



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GANADERÍA

PRODUCCIÓN DE GASES DE EFECTO INVERNADERO Y FERMENTACIÓN RUMINAL *IN VITRO* DE FOLLAJES TROPICALES: EFECTO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS.

YESENIA ÁNGELES MAYORGA

TESIS
PRESENTADA COMO REQUISITO
PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO. TEXCOCO, EDO DE MÉXICO

2018

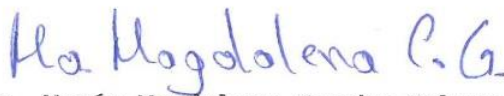
CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe Yesenia Ángeles Mayorga, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser participe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor Dra. María Magdalena Crosby Galván, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis PRODUCCIÓN DE GASES DE EFECTO INVERNADERO Y FERMENTACIÓN RUMINAL IN VITRO DE FOLLAJES TROPICALES: EFECTO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 01 de octubre de 2018



Firma del
Alumno (a)



Dra. María Magdalena Crosby Galván

Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: **Producción de gases de efecto invernadero y fermentación ruminal *in vitro* de follajes tropicales: efecto de los metabolitos secundarios** realizada por la alumna: **Yesenia Angeles Mayorga** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA Mo. Magdalena C. G.

Dra. María Magdalena Crosby Galván

DIRECTORA Mónica Ramírez Mella

Dra. Mónica Ramírez Mella

ASESOR Alfredo Sánchez Viillarreal

Dr. Alfredo Sánchez Viillarreal

ASESOR Jacinto Efrén Ramírez Bribiesca

Dr. Jacinto Efrén Ramírez Bribiesca

Montecillo, Texcoco, Estado de México, octubre de 2018

**Producción de gases de efecto invernadero y fermentación ruminal *in vitro*
de follajes tropicales: efecto de los metabolitos secundarios.**

**Yesenia Ángeles Mayorga, M. en C.
Colegio de Postgraduados: 2018**

RESUMEN

El sector ganadero contribuye con aproximadamente el 14.5 % del total de gases de efecto invernadero, de los cuales el 44% son emisiones de CH₄, el 29% de N₂O y 27% de CO₂. El CH₄ entérico es generado por arqueobacterias en el rumen a través de la reducción del CO₂ con H₂, los cuales son producidos por bacterias, hongos y protozoarios durante sus procesos de fermentación. Se estima que un bovino adulto genera de 250 a 500 L de CH₄ al día lo que representa una pérdida de 2 al 12% de la energía consumida. Al respecto, se han evaluado diversas estrategias para disminuir la producción de metano entérico en los rumiantes, siendo una de ellas el uso de árboles y arbustos forrajeros tropicales los cuales contienen metabolitos secundarios. Un aspecto a resaltar es que la mayoría de las investigaciones enfocadas en evaluar la capacidad antimetanogénica de diversos árboles y arbustos en la alimentación de rumiantes, no consideran los cambios en la microbiota ruminal, aspecto fundamental ya que los microorganismos del rumen son los responsables de proveer bióxido de carbono y H₂ para la síntesis de metano entérico. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue evaluar la producción de metano y bióxido de carbono en la fermentación ruminal *in vitro* de follajes tropicales y su correlación con el contenido de taninos condensados y saponinas. La tesis se divide en dos capítulos. En el capítulo I, se evaluaron *in vitro* follajes de *Leucaena leucocephala*, *Moringa oleifera*, *Albizia lebbeck*, *Enterolobium cyclocarpum*, *Piscidia piscipula*, *Brosimum alicastrum*, *Lysiloma latisiliquum*, *Guazuma ulmifolia*, *Cnidocolus aconitifolius*, *Gliricidia sepium* y *Bursera simaruba*,

así como de un pasto *Cynodon plectostachyus*. Los resultados obtenidos muestran que *G.ulmifolia* posee el contenido más elevado de TC y saponinas (7% y 6.6%, respectivamente), mientras que *M.oleifera* y *C. plectostachius* poseen el contenido más bajo de TC (0.02% y 0.34%, respectivamente). La mayor degradabilidad de la MS a las 72 horas se presentó con *Brosimum alicastrum* (69 %) y *Cnidocolus aconitifolius* (61 %) ($P<0.05$). Los follajes que presentaron menos del 35% de degradabilidad fueron: *Guazuma ulminifolia*, *Piscidia piscipula*, *Leucaena leucocephala*, *Enterolobium cyclocarpum*, *Lysiloma latisulicuum*. Por otro lado, *Cnidocolus aconitifolius*, *Moringa oleífera*, *Brosimum alicastrum* y *Albizia lebbek*, tuvieron mayor concentración de ácidos grasos volátiles (>75 mmol/L). La mayor producción de metano y bióxido de carbono la tuvo *Cynodon plectostachius* (>40 ml/g MS incubada para cada uno), mientras que *Leucaena leucocephala*, *Enterolobium cyclocarpum* y *Lysiloma latisulicuum* produjeron menos de 7 y 15 ml de metano y bióxido de carbono por g de MS incubada, respectivamente. Existe una correlación negativa con la cantidad de taninos condensados y la producción de metano (-0.44), no así entre el contenido de saponinas y la producción de metano (-0.06); sin embargo, sí existe una correlación entre el contenido de taninos condensados y degradabilidad de la materia seca (-0.59). En el capítulo II se evaluaron dos protocolos de extracción de DNA a partir de muestras de líquido ruminal con la finalidad de seleccionar un protocolo y emplearlo para la evaluación de los cambios en las poblaciones microbianas mediante PCR digital mediante los genes ribosomales e ITS. Se optimizó el protocolo de Yu-Morrison y éste se utilizó para probar los oligonucleótidos en una reacción de PCR de punto final.

Palabras clave: metano, follajes tropicales, taninos condensados y saponinas.

**Greenhouse gases production and ruminal fermentation in vitro tropical
foliages: effect of secondary metabolites**

**Yesenia Ángeles Mayorga, M. en C.
Colegio de Postgraduados: 2018**

ABSTRACT

Cattle production contributes around 14.5 % of the total Green House Gases emissions of which 44 % correspond to CH₄, 29% to N₂O and 27% to CO₂. Enteric CH₄ is produced by archae living in the rumen through the reduction of CO₂ with H₂ derived from fermentation byproduct from bacteria, fungi and protozoa. Cattle produces between 250 – 500 L of CH₄ daily which represents a loss of 2- 12% of the consumed energy intake. Several strategies to diminish CH₄ production in ruminants have been evaluated including the use as feed of tropical trees and shrubs fodder that contain diverse secondary metabolites. So far most of the research employing tropical shrubs and trees as fodder in ruminants to evaluate their antimethanogenic effects do not analyze the ruminal microbial population, which are responsible of the CO₂ with H₂ production that serve as the CH₄ building blocks. Thus the present work objective was the evaluation of CH₄ and CO₂ production during ruminal fermentation of fodder from tropical shrubs and trees in an *in vitro* assay and correlate these gases production with the condensed tannin and saponin fodder content. This thesis is divided in two chapters. In chapter number I, fodder from *Leucaena leucocephala*, *Moringa oleifera*, *Albizia lebbbeck*, *Enterolobium ciclocarpum*, *Piscidia piscipula*, *Brosimum alicastrun*, *Lysiloma latisiliquum*, *Guazuma ulmifolia*, *Cnidocolus aconitifolius*, *Gliricidia sepium* y *Bursera simaruba*, as well as the grass *Cynodon plectostachyus* were evaluated an *in vitro* fermentation assay. Our results show that *G.ulmifolia* had the highest content of concentrated tannins and saponins (7% and 6.6%, respectively), whereas *M.oleifera* y *C. plectostachius* had the lowest content

of concentrated tannins (0.02% and 0.34%, respectively). Dry matter degradability after 72 hours was higher with *Brosimum alicastrum* (69%) and *Cnidocolus aconitifolius* (61%) ($P < 0.05$). Fodder with less than 35% of degradability were *Guazuma ulminifolia*, *Piscidia piscipula*, *Leucaena leucocephala*, *Enterolobium cyclocarpum*, *Lysiloma latisulicum*. The highest concentration of Volatile Fatty Acid were found in *Cnidocolus aconitifolius*, *Moringa oleifera*, *Brosimum alicastrum* and *Albizia lebbek* with more than 75 mmol/L. As expected *Cynodon plestostachius* had the highest amount of CH₄ and CO₂ production with more than 40 ml/g of dry matter from each one, whereas *Leucaena leucocephala*, *Enterolobium cyclocarpum* y *Lysiloma latisulicum* produced less than 7 and 15 ml/g of CH₄ and CO₂ respectively. Our results showed a negative correlation between condensed tannins and methane production (-0.44), but not between saponin and methane production (-0.06). However condensed tannins and degradability showed a negative correlation (-0.59). In chapter II, two different DNA extractions protocols for ruminal samples were evaluate with the aim to select one and employ it to evaluate changes in the ruminal microbial populations by means of ribosomal and ITS markers with digital PCR. Yu-Morrison protocol was optimized and the obtained DNA was tested with oligonucleotides in a PCR.

