana de Ciencia Agrícola*. 41 (2): 145 - 148.
- Galindo J., N. González, D. Delgado, A. Sosa, R. González, V. Torres, A. Aldana, O. Moreira, L. Sarduy, A. Noda & J. Cairo. 2009. Efecto del aceite de coco en la población de bacterias metanogénicas y su relación con otros grupos microbianos del rumen en condiciones *in vitro*. *Rev. Cubana de Ciencia Agrícola*, 43 (2): 135-140.
- Galindo J., N. González, D. Delgado, A. Sosa, Y. Marrero, R. González, A. Aldana & O. Moreira. 2008. Efecto modulador de *Leucaena leucocephala* sobre la microbiota ruminal. *Zootecnia Trop.*, 26(3): 249 - 252.
- Galindo J., Y. Marrero, N. González & A.I. Aldama. 2003b. Efecto del follaje de dos árboles tropicales (*Brosimum allicastrum* y *Leucaena leucocephala*) en la población microbiana ruminal en condiciones *in vitro*. *Rev. Cubana de Ciencia Agrícola*. 37(4): 395 - 401.
- García D., H. Wencomo, M. Gonzáles, M. Medina & L. Cova. 2008. Caracterización de diez cultivares forrajeros de *leucaena leucocephala* basada en la composición química y la degradabilidad ruminal. *Rev. MVZ Córdoba* 13(2):1294-1303.
- Gaviria A. M. L., A. P. Hernández, V. G. N. Moorillón, N. R. Seijas & H. M. P. Valardo. 2003. Comparación de dos sistemas anaerobios acoplados para la biometanización de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos. *Interciencia*. 28 (8): 436 - 442.
- Getachew G., M. Blümmel, H. P. S. Makkar & K. Becker. 1998. *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 72: 261 - 281.

- González R., D. Delgado & J. Cairo. 2007. Efecto de la inclusión de *Sapindus saponaria* en la producción de gas y metano en la fermentación *in vitro* de *Pennisetum purpureum* cv Cuba CT-115. Revista Cubana de Ciencia Agrícola. 41 (1): 39 - 41.
- Greathead H. 2003. Plants and plant extracts for improving animal productivity. Proc. Nutr. Soc. 62:279
- Gurbuz Y. 2009. Efectos del contenido de taninos condensados de algunas especies de leguminosas en la emisión de gas metano. Revista Cubana de Ciencia Agrícola, 43(3): 265-272.
- Harfoot G.G. 1978. Lipid metabolism in the rumen. Prog. Lipid Res.,17: 21- 54.
- Harrigan W.F. & E.M. McCance.1979. Métodos de laboratorio en microbiología de alimentos y productos lácteos. Ed. Academia. León, España. 361-366 pp.
- Hart K.J., P.G. Martin, P.A. Foley, D.A. Kenny & T.M. Boland. 2009. Effect of sward dry matter digestibility on methane production, ruminal fermentation and microbial populations of zero-grazed beef cattle. J. Anim. Sci. 87: 3342 - 3350.
- Hart S.P. & J.J. Doyle. 1985. Adaptation of early-weaned lambs to high-concentrate diets with three grain source with or without sodium bicarbonate. J. Anim. Sci. 61: 975-984.
- Hegarty R.S. 1999. Mechanisms for competitively reducing ruminal methanogenesis. Australian Journal of Agricultural Research. 50: 1299-1305.
- Herrera R.S. 1997. El cultivo de tejidos *in vitro* aplicado a los pastos en Cuba. Rev. Cubana Cienc. Agríc.31:113.
- Hindrichsen I. K., H. R. Wettstein, A. Machmüller, C. R. Soliva, K. E. Bach Knudsen & M. Kreuzer. 2004. Effects of feed carbohydrates with contrasting properties on rumen fermentation and methane release *in vitro*. Can. J. Anim. Sci. 84: 265 - 276.

- Hristov A.N., M. Ivan, L. M. Rode & T. A. Mc Allister. 2000. Fermentation characteristic and ruminal ciliate protozoal populations in cattle fed medium or high-concentrate barley-based diets. *J. Anim. Sci.* 79: 515 - 524.
- Hoover W.H. 1986. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. *J. Dairy Sci.* 69: 2755 – 2766.
- Hungate R. E. 1966. *The rumen and its microbes.* Academic Press, N. Y. 533pp.
- Janssen P.H. 2010. Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics. *Animal Feed Sci. and Technology.* 160: 1-22.
- Jaweed M. & V. Tare. 1999. Microbial composition assessment of anaerobic biomass through methanogenic activity test. *Water SA.* 25(3): 345 - 350.
- Jenkins T.C. 1993. Symposium: advances in ruminant lipid metabolism. *J. Dairy Sci.* 79: 3851 - 3863.
- Jenkins T.C., R.J. Wallace, P.J. Moate & E.E. Mosley. 2008. Board-Invited Review: Recent advance in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *J. Anim. Sci.* 86: 397-412.
- Joblin K.N. 2004. Methanogenic Archaea. I Planning Meeting of Project Contract Research and Training Workshop “Development and Use of Rumen Molecular Techniques for Predicting and Enhancing Productivity. Brisbane, Australia 19-30..
- Johnson KA. & D.E.Johnson. 1995. Methane emissions from cattle. *J. Anim Sci.* 73: 2483-2492.
- Jouany J.P. 1994. Methods of manipulating the microbial metabolism in the rumen. *Ann. Zootech.* 43: 49.
- Kamra, D.N. 2005. Rumen microbial ecosystem. *Current Science.* 89 (1): 124-135.

- Kinsman R., F.D. Sauer, H.A. Jackson, & M.S. Wolynetz. 1995. Methane and carbon dioxide emissions from dairy cows in full lactation monitored over a six-month period. *J. Dairy Sci.* 78 (12): 2760 - 2766.
- Kolver E. S., P. W. Aspin, G. N. Jarvis, K. M. Elborough & J. R. Roche. 2004. Fumarate reduces methane production from pasture fermented in continuous culture. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* 64: 155-159.
- Lana R.P., J. B. Russell & M. E. Van Amburgh. 1998. The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production. *J. Anim Sci.* 76: 2190 - 2196.
- La O O., B. Chongo, D. Fortes, I. Scull & Ruiz T.E. 2003. Características químicas de diferentes ecotipos de *Leucaena leucocephala*, según la época del año. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola.* 37 (2). 193-199.
- Lassey K.R., M.J. Ulyatt, R.J. Martin, C.F. Walker & Y.D. Shelton. 1997. Methane emissions, measured directly from grazing livestock in New Zealand. *Atmosphere Environmental.* 31.
- Lehninger A. L. 1980. *Bioquímica*. Ediciones Omega, S.A. Barcelona. 1117 pp.
- Ley de Coss A. 2010. Evaluación de técnicas *in vitro* para el estudio de la capacidad desfaunante de fármacos y plantas. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados.
- Lockyer D.R. 1997. Methane emission from grazing sheep and calves. *Agr. Ecosystem Environmental.* 66 (2):18.
- Loor J.J., A. Ferlay, A. Ollier, K. Ueda, M. Doreau & Y. Chilliard. 2005. High-Concentrate Diets and Polyunsaturated Oils Alter Trans and Conjugated Isomers in Bovine Rumen, Blood, and Milk. *J. Dairy Sci.* 88: 3986 - 3999
- Lopez M.C., L. Ródenas, O. Piquer, A. Cerisuelo, C. Cervera & C. Fernández. 2011. Determinación de producción de metano en caprinos alimentados con dietas con distintos cereales. *Arch. Zootec.* 60 (232): 943-951.