Key words: Methane, tropical foliages, condensed tannins and saponins.

DEDICATORIA

Este trabajo de tesis está dedicado especialmente a mi familia, que son mi pilar, mi fuerza, mi motivo de seguir adelante, son lo mejor de mi vida, Sé que siempre cuento con ustedes en las buenas y en las malas.

A mis amigos y compañeros que han compartido parte el camino de la vida, tal vez algunos no los frecuento como antes, pero siempre los llevo en mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca recibida.

Al proyecto 417 “**Análisis Transcriptómico de la Microbiota Ruminal de Bovinos Alimentados con Forrajes Tropicales y su Correlación con la Producción de Gases de Efecto Invernadero**” de la Convocatoria para Atender Problemas Racionales de CONACyT 2015 por su financiamiento.

Al Colegio de Postgraduados por darme la oportunidad de estar dentro del postgrado de Ganadería, y por sus instalaciones donde se realizaron los análisis.

Agradezco a la Dra. María Magdalena Crosby Galván, Dra. Mónica Ramírez Mella, Dr. Alfredo Sánchez Villarreal y el Dr. Jacinto Efrén Ramírez Bribiesca, por su asesoría, paciencia y apoyo, porque he aprendido mucho de ustedes, gracias por los consejos y por todo el apoyo académico, pero sobre todo personal, de verdad les agradezco infinitamente su apoyo cuando más lo necesité, siempre estarán presente en mí.

En esta etapa he conocido muy buenos compañeros y amigos, a los cuales han hecho esta etapa inolvidable. Agradezco infinitamente a los que me ayudaron cada que montaba la técnica DMS, a los que siempre estuvieron conmigo apoyándome y echándome porras cada vez que quería tirar la toalla, siempre estarán en mis recuerdos más preciados. Y bueno a ti Migue, que más te puedo decir (Ya sabes todo de mí), a ti tengo mucho que agradecer que si lo escribo tal vez no termine, y aunque a veces discutimos (ok, muchas veces), sabes que te aprecio muchísimo y sé que este es el fin de nuestro andar juntos, gracias por TODOS los momentos juntos.

CONTENIDO

RESUMEN	iv
ABSTRACT	vi
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE CUADROS	xiv
ABREVIATURAS.....	xvi
1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1 Planteamiento del problema	4
2. OBJETIVOS.....	6
2.1 Objetivo General	6
2.2 Objetivos específicos	6
3. HIPÓTESIS.....	7
4. REVISIÓN DE LITERATURA	8
4.1 Producción de GEI en la ganadería a nivel mundial	8
4.2 Producción de GEI en México.....	9
4.3 Metano en la atmósfera	10
4.4 Características físico-químicas del rumen	11
4.5 Microorganismos del rumen.....	12
4.5.1 Bacterias.....	12
4.5.2 Hongos	12
4.5.3 Protozoarios.....	13
4.5.4 Arqueas	14
4.6 Metanogénesis.....	16
4.7 Metano entérico	18
4.8 Estrategias para mitigar la producción de metano	19
4.8.1 Eliminación de protozoarios ruminales	20
4.8.2 Ionóforos.....	21
4.8.3 Uso de grasas.....	22
4.8.4 Vacunas antimetanogénicas.....	22
4.8.5 Análogos a la Coenzima M.....	23
4.8.6 Compuestos nitrogenados	23

4.8.7 Metabolitos secundarios	24
4.9 Plantas y arbustos con potencial forrajero	26
4.10 Técnicas de identificación de microorganismos ruminales.	28
4.11 Electroforesis y Espectrofotometría de ácidos Nucleicos.....	30
4.12 PCR	31
5 LITERATURA CITADA	33
CAPITULO I. DIGESTIBILIDAD Y PRODUCCIÓN DE GAS <i>IN VITRO</i> DE LOS ÁRBOLES Y ARBUSTOS FORRAJEROS	40
1.1 INTRODUCCIÓN	40
1.2 MATERIALES Y MÉTODOS	42
1.2.1 Ubicación	42
1.2.2 Tratamientos	42
1.2.3 Análisis químicos	43
1.2.4 Fermentación <i>in vitro</i> de la MS	43
1.2.5 Degradabilidad <i>in vitro</i> de la MS y MO.....	44
1.2.6 PG de follajes tropicales <i>in vitro</i>	45
1.2.7 Determinación de CH ₄ y CO ₂ por cromatografía de gases	46
1.2.8 Determinación de metabolitos secundarios: Taninos condensados	47
1.2.9 Determinación de metabolitos secundarios: Taninos condensados	49
1.2.10 Concentración de nitrógeno amoniacal en la fermentación <i>in vitro</i>	49
1.2.11 Cálculos y análisis estadístico	50
1.2.11.1 Energía metabolizable	50
1.2.11.2 Modelo experimental	51
1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	52
1.3.1 Degradación de la materia seca (DMS) y la materia orgánica (DMO) ...	53
1.3.2 Comportamiento de la PG en la fermentación <i>in vitro</i> de follajes tropicales y la producción de metano y bióxido de carbono.....	55
1.3.3 Producción de AGVs en la fermentación <i>in vitro</i> de follajes tropicales ..	57
1.4 CONCLUSIONES	62
1.5 LITERATURA CITADA.....	63

CAPITULO II. DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS RUMINALES POR MÉTODO DE LA PCR PUNTO FINAL.....	67
2.1 INTRODUCCIÓN	67
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	68
2.2.1 Colecta de la muestra de la fermentación <i>in vitro</i> de follajes tropicales.	68
2.2.2 Extracción de DNA de microorganismos ruminales de la fermentación <i>in vitro</i> de follajes tropicales.....	70
2.2.3 Electroforesis	80
2.2.4 Reacción de PCR.	80
2.3 RESULTADOS.....	83
2.3.1 Cuantificación por espectrofotometría	83
2.4 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	93
2.5 LITERATURA CITADA.....	94
CONCLUSIÓN GENERAL	95
APÉNDICE 1.....	96
APÉNDICE 2.....	98
APÉNDICE 3.....	100
APÉNDICE 4.....	101
APÉNDICE 5.....	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Emisiones globales de GEI de las cadenas de suministro ganadero	9
Figura 2. Emisiones de GEI provenientes de la ganadería, por producto y regiones.	10
Figura 3. Ruta metanogénica a partir del H ₂ y CO ₂	18
Figura 4. DNA de microorganismos ruminales obtenido mediante distintos protocolos de extracción.	85
Figura 5. DNA de microorganismos ruminales extraído con variaciones de los protocolos de Yu-Morrison, 2004 y Wilson, 1990.....	87
Figura 6. DNA de microorganismos ruminales extraído por el el método de Wilson, 1990 versión 3 y Yu-Morrison, 2004 versión 4..	88
Figura 7. DNA de microorganismos ruminales extraído con el método de Yu y Morrison, 2004 optimizado.....	89
Figura 8. DNA de microorganismos ruminales extraído con el método de Wilson, 1990 optimizado.....	90
Figura 9. DNA de microorganismos ruminales obtenidos de las fermentaciones <i>in vitro</i> con los protocolos optimizados.....	91
Figura 10. Amplificación del gen 16S rRNA con el oligonucleótido universal para bacteria a partir del DNA extraído de las fermentaciones <i>in vitro</i> de follajes tropicales.....	92

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Efecto de la defaunación en la producción de CH ₄ en experimentos <i>in vivo</i>	21
Cuadro 2. Composición química de árboles y arbustos forrajeros tropicales.	43
Cuadro 3. Cinética de la DMS <i>in vitro</i> de la materia seca de follajes tropicales en.....	54
Cuadro 4. Cinética de la DMO <i>in vitro</i> de follajes tropicales en mg/g MS.....	54
Cuadro 5. Comportamiento de la PG en la fermentación <i>in vitro</i> de follajes tropicales (mL /g MS) a través del tiempo.....	55
Cuadro 6. Producción de CH ₄ , CO ₂ y parámetros de la PG de la fermentación <i>in vitro</i> de follajes tropicales.	57
Cuadro 7. Características de la fermentación <i>in vitro</i> de árboles y arbustos tropicales a las 72 horas.	58
Cuadro 8. Componentes de la reacción de PCR.....	81
Cuadro 9. Condiciones de PCR.....	81
Cuadro 10. Oligonucleotido Universal para bacteria.	82
Cuadro 11. Concentración y pureza de DNA de microorganismos ruminales, extraído mediante el protocolo versión 1 de Yu y Morrison (2004).	84
Cuadro 12. Concentración y pureza de DNA de microorganismos ruminales, extraído mediante el protocolo de Yu y Morrison (2004; versión 2) y Wilson (1991; versión 1).....	84
Cuadro 13. Concentración y pureza de DNA de microorganismos ruminales, extraído mediante el protocolo Wilson (1991; versión 2).	84
Cuadro 14. Concentración y pureza de DNA de microorganismos ruminales extraído mediante el protocolo Yu y Morrison (versión 3).	86