- Lopez S., F. M. McIntosh, R. J. Wallace & C. J. Newbold. 1999. Effect of adding acetogenic bacteria on methane production by mixed rumen microorganisms. *Animal Feed Science and Technology*. 78: 1-9.
- Machmüller A. & M. Kreuzer. 1998. Methane suppression by coconut oil and associated effects on nutrient and energy balance in sheep. *Can. J. Anim. Sci.* 79: 65-72.
- Maczulak A.E., B.A. Dehority & D. L. Palmquist. 1981. Effects of long-chain fatty bacteria acids on growth of rumen. *Appl. Environ. Microbiol.* 1981, 42(5): 856 - 862.
- Madigan M.T., J.M. Martiniko & J. Parker. 2004. Brock, biología de los microorganismos. Editorial Pearson-Prentice Hall, 10ª edición. Madrid España. 986p.
- Mahy J. N. 1979. Desarrollo de un método de análisis por cromatografía de gases y espectrometría de masas combinadas para el estudio del metabolismo de la histamina. Tesis de doctorado. Universidad de Barcelona.
- Maia M.R.G., L.C. Chaudhary, L. Figueres & R.J. Wallace. 2007. Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. *Antonie van Leeuwenhoek* 91: 303-314.
- Makkar HPS, & K. Becker. 1998. Do tannins in leaves of trees and shrubs from Africa and Himalayan regions differ in level and activity. *Agroforestry systems*. 40 (1): 59-68.
- Martinez A.L. 2011. Adición de aceites vegetales de diferente grado de insaturación a la ración de cabras lecheras. Tesis de doctorado. Universidad de Cordoba.
- Martínez A.L., M. Pérez, L. Pérez & G. Gómez. 2010. Digestión de los lípidos en los rumiantes: una revisión. *Interciencia*. 35 (4): 240-246.
- Martínez M. E. 2009. Estudios de simulación del ecosistema ruminal en sistemas *in vitro*: aspectos metodológicos. Tesis de doctorado. Universidad de León.
- Martinez R.O., R.S. Herrera, R. Cruz, R. Tuero & M. Garcia. 1996. Producción de biomasa con hierba elefante (*Pennisetum purpureum*) y caña de azúcar

(*Saccharum officinarum*) para la ganadería tropical. Rev. Cubana Cienc. Agric. 28: 229.

Mbugua D.M., E.M. Kiruiro & A.N. Pell. 2008. *In vitro* fermentation of intact and fractionated tropical herbaceous and tree legumes containing tannins and alkaloids. Anim. Feed Sci. Technol., 146: 1-20.

McAllister T.A., E.K. Okine, G.W. Mathison, & K.J. Cheng. 1996. Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. Can. J. Anim. Sci. 76:23.

McAllister T.A., H. D. Bae, G. A. Jones & K.J. Cheng. 1994. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. J. Anim. Sci. 72: 3004 – 3018.

McCaughey W.P., K. Wittenberg & D. Corrigan. 1997. Methane production by steers on pasture. Canadian Journal Animal Science. 77: 519-524.

McGeough E.J., P. O'Kiely, K.J. Hart, A.P. Moloney, T. M. Boland & D. A. Kenny. 2010. Methane emissions, feed intake, performance, digestibility, and rumen fermentation of finishing beef cattle offered whole-crop wheat silages differing in grain content. J. ANIM. SCI., 88: 2703-2716.

McGinn S.M., K.A. Beauchemin, T. Coates & D. Colombatto. 2004. Methane emissions from beef cattle: Effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumaric acid. J. Anim. Sci. 82: 3346.

Mellenberger R.W., L.D. Satter, M.A. Millett & A.J. Baker. 1970. An *in vitro* technique for estimating digestibility of treated and untreated wood. *J. Anim. Sci.*, 30: 1005-1011.

Mendoza G.D., R.A. Britton & R. A. Stock. 1993. Influence of ruminal protozoa on site and extent of starch digestion and ruminal fermentation. J. Anim. Sci. 71:1572-1578.

Mendoza-Martinez G.D., F.X. Plata-Perez, R. Espinosa-Cervantes & A. Lara-bueno. 2008. Manejo nutricional para mejorar la eficiencia de utilización de la energía en bovinos. Universidad y ciencia. 24 (1): 75-87.