Cuadro 15. Concentración y pureza de DNA de microorganismos ruminales extraído mediante el protocolo Wilson (versión 3).	86
Cuadro 16. Concentración y pureza de DNA de líquido ruminal extraído mediante el protocolo de Yu y Morrison y Wilson	88
Cuadro 17. Concentración y pureza de DNA de microorganismos ruminales, obtenido mediante el protocolo de Yu y Morrison optimizado.	89
Cuadro 18. Concentración y pureza de DNA de microorganismos ruminales, obtenido mediante el protocolo de Wilson optimizado.	90
Cuadro 19. Concentración y pureza de DNA de microorganismos ruminales, del pool de las tres etapas de la primera colecta.	91

ABREVIATURAS

A	Adenina
AGV's	Ácidos grasos volátiles
Cen	Ceniza
CFC	Clorofluorcarbonos
CH₄	Metano
C	Citosina
CO	Monóxido de carbono
CO₂	Dióxido de carbono
CoB	Coenzima B
CoM	Coenzima M
DMS	Degradabilidad de la materia seca
DMO	Degradabilidad de la materia orgánica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	deoxinucleósido trifosfato
EE	Extracto etéreo
FDA	Fibra detergente ácido
FDN	Fibra detergente neutro
FP	Factor de partición
GEI	Gases de efecto invernadero
G	Guanina
H₂	Hidrógeno
HCl	Ácido clorhídrico

MO	Materia orgánica
mp	millipore
MS	Materia seca
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NH₄	Amonio
N-NH₃	Nitrógeno amoniacal
N₂O	Óxido nitroso
NO₃	Nitrato
3NOP	3 Nitroxipropanol
O₃	Ozono
OH⁻	Radical hidroxilo
PC	Proteína cruda
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase chain reaction)
PG	Producción de gas
RCC	Rumen Cluster C
SDS	Dodesil sulfato de sodio
SIAP	Sistema de información agroalimentaria y pesquera
T	Timina
TC	Taninos condensados
TH	Taninos hidrolizables
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

De acuerdo con la Gerber (2013), se prevé un gran crecimiento demográfico para el año 2050 que alcanzará los 9600 millones de habitantes y, por consiguiente, un incremento del 73% y 58% en el consumo de leche y carne, respectivamente, provocando un incremento en la cantidad de GEI emitidos al ambiente proveniente de fuentes antropogénicas. Los principales GEI son CO₂, CH₄, N₂O, CFC y O₃, llamados así a los gases que se acumulan en la atmósfera terrestre y son capaces de absorber la radiación infrarroja del sol, aumentando y reteniendo el calor (Moss *et al*, 2010), siendo responsables de uno de los problemas climáticos más serios a los que se enfrenta la población a nivel mundial.

Cabe destacar que el sector ganadero es uno de los principales involucrados en la producción de estos gases contribuyendo con aproximadamente el 14.5 % del total de GEI, de los cuales el 44% son emisiones de CH₄, el 29% de N₂O y 27% de CO₂ (Gerber *et al.*, 2013). Dentro del sector pecuario, a nivel global los rumiantes producen aproximadamente 80 Tg de CH₄ anualmente que representan el 33% de las emisiones de origen antropogénico (Beauchemin *et al.*, 2008). El CH₄ tiene un periodo de vida media de 12.4 años (Hill *et al.*, 2016) y un efecto de calentamiento 28 veces mayor que el CO₂ (Roehe *et al.*, 2016).

El CH₄ entérico es generado por arqueobacterias en el rumen a través de la reducción del CO₂ con H₂, los cuales son producidos por bacterias, hongos anaeróbicos y protozoos durante sus procesos de fermentación (Bodas *et al.*, 2012). Se estima que un bovino adulto genera de 250 a 500 L de CH₄ al día lo que

representa una pérdida de 2 al 12% de la energía consumida, ya que existe una relación negativa entre la producción de CH₄ entérico y la energía proveniente de la alimentación (Johnson y Johnson, 1995). Las vías de eliminación de CH₄ en los rumiantes son a través del eructo, por la respiración y en menor cantidad, como flatulencias (Cobellis *et al.*, 2016).

Debido a lo anterior, si se reducen las emisiones de CH₄ en los rumiantes, se contribuiría en la disminución de la tasa de calentamiento global. Al respecto, se han descrito diversas estrategias para reducir dichas emisiones, entre las cuales se incluyen la modificación de la composición de la dieta (aumento de la tasa de pasaje, mayor cantidad de propionato frente al acetato) (Meale *et al.*, 2012), la utilización de antibióticos (ionóforos, bacteriófagos) (Beauchemin *et al.*, 2008), vacunas antimetanogénicas, inhibidores enzimáticos (compuestos análogos a Mcr) (Patra *et al.*, 2017) y aditivos alimenticios como grasas (Bodas *et al.*, 2012), aceites (Cobellis *et al.*, 2016), nitratos (Olijhoek *et al.*, 2015) y metabolitos secundarios, como taninos condensados y saponinas, presentes en diversas plantas (Bodas *et al.*, 2012; Patra, 2012). Estos últimos tienen actividad antimicrobiana y reducen la disponibilidad de H₂, el cual es usado por las arqueas metanogénicas para producir CH₄ (Hook *et al.*, 2010). Al respecto, Delgado *et al.* (2012) mencionan que el follaje de *Albizia lebbbeck*, *Leucaena leucocephala*, *Moringa Oleifera* y *Gliricida sepium*, mezclado al 30% con *C.nlemfuensis* produce 91 %, 74 %, 61 % y 55 % menos CH₄, respectivamente, que el *C. nlemfuensis* solo.

En el segundo capítulo se analizaron y probaron dos protocolos de extracción de DNA a partir de muestras de líquido ruminal previamente publicados (Wilson *et*

al., 1990 y Yu-Morrison, 2004) con la finalidad de seleccionar aquel del cual se obtuviera DNA de mejor calidad y en mayor cantidad. La extracción de ácidos nucleicos permite identificar y cuantificar las poblaciones microbianas que habitan el rumen (bacterias, hongos, protozoarios y arqueas metanogénicas) mediante PCR sin necesidad de su aislamiento. Por lo tanto esta herramienta de la biología molecular nos permite evaluar el efecto de dietas y en nuestro caso particular de follajes en la microbiota ruminal. Actualmente, con el uso del PCR en ensayos de fermentación ruminal *in vitro* e *in vivo*, se identifican las poblaciones microbianas que son alteradas por un estímulo o dieta y por lo tanto hacer un análisis holístico de los resultados de fermentación y producción de gas con la presencia y actividad microbiana.

Por lo todo anterior, el objetivo de esta investigación fue evaluar la producción de CH₄ y CO₂ en la fermentación ruminal *in vitro* de follajes tropicales y su correlación con el contenido de taninos condensados y saponinas, así como establecer un protocolo de extracción de DNA de rutina para la futura evaluación de poblaciones microbianas de estos ensayos.

1.1 Planteamiento del problema

México, al ser un país con gran diversidad climática, provee gran variedad de árboles y arbustos con potencial forrajero de alto valor nutricional, que además, pueden tener la capacidad de disminuir las emisiones de GEI en los rumiantes, los cuales contribuyen de manera importante al cambio climático. Estos árboles y arbustos forrajeros, al contener diversos metabolitos secundarios, como taninos y saponinas (principalmente), pueden utilizarse como modificadores ruminales para reducir la producción de CH₄. Especies como *Leucaena leucocephala*, *Moringa oleifera* y *Gliricida sepium* han sido ampliamente estudiadas; sin embargo, otras como *Cnidocolus aconitifolius* o *Bursera simaruba* no han sido analizadas a profundidad. Por ello, es importante seguir evaluando los diferentes árboles y arbustos forrajeros del trópico mexicano con el objetivo de conocer su potencial en la disminución de los GEI, contribuyendo así en la producción animal sustentable, sin repercutir en la economía del productor.

Por otro lado, a nivel nacional, la mayoría de las investigaciones enfocadas en la capacidad antimetanogénica de diversos árboles y arbustos en la alimentación de rumiantes, no consideran los cambios en la microbiota ruminal, aspecto fundamental ya que los microorganismos del rumen son responsables de proveer los sustratos (CO₂, H₂, CO, formiato, acetato, metanol, metilamina) y de sintetizar el CH₄ entérico. Lo anterior, se debe a que sólo se han cultivado y caracterizado por técnicas convencionales menos de 100 especies. Actualmente a través de técnicas moleculares basadas en DNA se han identificado más de 400 filotipos, los cuales permiten un mejor entendimiento de la fisiología ruminal. Dada la importancia

de los microorganismos en el rumen, se deben seguir analizando su comportamiento, para así poder conocer el efecto de los follajes forrajeros en los rumiantes.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Evaluar la producción de CH₄ y CO₂ en la fermentación ruminal *in vitro* de follajes tropicales y su correlación con el contenido de taninos condensados y saponinas, así como establecer un protocolo de extracción de DNA de rutina para la futura evaluación de poblaciones microbianas de estos ensayos.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar el contenido nutricional de los follajes y arbustos forrajeros (MS, PC, EE, C, FDN y FDA).
- Evaluar la presencia de metabolitos secundarios (taninos condensados y saponinas) de los follajes.
- Evaluar *in vitro* la producción de CH₄ y CO₂ de los follajes.
- Determinar la digestibilidad de MS y MO *in vitro*.
- Evaluar fermentación ruminal (AGV y N-NH₃).
- Evaluar y establecer un protocolo de extracción de DNA a partir de muestras de líquido ruminal
- Verificar mediante PCR que el DNA extraído y los pares de oligonucleótidos pueden emplearse en ensayos de identificación microbiana.
- Correlacionar la presencia de saponinas y taninos condensados con la producción de CH₄, CO₂ y la digestibilidad de la MS y MO.

3. HIPÓTESIS

Los follajes tropicales tienen el potencial para disminuir la producción de CO₂ y CH₄ de manera *in vitro*, debido a los metabolitos secundarios presentes en ellos.

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Producción de GEI en la ganadería a nivel mundial

De acuerdo con el Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (IPCC) en el año 2007, el suministro energético representó aproximadamente el 26% de las emisiones de GEI, la industria el 19%, gases emitidos por el cambio en los usos del territorio y la silvicultura el 17%, la agricultura el 14.3 %, el transporte el 13%, el sector residencial, comercial y de servicios el 8% y los residuos el 3%. En 2013, se reportó que el sector agropecuario emitió cerca del 18 % del total de las emisiones de los GEI de origen antropogénico (Hristov *et al.*, 2013). De los gases producidos en la agricultura, el 44% son emisiones de CH₄, 29% de N₂O y 27% de CO₂, siendo la principal fuente de emisión el CH₄ entérico con 39.1 %, como se muestra en la Figura 1. Del total de las emisiones de CH₄ entérico, el ganado bovino contribuye con aproximadamente 4.6 gigatoneladas de CO₂-eq, que representan el 65%. En menor medida se encuentran los cerdos, las aves de corral, los búfalos y los pequeños rumiantes, cuya contribución representa, cada uno, del 7 % al 10% de las emisiones del sector pecuario (ver Figura 2) (Gerber *et al.*, 2013).

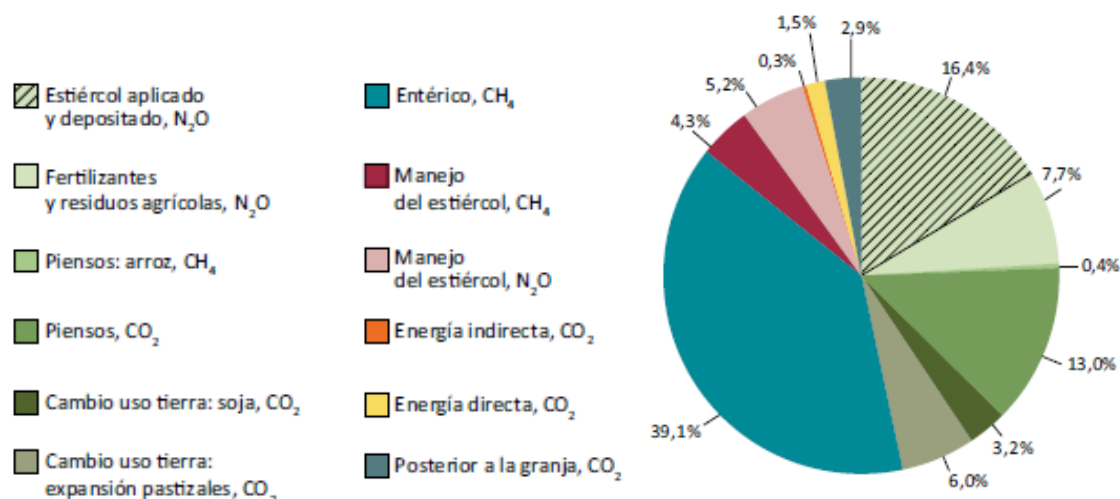


Figura 1. Emisiones globales de GEI de las cadenas de suministro ganadero. Tomado de Gerber *et al.*, 2013.

4.2 Producción de GEI en México

En México, en el periodo comprendido de 1990-2010, se reportó un promedio de 89,129.01 Gg de CO₂ eq. de las emisiones totales en la categoría de agricultura, del cual 44, 072 CO₂ eq. lo emite el sector agropecuario, que representa el 49.45%. De éste total 6,813 Gg de CO₂ eq se originaron por fermentación entérica y 1,105 Gg de CO₂ eq por manejo del estiércol (SEMARNAT, 2013).

En 2013, el sector agropecuario contribuyó con el 12% de las emisiones totales de GEI a nivel nacional, que corresponde a 80,169.09 Gg de CO₂ eq. De este total, 51,208.1 Gg de CO₂ eq se produjeron por fermentación entérica, lo que representa el 63% del total (INECC, 2015). Cabe señalar que el Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) reportó en 2016 un total de 33,779,290 cabezas de ganado: 31,289,594 ganado productor de carne y 2,489,696 ganado productor de leche; 8,792,663 ovinos y 8,755,204 caprinos.

■ Pequeños rumiantes (leche y carne) ■ Pollos ■ Cerdos ■ Leche de vacuno ■ Carne de vacuno

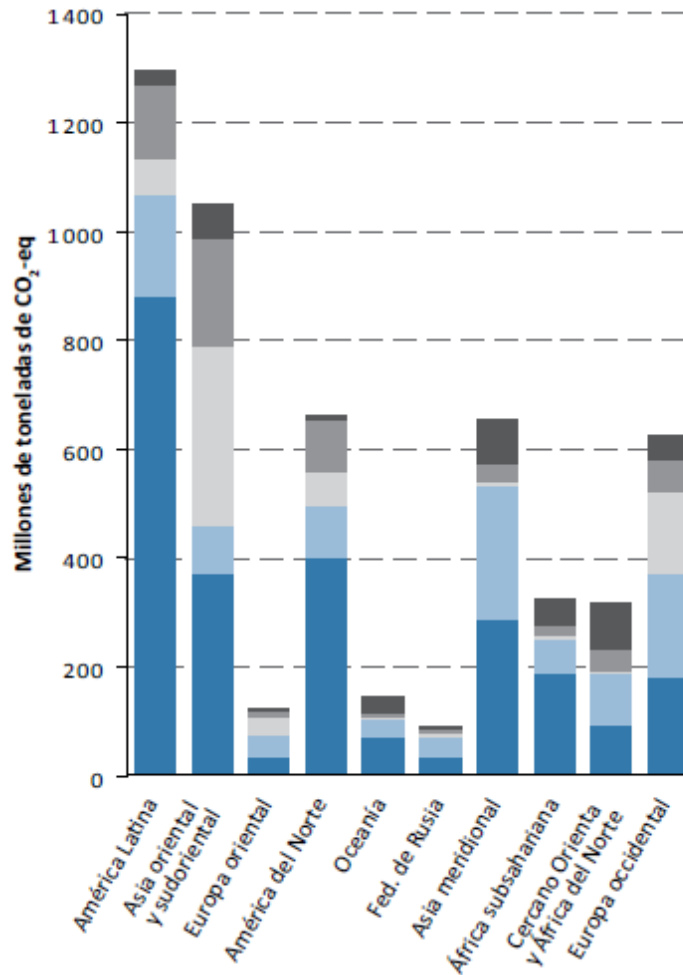


Figura 2. Emisiones de GEI provenientes de la ganadería, por producto y regiones. Tomado de Gerber *et al.*, 2013

4.3 Metano en la atmósfera

Se ha observado en los últimos 150 años que las concentraciones atmosféricas de CH₄, clorofluorocarbonos y N₂O se han incrementado notablemente y están teniendo un impacto en muchas especies de plantas y animales en todo el mundo (Olesen y Bindj, 2002). Johnson y Johnson (1995), señalan que el CH₄ participa directamente en los efectos climáticos por su interacción con la energía

infrarroja e indirectamente a través de las reacciones de oxidación atmosféricas, ya que el CH₄ reacciona con el OH⁻ en la troposfera, esta oxidación por OH⁻ conduce a la formación de formaldehído, CO y óxidos de nitrógeno, los cuales contribuyen al calentamiento global (Hill *et al.*, 2016).

El CH₄ tiene un potencial de calentamiento global (medida relativa de la cantidad de calor que puede atrapar en la atmósfera) 28 veces más que CO₂ (Roehe *et al.*, 2016) y se estima que su vida media en la atmósfera es de 12.4 años (Hill *et al.*, 2016).