- Menke K.H., L. Raab, A. Salewski, H. Steingass, D. Fritz & W. Schneider. 1979. The estimation of digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *J. Agric. Sci.* 93: 217 - 222.
- Min B.R., W.E. Pinchak, R.C. Anderson, J.D. Fulford & R. Puchala. 2006. Effects of condensed tannins supplementation level on weight gain *in vitro* and *in vivo* bloat precursors in steers grazing winter wheat. *J. anim. Sci.* 84: 2546 - 2554.
- Miramontes J.M., M. Ramírez-Rangel, J. Ibarra, F. J. Ibarra, B.E. Alcantar, J. Miramontes, P. Aguiar & R. Lezama. 2010. Efecto de la proporción concentrado/forraje de la dieta, sobre las poblaciones de bacterias utilizadoras de hidrógeno del rumen. *Revista Biociencias*, 1 (1): 30-43.
- Moe P.W. & H.F. Tyrrel. 1979. Methane Production in Dairy Cows. *J Dairy Sci* 62: 1583 – 1586.
- Mohammed N., N. Ajisaka, Z. A. Lila, K. Hara, K. Mikuni, K. Hara, S. Kanda & H. Itabashi. 2004. Effect of Japanese horseradish oil on methane production and ruminal fermentation *in vitro* and *in steers*. *J. Anim. Sci.* 82: 1839-1846.
- Molano, G., T.W. Knight & H. Clark. 2008. Fumaric acid supplements have no effect on methane emissions per unit of feed intake in wether lambs. *Australian J. Experimental Agric.* 48:165.
- Montgomery S.P., J.S. Drouillard, T.G. Nagaraja, E.C. Titgemeyer & J.J. Sindt. 2008. Effects of supplemental fat source on nutrient digestion and ruminal fermentation in steers. *J. Anim. Sci.* 86: 640-50.
- Moore B. R. & B. A. Dehority. 1993. Effects of diet and hindgut defaunation on diet digestibility and microbial concentrations in the cecum and colon of the horse. *J. Anim. Sci.* 71: 3350 – 3358.

- Moore J.A., R.S. Swingle & W.H. Hale. 1986. Effects of whole cottonseed, cottonseed oil or animal fat on digestibility of wheat straw diets by steers. *J. Anim. Sci.*, 63: 1267 - 1273.
- Morvan B., F. Bonnemoy, G. Fonty, & P. Gouet. 1996. Quantitative determination of H₂-utilizing acetogenic and sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea from digestive tract of different mammals. *Curr.Microbiol.* 32: 129-133.
- Moss A., J. Jouany & J. Newbold. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Ann. Zootechnie.* 49: 231–253.
- Moysés do Nascimento C.F., J.J. Assumpção de Abreu Demarchi, A. Berndt & R.P.H. Mazza. 2007. Methane emissions by Nellore beef cattle consuming brachiaria brizantha with different stages of maturation. *GGAAC.New Zeland.*lxiv-lxv.
- Nagaraja T.G., C.J. Newbold, C.J. Van Nevel & D.I. Demeyer. 1997. Manipulation of ruminal fermentation. Pp. 523. *In*: P.N. Hobson & C.S. Stewart. Eds. *The Rumen Microbial Ecosystem.* Blackie Academic & Professional, London.
- Orskov E.R., D.A. Grubb & R.N.B. Kay. 1977. Effect of postruminal glucose or protein supplementation on milk yield and composition in Friesian cows in early lactation and negative energy balance. *Br. J. Nutr.* 38: 397.
- Osborne V.R., S. Radhakrishnan, N.E. Odongo, A.R. Hill & B.W. McBride. 2008. Effects of supplementing fish oil in the drinking water of dairy cows on production performance and milk fatty acid composition. *J. Anim Sci.* 86: 720 - 729.
- Owens F.N. & A.L. Goetsch. 1988. Fermentación ruminal. Pp. 159-189 *In*: C.D. Church (ed.), *El Rumiante: Fisiología Digestiva y Nutrición.* Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España.
- Palmquist D.L. & T.C. Jenkins. 1980. Fat in lactation rations: Review. *J Dairy Sci* 63: 1-14.
- Papi N., A. Mostafa-Tehrani, H. Amanlou & M. Memarian. 2011. Effects of dietary forage to concentrate ratios on performance and carcass characteristics of growing fat-tailed lambs. *Animal Feed Science and Technology* 163: 93-98.