4.4 Características físico-químicas del rumen

Como se ha mencionado, los rumiantes son los principales productores de CH₄ entérico, el cual se produce mediante la metanogénesis, proceso que se realiza principalmente en el rumen. En el retículo-rumen se degradan la mayor parte de los carbohidratos estructurales (hemicelulosa y celulosa) y no estructurales (almidón y azúcares simples) por acción de los microorganismos ruminales (Lovett *et al.*, 2006; Hill *et al.*, 2016).

Los microorganismos del rumen necesitan ciertas condiciones ruminales para un desarrollo adecuado, tales como: pH de 6.1 a 7.2, temperatura de 38 - 42 °C (Hill *et al.*, 2016), osmolaridad de 260- 340 mOsm/kg (Callaghan *et al.*, 2015) y potencial redox de -300 a -350 mV (Hill *et al.*, 2016).

4.5 Microorganismos del rumen

Se estima que entre el 60 y 90% del alimento consumido por un rumiante se digiere en el rumen por intervención de bacterias, protozoarios, hongos y arqueas. El porcentaje de degradación depende de las características fisicoquímicas del rumen, del tipo dieta, tasa de pasaje, edad del follaje, entre otras.

4.5.1 Bacterias

La concentración de bacterias en el rumen oscila de 10^{10} a 10^{11} bacterias por mL^{-1} de fluido ruminal (Cobellis *et al.*, 2008). La mayoría de las especies de bacterias son anaerobias estrictas y gramnegativas, con formas variadas (coco, cocobacilos, espiroquetas, bacilos, espongiiformes y treponemas). Son las principales responsables de la degradación de la digesta en el rumen. De acuerdo a su capacidad para degradar sustratos, las bacterias ruminales se clasifican en celulolíticas, hemicelulolíticas, amilolíticas, proteolíticas, ureolíticas, utilizadoras de amonio, lípidos y ácidos orgánicos (Cobos y Shimada, 2015; Madigan, 2015).

La comunidad microbiana del rumen es muy diversa pero la mayoría de estos microorganismos aún no se han cultivado por técnicas convencionales; sin embargo, gracias al uso de técnicas de biología molecular se estiman alrededor de 300 a 400 filotipos de bacterias ruminales (Morgavi *et al.*, 2010).

4.5.2 Hongos

La concentración de los hongos en el rumen es menor a 10^4 zoosporas por mL^{-1} de fluido ruminal (Cobellis *et al.*, 2008). Se conocen cinco géneros

Anaeromyces, *Caecomyces*, *Neocallimastix*, *Orpinomyces* y *Piromyces* (Cobos y Shimada, 2015). Patra *et al.* (2017) mencionan que los hongos tienen una asociación con los metanógenos, ya que se han observado por técnicas de PCR a algunas especies de *Methanobrevibacter* en cultivos de *Pyromyses*, *Anaeromyces* y *Neocallimastix*. Los hongos contienen hidrogenosomas que generan lo H₂, que son necesarios para la metanogénesis.

4.5.3 Protozoarios

Los protozoarios del rumen se encuentran en una concentración de 10⁴ a 10⁶ por mL⁻¹ de fluido ruminal (Cobellis *et al.*, 2008). De acuerdo a su morfología se clasifican en ciliados y flagelados. Los protozoarios ciliados pertenecen a dos órdenes: Vestibuliferida y Entodinomorphida, y por morfología clásica se han identificado más de 250 especies (Morgavi *et al* 2010). A su vez, los protozoarios flagelados, pertenecen al orden: Tritrichomonas, Tetratrichomonas, Pentatrichomonas, Chilomastix, Monocercomonoides y Monocercomonas (Cobos y Shimada, 2015).

De acuerdo con Lin *et al* (2015), Entodinium es el grupo más abundante de ciliados, representando más del 40% de los protozoarios totales. El segundo grupo ciliado más grande varió en diferentes muestras, con *Isotricha*, *Polyplastron* o *Dasytricha* siendo los géneros más dominantes después de Entodinium. Los protozoarios ciliados son metabólicamente muy activos, capaces de influir en la fermentación del alimento y otras poblaciones microbianas; en consecuencia, puede afectar la cantidad y proporción de los productos finales de la fermentación ruminal

(Morgavi *et al.*, 2010). Los protozoarios realizan la fermentación e hidrólisis de la materia orgánica ingerida, mediante vacuolas digestivas. Dado que pueden influir en la fermentación ruminal, no son esenciales para el rumiante, ya que al defaunarlos, el rumiante no muere (Newbold *et al.*, 2015).

4.5.4 Arqueas

Attwood *et al.* (2011) menciona que dentro del dominio de las arqueas, en el phylum Euryarchaeota se encuentran las metanogénicas las cuales se dividen en las siguientes órdenes: Methanobacteriales, Methanosarcinales, Methanomicrobiales, Methanococcales y Methanopyrales.

Los principales géneros de arqueas metanógenas que se encuentran en el rumen son *Methanobrevibacter*, *Methanomicrobium* y *Methanosphaera* y en menor proporción *Methanosarcina* y *Methanomassiliicoccales* (RCC) (Attwood *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2015). Dentro de las principales especies se encuentran *Methanobacterium formicum*, *Methanobacterium bryantii*, *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobrevibacter smithii*, *Methanomicrobium mobile*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanoculleus olentangyi*. (Puniya *et al.*, 2015; Attwood *et al.*, 2011).

Anteriormente, se creían que las arqueas eran bacterias, pero estudios recientes mencionan que están dentro del grupo de las arqueas, siendo éstas conocidas como arqueobacterias, las cuales residen en el rumen y algunos segmentos del intestino, donde reducen el CO₂, ácido fórmico o metilamidas a CH₄ mediante la metanogénesis (Patra *et al.*, 2017; Morgavi *et al.*, 2010).

Los metanógenos pertenecen al dominio Arquea y al *phylum Euryarchaeota* y, a diferencia de las bacterias, los metanógenos carecen de peptidoglicanos: en su lugar tienen pseudomereina en *Methanobrevibacter* y *Methanobacterium*, heteropolysaccharido en *Methanosarcina* y proteína en *Methanomicrobium* (Hook *et al.*, 2010).

Para producir CH₄, las arqueas pueden usar dos rutas: la ruta predominante es la hidrogenotrófica que utiliza los H₂ como principal donador de electrones y el CO₂ como fuente de carbono (Morgavi *et al.*, 2010), la ruta acetoclástica se da en menor proporción, a pesar de las altas concentraciones de acetato en el rumen (Patra *et al.*, 2017). En la ruta hidrogenotrófica las arqueobacterias emplean H₂ como donador de electrones y como aceptor al CO₂ principalmente, sin embargo, también pueden usar formato (HCOO⁻), acetato (CH₃COO⁻), metanol (CH₃OH), metilamina (CH₃NH₂) y CO como aceptores de electrones. Los metanógenos utilizan hidrógeno metabólico para la reducción y la reoxidación de NADH, NADPH y FADH a NAD⁺, NADP⁺ y FAD⁺, para producir ATP (Hill *et al.*, 2016; Cottle *et al.*, 2011).

Algunos metanógenos viven libres en el rumen y se adhieren a las partículas de alimento, en menor porcentaje viven en ectosimbiosis con protozoarios ya que los protozoarios tienen hidrogenosomas que producen H₂ por oxidación del malato (Patra *et al.*, 2017), como los metanógenos utilizan éstos H₂ para la producción de CH₄, la concentración de H₂ se mantiene en niveles bajos en el rumen (Kumar *et al.*, 2011; Hill *et al.*, 2016).

4.6 Metanogénesis

La metanogénesis es la producción biológica de CH₄. Se realiza en la fase terminal de la biodegradación de la materia orgánica (Bodas *et al.*, 2012), mediante la interacción de las arqueas con bacterias, hongos o protozoarios. Algunas relaciones que se han registrado son *Clostridium cellulobiparus-Methanobrevibacter ruminantium*, *Ruminococcus flavefaciens-Methanobrevibacter ruminantium*, *Entodinium caudatum-Methanobrevibacter ruminantium*, *Neocallimastix frontalis-Methanobrevibacter ruminantium*, entre otras (Attwood y McSweeney, 2008).

En el rumen se lleva a cabo la fermentación de alimentos ricos en celulosa y almidón por acción de los microorganismos ruminales, produciendo AGV's de cadena corta (acetato, propionato y butirato), ácidos de fermentación (lactato), alcoholes (etanol) y succinato. Además, se producen gases como CO₂, H₂ y CH₄ (Hill *et al.*, 2016; Patra *et al.*, 2017).

Los AGV's se transportan a través del rumen y las paredes omasales y son utilizados por el animal, satisfaciendo sus necesidades energéticas en un 80% aproximadamente, el 90 a 95% de gas producido se libera a través de eructos principalmente. Cabe señalar que solo el 10-15 % es expulsado a través de la respiración y por flatulencias (Cobellis *et al.*, 2016). La eliminación del H₂ metabólico es a través de la producción de AGV's o la conversión a CH₄ (Hill *et al.*, 2016).

En la metanogénesis ruminal participan dos clases de enzimas: las que transportan la unidad C₁ a lo largo de la ruta de reducción y las que donan

electrones. Dentro de las que transportan la unidad C_1 se encuentran la metanopterina, que es una coenzima que desempeña una función análoga a la del tetrahidrofolato portando la unidad C_1 en las etapas intermedias de la reducción de CO_2 a CH_4 . La CoM (2-mercaptoetanosulfonato) se encarga de reducir el grupo metil (CH_3) a CH_4 . La coenzima F_{430} no es portador de C_1 , pero participa en la etapa final de la metanogénesis catalizada por la enzima metil reductasa, donde el grupo metilo se une a Ni en F_{430} antes de su reducción a CH_4 (Kumar *et al.*, 2009; Hill *et al.*, 2016).

Como donadores de electrones están la coenzima F_{420} , la cual dona electrones en varios pasos de la reducción de CO_2 . Se llama F_{420} porque en su forma oxidada absorbe la luz a 420 nm y emite fluorescencia azul verdosa. Esta fluorescencia resulta útil para la identificación de metanógenos mediante microscopia (Kumar *et al.*, 2011).

El proceso de metanogénesis a partir de CO_2 y H_2 tiene un inicio cuando el CO_2 es activado por una enzima que contiene metanofunaro y es reducido a formilo. El grupo formilo se transfiere del metanofurano a una enzima que contiene metanopterina, es deshidratado y reducido en dos etapas a metileno y metilo. Posteriormente, el grupo metil es transferido por la metil transferasa de la metanopterina a una enzima que contiene CoM. La metil CoM es reducida a CH_4 por parte de la metil reductasa, en ésta reacción son necesarias la F_{430} y la CoB (fosfato de 7-mercaptoheptanoiltreonina). La F_{430} elimina el grupo metilo de la metil CoM para formar un complejo Ni- CH_3 . Este complejo es reducido por CoB a CH_4 y un complejo disulfuro de CoM y CoB (CoM-S-S-CoB) (Attwood y McSweeney, 2008). En la Figura 3 se muestra la ruta de la metanogénesis.

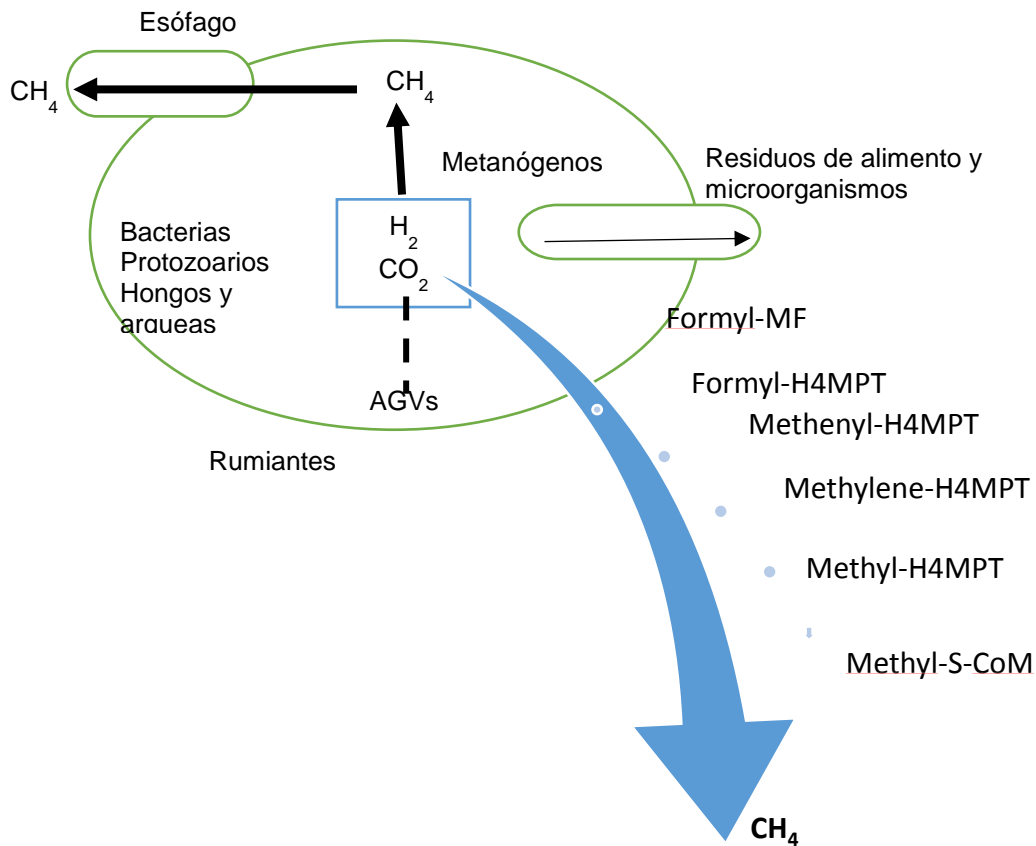
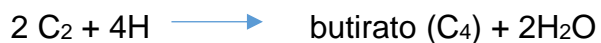
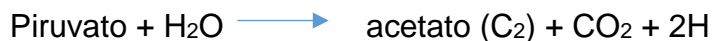
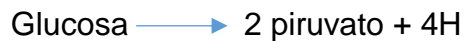


Figura 3. Ruta metanogénica a partir del H_2 y CO_2 . Modificado de Attwood y McSweeny, 2008.

4.7 Metano entérico

El CH_4 entérico es un producto generado por arqueas metanogénicas en el rumen, a través de la reducción de CO_2 con H_2 , principalmente. La reducción de CO_2 actúa como una ruta para la expulsión de H_2 metabólico (Bodas *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2011), generando de 250 a 500 L de CH_4 al día, en caso de los bovinos. Al respecto, Johnson y Johnson (1995) mencionan que la producción de CH_4

representa una pérdida de 2 al 12% de la energía consumida, debido a que las arqueas metanogénicas usan los H₂ para la producción de CH₄, produciendo una relación negativa entre la producción de CH₄ y la producción de energía proveniente de la alimentación. Este porcentaje de pérdida varía principalmente por el nivel de consumo de alimento y la composición de la dieta (Hill *et al.*, 2016). Moss *et al.* (2000) menciona que las vías de fermentación se pueden resumir de la siguiente manera:



4.8 Estrategias para mitigar la producción de metano

Se han estudiado diversas estrategias para disminuir la producción de CH₄. Al respecto, Cottle *et al.* (2011) y Patra (2012) mencionan que al modificar la composición de la dieta (alto contenido de grano o forraje), agregar aditivos como ionóforos (monensina sódica, lasolacida, nigeracina), seleccionar plantas forrajeras con altos contenidos de metabolitos secundarios (taninos y saponinas principalmente), modificar la población de microorganismos en el rumen (vacunas, defaunación, probióticos) o el tracto gastrointestinal (grasas, aceites, antibióticos,

ácidos o sales) se puede disminuir la emisión de CH₄ por parte de los rumiantes. A continuación, se describen algunas de ellas:

4.8.1 Eliminación de protozoarios ruminales

Una de las estrategias que se han estudiado para disminuir la producción de CH₄ en rumiantes consiste en eliminar protozoarios en el rumen, debido a su relación con las arqueobacterias en endosimbiosis o ectosimbiosis, las cuales son responsables de hasta el 37% de la emisión de CH₄ (Cottle *et al.*, 2011; Kumar, 2011; Patra *et al.*, 2017).

Menciona Morgavi *et al* (2010) que los protozoarios ruminales son no son esenciales para los rumiantes, es por ello que la defaunación, que es la eliminación de protozoarios del rumen, ha sido ampliamente utilizada para estudiar el papel de los protozoarios en la metanogénesis. Sin embargo, la eliminación de los protozoarios ruminales puede afectar la digestibilidad ruminal de la MS, la población de arqueobacterias, la proporción de AGV's producidos y disponibilidad de H⁺ (Patra y Saxena, 2009).

Varios autores reportan en sus resultados una disminución en la producción de CH₄ al usar esta estrategia, pero los resultados muestran gran variabilidad entre sí, como se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Efecto de la defaunación en la producción de CH₄ en experimentos *in vivo*.