- Park K.K., L.J. Krysl, B.A. McCracken, M.B. Judkins & D.W. Holcombe. 1994. Steers grazing intermediate wheatgrass at various stages of maturity: Effects on nutrient quality, forage intake, digesta kinetics, ruminal fermentation, and serum hormones and metabolites. *J. Anim. Sci.* 72:478–486.
- Pecsok R. L. & L. D. Shields. 1990. *Metodos modernos de análisis químico*. Limusa. 487pp.
- Pell A.N. & P. Schofield. 1993. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. *J. Dairy. Sci.* 76: 1063 - 1073.
- Pérez S.M. 2006. Comportamiento productivo y microbiológico de borregos alimentados con polietilentereftalato como fuente de fibra. Tesis de doctorado. Colegio de Postgraduados.
- Piñeiro-Vázquez A.T., J. Oliva-Hernández & J.A. Hinojosa-Cuéllar. 2009. Uso de suplementación mineral con monensina sódica en corderas Pelibuey durante el crecimiento postdestete. *Arch. Med. Vet.* 41: 35 - 41.
- Posada S. L. & R. R. Noguera 2005. Técnica *in vitro* de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. *Livestock Research for Rural Development*. 17:36. Consultado el 25 de Noviembre de 2012: <http://www.lrrd.org/lrrd17/4/posa17036.htm>.
- Prins R.A., C.J. Van Nevel & D.I. Demeyer. 1972. Pure culture studies of inhibitors for methanogenic bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek, J. Microbiol. Serol.* 38: 281.
- Ramírez I.F. 2010. Emisiones de metano generadas por excretas de animales de granja y contenido ruminal bovino. Tesis de doctorado. Colegio de Postgraduados.
- Ramírez L., J. C. Ku, J. & A. Alayon. 2007. Follaje de árboles y arbustos en los sistemas de producción bovina de doble propósito. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 15: 251-264.
- Razz R., T. Clavero & J. Vergara. 2004. Cinética de degradación *in situ* de la *Leucaena leucocephala* y *Panicum máximum*. *Revista científica FCV-LUZ*. 14 (5): 424-430.

- Reed J.D. 1982. Condensed tannins: a factor limiting the use of cassava forage. *Journal Science Food Agriculture*. 33(3): 213-220.
- Reed J.D. 1995. Nutritional toxicology of tannins and related poliphenols in forage legumes. *Journal Animal Science*. 73: 1516-1528.
- Relling A.E. & G.A. Mattioli. 2003. Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes. Editorial EDULP. 3-67.
- Riquelme V.E. 1987. Suplementación energética para bovinos en pastoreo. Pp: 65, *In: Memoria del seminario internacional, suplementación para bovinos en pastoreo. Centro de ganadería Colegio de Postgraduados. Chapingo. México.*
- Robles R. 2010. Calidad de la planta y variación de semillas en *Enterolobium cyclocarpum* (Jacq.) Griseb. En la región costa de Oaxaca. Tesis de Licenciatura. Universidad del Mar.
- Rodríguez J.A. 2009. Aislamiento y caracterización in vitro de una bacteria acetogénica ruminal. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados.
- Rodríguez R. 2010. Estudio *in vitro* del valor nutritivo y de los efectos antinutricionales de cuatro leguminosas arbóreas tropicales con potencialidades como suplementos del *Pennisetum purpureum* (vc. CUBA CT-115). Tesis de doctorado. Universidad de Zaragoza. España.
- Russell J. B. & D. B. Dombrowski. 1980. Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. *Appl. Env. Microbiol.* 39: 604 - 610.
- Russell J. B. & D. B. 1996. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? *J. Dairy Sci.* 79: 1503-1509.
- Sackmann J.R., S.K. Duckett, M.H. Gillis, C.E. Realini, A.H. Parks & R.B. Egelston. 2003. Effectsof forage and sunflower oil levels on ruminal biohydrogenation of fatty acids and conjugated linoleic acid formation in beef steers fed finishing diets. *J. Anim. Sci.* 81: 3174-3181.

- Salinas-Chavira J., J.C. Gutiérrez-González, R. García-Castillo, R. López-Trujillo & A. Duarte-Ortuño. 2011. Digestibilidad in situ de la materia seca de tres dietas para ovinos de engorda. *Agronomía mesoamericana* 22 (2): 379-385.
- Sallam S.M.A., I.C.S. Bueno, P.B. Godoy, E.F. Nozella, D.M.S.S. Vitti & A.L. Abdalla. 2010. Ruminal fermentation and tannins bioactivity of some browses using a semi-automated gas production technique. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 12: 1-10.
- Sánchez T., E.R. Ørskov, L. Lamela, R. Pedraza & O. López. 2008. Valor nutritivo de los componentes forrajeros de una asociación de gramíneas mejoradas y *Leucaena leucocephala*. *Pastos y forrajes*. 31(3): 271-281.
- Sanginés L. 2001. Potencial nutricional del follaje de *Buddleia skutchii* (hojas y pecíolos) en la alimentación de ovinos análisis de las variables ruminales. Tesis de doctorado. Universidad de Colima.
- Santra A. & S. Karim. 2003. Rumen manipulation to improve animal productivity. *Asian Australasian J. Anim. Sci*: 748-763.
- SAS Institute. 2010. SAS education analytical suite for Windows release 9.2.
- Schofield P. & A. N. Pell. 1995. Validity of using accumulative gas pressure readings to measure forage digestion *in vitro* a comparison involving three forages. *J. Dairy Sci*. 78: 2230 - 2238.
- Serrano-Altamirano V., M. M. Silva-Serna, M. A. Cano-García, G. Medina-García & A. Ruiz-Corral. 2005. Estadísticas climatológicas básicas del estado de Oaxaca (periodo 1961-2003). INIFAP. SAGARPA. Libro técnico No. 4. Oaxaca, México, 272 pp.
- Shriver B. J., W. H. Hoover, J. P. Sargent, R. J. Crawford Jr. & W.V. Thayne. 1986. Fermentation of a high concentrate diet as affected by ruminal pH and digesta flow. *J. Dairy Sci*. 69: 413-419.

- Silva A. V. 2010. Digestibilidad *in vitro* y valor nutritivo de King grass CT-115 y CT-169 (*Pennisetum purpureum* X *P. thyphoides*) a diferentes edades de corte. Tesis de licenciatura. Universidad del Mar.
- Singh B., A. Sahoo, R. Sharma & T.K. Bhat. 2005. Effect of polyethylene glycol on gas production parameters and nitrogen disappearance of some tree forages. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123:35.1
- Smith W.A. & B. Harris. 1992. The influence of forage type on the production response of lactating dairy cows supplemented with different types of dietary fat. *3rd Florida Ruminant Nutrition Symposium*. Gainesville.
- Soliva, C.R., H.D. Hess, L. Meile, M. Kreuzer, & M. Machmüller. 2003. Suppression of ruminal methanogenesis by dietary means: apparent inconsistency between methane release and counts of microbes involved in methanogenesis. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 3:209
- Sosa A., J. Galindo & R. Bocourt. 2007. Metanogénesis ruminal: aspectos generales y manipulación para su control. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 41 (2): 105-114.
- Sosa A., J. Galindo, R. Bocourt, R. Rodríguez, N. Albelo & A. Oramas. 2010. Efecto de *Aspergillus oryzae* en la fermentación ruminal de *Pennisetum purpureum* vc. Cuba CT-115 mediante la técnica de producción de gas *in vitro*. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 44 (1): 27-31.
- Steele P., P. Fraser, R. Rasmussen, M. Khalil, T. Conway, A. Crawford, R. Gammon, K. Masarie & K. Thoning. 1987. The global distribution of methane in the troposphere. *J. Atmos. Chem.* 5:125.
- Steel R.G.D. & J.H. Torrie. 1988. *Bioestadística: Principios*. McGraw Hill. México. 622 p.
- Stewart C.S., H.J. Flint & M.P. Bryant. 1997. The rumen bacteria. In: *The Rumen Microbial Ecosystem*. P.N. Hobson & C.S. Stewart (Eds.). Chapman and Hall, London.