CH ₄ (g/animal por día)		% de cambio	Animal <i>sp</i>	Dieta
Con protozoarios	Defaunados			
13.4	14.9	11.1	Ovino	Alfalfa seca
13.9	15.1	8.6	Ovino	A base de celulosa
15.7	14.0	-10.8		
8.2	9.1	11.1	Ovino	Almidón nativo
12.0	5.7	-47.5		Hojuelas de almidón
13.4	9.4	-29.9		Almidón y concentrado (3:7)
12.6	13.1	4.0	Ovino	Fibra y concentrado (2:8)
15.6	16.1	3.2	Ovino	Fibra
25.1	18.6	-25.9		Fibra y concentrado (1:1)
31.5	23.9	-24.1	Ovino	Fibra y concentrado (3:1)
16.6	18.2	9.6	Ovino	Silo de maíz, suplementada con grasa protegida
129.6	64.1	-49.6	Bovinos	Cebada con suplemento proteínico
14.3	14.6	2.1	Cabras	Heno
14.1	14.6	3.5		
22.9	17.9	-21.8		Heno Concentrado
18.6	16.4	-11.8		Heno concentrado con monensina

Modificado de Morgavi *et al* (2010).

4.8.2 Ionóforos

Los ionóforos, además de tener un efecto favorable en algunos parámetros productivos que mejoran la eficiencia alimenticia, han sido propuestos como una estrategia para disminuir las emisiones de CH₄ en rumiantes. Los ionóforos son compuestos lipofílicos, tóxicos para microorganismos ruminales (Jerez *et al.*, 2014). Esta toxicidad depende de la capacidad de penetrar las membranas de estos microorganismos alterando el flujo de iones, siendo las bacterias gram positivas más sensibles a los ionóforos por su estructura menos compleja que las bacterias gram negativas. Los ionóforos favorecen a las bacterias que producen propionato,

optimizando los metabolismos energéticos y nitrogenados. La suplementación con monensina también reduce selectivamente formación de acetato y producción de H₂. Moss *et al.* (2000), menciona que al incrementar la cantidad de propionato disminuye la producción de CH₄. La reducción de la producción de CH₄ se ha reportado de 16 a 24%. Los ionóforos que más usados son monensina sódica, lasolacida, nigeracina (Meale *et al.*, 2012).

4.8.3 Uso de grasas

Otra estrategia que se ha implementado para disminuir la producción de CH₄ es el uso de grasa, ya que al incluirla en la dieta disminuye la fermentación de la materia orgánica, la actividad de los protozoarios y metanógenos, disminuyendo la producción de CH₄. Se ha reportado que la disminución de CH₄ en ganado y ovejas disminuyen 3.77% y 4.30% respectivamente con la inclusión de 1% de grasa en la dieta. Las grasas suplementadas hasta con un 6% de la dieta (DM) disminuye apreciablemente las emisiones de CH₄ (15%) en el ganado (Patra *et al.*, 2017). Pero al aumentar la cantidad de grasa disminuye la digestibilidad de la MS. Al respecto, Patra, 2014 menciona que se alcanzó una digestibilidad de 75% con 6.76% de grasa en la dieta. A su vez, Beauchemin *et al* (2008), recomienda que la grasa total no debe superar el 6-7 % de la dieta en base seca.

4.8.4 Vacunas antimetanogénicas

Se ha realizado algunas vacunas contra los metanógenos. Patra *et al.* (2017) mencionan que no son muy eficaces ya que en un estudio realizado solo se disminuyó el 8% comparado con el testigo, esto se atribuyó a que las vacunas se

realizaron de cinco especies de metanógenos, además que las vacunas circulan en la sangre y solo una parte ingresa al rumen a través de la saliva.

4.8.5 Análogos a la Coenzima M

En la metanogénesis, la CoM es el último el donador del grupo metilo, el cual es reducido por la Metil Coenzima M reductasa (Mcr) a CH₄. Al usar compuestos halogenados sulfatados como 2-bromoetanosulfonato, 2-cloroetanosulfonato, 3-bromopropanosulfonato, 4-bromobutanosulfonato, 2-azidoetanosulfonato, allyl-S-Coenzima M y Ciano-S-Coenzima M, los cuales compiten con la CoM, e inhiben la actividad de la Mcr, disminuyendo así la producción de CH₄ (Patra *et al.*, 2017). La disminución varía, ya que algunas especies de metanógenos, son sensibles a éstos análogos, otros son resistentes y otros pueden adaptarse a ellos (Patra *et al.*, 2017).

4.8.6 Compuestos nitrogenados

Los compuestos nitrogenados como NO₃⁻, 3NOP y etill-3NOP tienen actividad antimetanogénica, ya que compiten por el H₂ disponible en el rumen, además que el nitrato en el rumen es reducido a nitrito y de nitrito a amonio, este paso genera -371 kJ de energía, esto lo hace competitivo con el proceso de metanogénesis que genera -67 kJ (Patra *et al.*, 2017). Una vez convertido en amoníaco proporciona nitrógeno para la síntesis de proteína microbiana (Olijhoek *et al.*, 2015; Cottle *et al.*, 2011). Olijhoek *et al.* (2016) realizaron un experimento utilizando diferentes proporciones (0, 5.3, 13.6 y 21.1 g de NO₃/ kg MS) de nitrato, en el cual reportó una reducción de 6, 13 y 23% con respecto al control, además que sus resultados no muestran cambios en la digestibilidad de la MS y consumo,

tampoco se encontró toxicidad en sangre, por parte del nitrato (Van Zijderveld *et al.*, 2010). Por su parte, Cottle *et al* (2011) menciona que el nitrato puede usarse en animales tratados previamente para evitar efectos nocivos; sin embargo, su costo es más elevado que la urea, haciéndolo poco rentable.

4.8.7 Metabolitos secundarios

Se han estudiado diversas plantas y arbustos tropicales, como suplemento alimenticio para rumiantes y a su vez tratar de disminuir la producción de CH₄, ya que las plantas producen una gran variedad de metabolitos secundarios que son moléculas biológicamente activas, que no participan en procesos tales como crecimiento, desarrollo y reproducción de las plantas (Bodas *et al.*, 2012). La mayoría de metabolitos secundarios posee actividad biológica en otros organismos vivos, es decir, que afectan procesos metabólicos y/o la tasa de crecimiento de algunos microorganismos (Patra *et al.*, 2017). Las plantas producen principalmente 3 tipos de compuestos secundarios: nitrogenados, fenólicos y terpenoides.

Los terpenos o terpenoides forman clases estructurales y son funcionalmente diferentes, los cuales se sintetizan a partir de difosfato de isopentenilo (isopreno), y se clasifican en función del número de unidades de isopreno: monoterpenos, molécula con 10 carbonos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30) (Bakkali *et al.*, 2008).

Dentro del grupo de los triterpenos se encuentran el grupo de las saponinas, Muller (2009) las define como glucósidos de alto peso molecular, cuyo efecto anti protozario se atribuye al enlace de las saponinas con el colesterol de la membrana

celular del protozoario, causando su lisis, y dado que aproximadamente el 25 % de los metanógenos están en simbiosis con protozoarios ciliados, la inhibición de la metanogénesis se atribuye principalmente al efecto adverso de las saponinas en los protozoarios ciliados productores de H₂ y en las bacterias celulolíticas, reduciendo la disponibilidad de H₂ para la metanogénesis (Kamra *et al.* 2008; Patra *et al.*, 2017).

Los taninos son compuestos polifenólicos solubles en agua, con un peso molecular entre 500 a > 3000 Da, capaces de ligarse a compuestos de la dieta (proteínas, carbohidratos) de las plantas (Patra y Saxena *et al.*, 2010), esto puede reducir la degradabilidad de algunos nutrientes de la dieta, inhibir la actividad enzimática, disminuir la población de protozoarios causando una disminución de H₂ necesarios para la síntesis de CH₄ (Johnson *et al.*, 2007; Patra *et al.*, 2017). Los taninos generalmente se clasifican en dos grupos los TH y los TC. Los TH son ésteres de azúcar de ácidos gálico y elágico, los cuales son fácilmente hidrolizables con ácidos, agua caliente o enzimas (Torres-Acosta *et al.*, 2008). Los TC o proantocianidinas son principalmente polímeros de flavan-3-ol catequina y unidades de galotanino. Con diversas unidades monoméricas, las cuales determinan el grado de polimerización de di-, tri- y tetraflavonoides a oligómeros superiores. Estos pueden producir una amplia gama de estructuras químicas y producir diferentes propiedades biológicas (Patra y Saxena *et al.*, 2010). Los taninos son específicos de cada planta, variando en estructura estereoquímica, tamaño molecular, forma polimérica y su concentración, estas son algunas características que afectan el valor nutritivo de la dieta y su potencial de disminución de CH₄ (Patra *et al.*, 2017; Hristov *et al.*, 2014). Otra de las características más conocidas de los taninos en los

alimentos es la astringencia que produce en la boca, causada por la precipitación de la mucoproteína salival. Se ha demostrado de manera *in vitro* que una mezcla de 30 % de follaje y 70% de *C. nlemfuensis*, disminuye la producción de CH₄: *Albizia lebbeck* con 91 %, *Leucaena leucocephala*, 74 %, *Moringa Oleifera*, 61 % y *Gliricida sepium*, 55 %, menos CH₄ en comparación al *C. nlemfuensis* (Delgado *et al.*, 2012).