- Swainson N.M., S.O. Hoskin, H. Clark & I.M. Brookes. 2007. The effect of coconut oil and monensin on methane emissions from sheep fed either fresh perennial ryegrass pasture or chicori, GGAAC. New Zeland.:lxxviii-lxxviii.
- Thauer K.R. 1988. Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. SGM Microbiol. 144:2377-2406.
- Theodorou M. K., B. A. Williams, M. S. Dhanoa, A. B. McAllan & J. France. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. Anim. Feed. Sci. Technol. 48: 185-197.
- Tieman T. 2004. Potencial de leguminosas forrajeras con taninos en explotaciones ganaderas de pequeños productores. Pp. 3-8. *In: Memorias de taller sobre taninos, taninos en la nutrición de rumiantes en Colombia.* CIAT-ETH. S.I.
- Ueda K., A. Ferlay, J. Chabrot, J.J. Loo, Y. Chilliard & M. Doreau. 2003. Effect of linseed oil supplementation on ruminal digestion in dairy cows fed diets with different forage:concentrate ratios. *J. Dairy Sci.* 86: 3999-4007.
- Vafa T.S. A.A. Naserian, A.R.H. Moussavi, R. Valizadeh & M.D. Mesgaran. 2009. Effects of different levels of fish oil and canola oil on in vitro dry matter and organic matter digestibility. *Res. J. Biol. Sci.* 4: 1171-1174.
- Valenciaga D., B. Chongo & O. La O. 2001. Caracterización del clon *Pennisetum* CUBA CT-115. Composición química y degradabilidad ruminal de la materia seca. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 35 (4): 349-354.
- Valenciaga D., B. Chongo, R.S. Herrera, V. Torres, A. Oramas & M. Herrera. 2009. Efecto de la edad de rebrote en la digestibilidad in vitro de la materia seca de *Pennisetum purpureum* vc. CUBA-CT 115. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 43 (1): 81-84.
- Van Soest J. P. 1982. Nutritional Ecology of the Rumen. Comstock publishing Ass. Cornell University Press. 160-169 p.

- Vergara-Lopez J., A. Rodríguez-Petit, C. Navarro & A. Atencio. 2006. Efecto de la suplementación con leucaena (*Leucaena leucocephala* Lam. De wit) sobre la degradabilidad ruminal del pasto alemán (*Echinochloa polystachya* H.B.K. Hitch). Revista científica, FCV-LUZ. 16 (6): 642-647.
- Vlaeminck B., V. Fievez, D. Demeyer & R.J. Dewhurst. 2006. Effect of forage: Concentrate ratio on Fatty acid composition of rumen bacteria isolated from ruminal and duodenal digesta. J. Dairy Sci. 89: 2668 - 2678.
- Weber, H., K.D. Kulbe, H. Chimiel, & W. Trosch. 1984. Microbial acetate conversion to methane kinetics, yield and pathway in a two-step digestion process. Appl. Microbiol. Biotechnol. 19: 224-228.
- Weimer P.J. 1998. Manipulating ruminal fermentation: a microbial ecological perspective. J. anim. Sci. 76: 3114 - 3122.
- Weiss, W.P. 1994. Estimation of digestibility of forages by laboratory methods. Pp. 644-681. In: G.C. Fahey (ed.). Forage Quality, Evaluation and Utilization. American Society of Agronomy, Inc. Madison, Wisconsin, USA.
- Whitford M. F., R. M. Teather & R.J. Foster. 2001. Phylogenetic analysis of methanogens from the bovine rumen. Biomedcentral microbiology 1-5.
- Wolin M.J. 1960. A theoretical rumen fermentation balance. J. Dairy Sci. 43:1452 - 1459.
- Wolin M.J., T.L. Miller & C.S. Stewart. 1997. Microbe- microbe interactions. Pp: 467-491. In: Hobson, P.N., C.S Stewart. (eds). The rumen microbial ecosystem. Eds. P.N. Hobson and Stewart. Blackie Academic and Professional. London.
- Yang SL, Bu DP, Wang JQ, Hu ZY, Li D, Wei HY, Zhou LY & JJ. Loo. 2009. Soybean oil and linseed oil supplementation affect profiles of ruminal microorganisms in dairy cows. *Animal* 3: 1562-1569.
- Yokoyama, M.T. & K.A. Johnson. 1988. Microbiología del rumen e intestino. Pp. 137 - 157. In: C.D. Church (ed.), El Rumiente: Fisiología Digestiva y Nutrición.. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España.

Zapata R., L.A. Gutiérrez & D. Polanco. 2012. Role of rumen ciliated protozoa in the synthesis of conjugated linoleic acid. A review. *Rev Colomb Cienc Pecu* 25: 135-149.

Zinder, S.H. 1993. Physiological ecology of methanogens. Pp: 128- 206 *In*: J.G. Ferry (ed.), *Methanogenesis*. Springer.