En resumen, los TC disminuyen la producción de CH₄ a través de la reducción en la digestión de la fibra (efecto indirecto) (Patra y Saxena, 2010), mientras que los TH parecen actuar más a través de la inhibición del crecimiento y / o actividad de metanógenos y / o microbios productores de hidrógeno (efecto directo). Se consideran una alternativa viable para disminuir la producción de CH₄, y así mismo, disminuir las pérdidas energéticas en el animal. Esta alternativa toma mayor fuerza en las condiciones de trópico, donde la mayoría de los sistemas de producción ganadera tienen bajos rendimientos debido a las dietas de baja calidad (Carmona *et al.*, 2005).

4.9 Plantas y arbustos con potencial forrajero

En los últimos años han cobrado un gran auge el uso de árboles y arbustos forrajeros, ya que han reportado mayor productividad mediante el sistema silvopastoril, que combinan pastos tropicales con árboles de usos multipropósito (forraje rico en nutrientes, cerco vivo, controlan la erosión, mejoran la fertilidad del suelo, fuente de combustible y sirven para proveer sombra a los animales y plantas) (Torre-Acosta *et al.*, 2008). Algunos árboles y arbustos se han usado para suplementar la dieta de los animales domésticos, principalmente rumiantes, en

particular las leguminosas, ya que poseen características que hacen que sus especies sean altamente valoradas. Una de las características son la capacidad de incrementar la relación proteína-energía, debido a su alto contenido de proteína, además de poseer factores antinutricionales que pueden modificar la velocidad de degradación (Pedraza, 2000) y la población de microorganismos ruminales y, en muchos casos se observa un efecto defaunante por su contenido de metabolitos secundarios.

Por otra parte, la población ganadera continúa en expansión, por el incremento de consumo de productos derivados de la actividad ganadera, en condiciones tropicales es común la baja calidad de las fuentes de forrajes, eso hace necesaria la búsqueda de opciones alimenticias que mejoren los parámetros productivos y se generen menos emisiones de CH₄ a la atmósfera. Se han realizado diversos estudios para evaluar las propiedades fisicoquímicas de follajes tropicales, pero una de las limitantes al analizar a los microorganismos ruminales son que todavía no se han podido cultivar, ya que todavía se desconocen algunas relaciones entre microorganismos ruminales (Delgado *et al.*, 2012).

Está claro que las emisiones de CH₄ y nitrógeno por los rumiantes, se originan en gran medida por la actividad microbiana del rumen, comprender las funciones llevadas a cabo en el rumen es importante para poder reducir estas emisiones (Wallace *et al.*, 2017). Pero una de las limitantes al analizar a los microorganismos ruminales son que todavía no se han podido cultivar, ya que se desconocen algunas relaciones entre los microorganismos. Para ello se han utilizado diversas técnicas de identificación.

4.10 Técnicas de identificación de microorganismos ruminales.

Las técnicas convencionales de cultivo y de conteo de microorganismos son métodos laboriosos y sólo permiten la identificación del 1 al 5 % de los microorganismos. Por lo tanto, en la práctica no sirven para hacer una clasificación filogenética, dado que los microorganismos ruminales, en su mayoría, son anaerobios estrictos y con necesidades de cultivo desconocidas. Se considera que, en hábitats naturales, el número de microorganismos cultivables es de 10 a 100 veces inferior al conteo real (Madigan, 2015). Mediante estos métodos se han llegado a conocer unas 200 especies de bacterias y unas 100 especies de hongos y protozoos, subestimando de manera importante tanto la diversidad microbiana como la abundancia de microorganismos que realmente existen en el rumen. La identificación de especies microbianas se basa en cultivos selectivos, tinciones, observaciones al microscopio o en el estudio de sus actividades metabólicas. (Firkins y Yu, 2006). Estas técnicas presentan muchos inconvenientes: el desconocimiento de necesidades de cultivo de muchos microorganismos, sesgos o errores estadísticos derivados del conteo, problemas asociados al manejo de los medios de cultivo (ausencia de anaerobiosis estricta, cantidad excesiva o deficiente de sustrato o tiempo de incubación demasiado corto).

En la actualidad se usan métodos de identificación de microorganismos basados en los ácidos nucleicos, caracterizándolos mediante marcadores taxonómicos como los genes que codifican para la subunidad 16S del ribosoma bacteriano y en el caso de los protozoos y hongos el que codifica para la subunidad 18S del ribosoma (Stahl *et al.*, 1988). Dado que la síntesis de proteína es una

función conservada en todos los seres vivos, los genes que codifican para el ribosoma bacteriano tienen regiones altamente conservadas, pero poseen regiones intergénicas altamente variables; estas últimas son las utilizadas para clasificar filogenéticamente los microorganismos (Denman y McSweeney, 2006).

El uso del PCR ha sido crucial en el desarrollo de técnicas de caracterización microbiana independientes de los cultivos. El PCR amplifica exponencialmente el DNA que se encuentra en una muestra mediante sucesivos ciclos de desnaturalización, hibridación y polimerización con nucleótidos, con ayuda de una polimerasa. Durante la etapa de desnaturalización las cadenas de DNA son calentadas y separadas durante un tiempo que depende de la secuencia del DNA molde, ya que si el DNA contiene mayor cantidad de G-C, necesitara más tiempo para separar sus uniones. Una vez separadas las hebras de DNA, los primers u oligonucleótidos se alinean al extremo 3' del DNA, y se forma el complejo DNA-primer conocida como la etapa de alineación, durante la cual es importante que la temperatura de hibridación sea la óptima (generalmente de 50°C – 60°C). En la etapa de extensión, la polimerasa actúa sobre el complejo DNA-primer, agregando en dirección 5' a 3' los dNTPs complementarios a la cadena molde para formar las cadenas complementarias y produciendo los amplicones (Tamay de Dios *et al.*, 2013; Valones *et al.*, 2009). Los elementos necesarios para realizar la técnica de PCR son: DNA o DNAc, dNTPs (adenina, timina, guanina, citosina), ion de magnesio, solución buffer, agua y primers. Los primers son una pareja de oligonucleótidos sintetizados de manera que sean complementarios a cada uno de los extremos 3' del fragmento de DNA que se desea amplificar, y deben ser

diseñados para garantizar una alta especificidad y que generen amplicones de un tamaño que variable, pero que normalmente oscila de 100 a 150 pb en la identificación microbiana. Esta técnica tiene limitaciones que deben ser tenidas en cuenta, como la forma de extracción del DNA previa a la realización de la PCR ya que cualquier tratamiento físico o químico de la muestra puede ocasionar variaciones en los resultados o bien la inhibición de la reacción (Henderson *et al.*, 2013). El producto de la PCR se visualiza a través de una electroforesis.

4.11 Electroforesis y Espectrofotometría de ácidos Nucleicos

La electroforesis en gel se utiliza comúnmente para separar moléculas en función de su carga, tamaño y forma. Se trata de un medio de separación especialmente para biomoléculas cargadas como el DNA, el RNA y las proteínas. El gel es una matriz de moléculas de agarosa (generalmente) que se mantienen unidas por puentes de hidrógeno y que forman pequeños poros. Un pozo se reserva para el marcador de peso molecular, éste es un estándar de referencia que contiene fragmentos de DNA de longitudes conocidas. Una vez que se colocan las muestras, se aplica energía eléctrica a la cámara y empieza a fluir corriente a través del gel. Los grupos fosfato del esqueleto de azúcares-fosfato del DNA le otorgan una carga negativa por lo que comienzan a moverse a través de la matriz de gel hacia el polo positivo pero retenidas según su tamaño molecular.

La espectrofotometría es usada para identificar compuestos por su espectro de absorción y conocer la concentración del material o sustancia y por lo tanto permite conocer la concentración de compuestos. La espectrofotometría permite

confirmar que contamos con cantidad suficiente de ácidos nucleicos de calidad debido a que los ácidos nucleicos absorben eficientemente luz ultravioleta debido a la presencia de bases aromáticas nitrogenadas a lo largo de las cadenas de DNA. Los ácidos nucleicos tienen su propio y único espectro de absorción y por lo tanto contribuye de manera diferente a la propiedad total de absorción de UV de una molécula de DNA. Las proteínas tienen un máximo de absorción a 280 nm (A^{280}) principalmente por la presencia de residuos de triptófano y consecuentemente las lecturas a esta longitud de onda pueden mostrar si existe algún contaminante proteico. El cálculo de la relación A^{260} / A^{280} es una manera común para expresar la pureza del DNA. Dependiendo de la composición nucleica, un valor de 1.65 a 1.9 indican una muestra pura y la relación se sitúa en torno a 1.5 - 2.2, una proporción menor de 1.5 indicaría presencia de contaminantes en la muestra.

4.12 PCR

La evolución tecnológica del PCR condujo a la aparición de la PCR en tiempo real, el cual tiene como objetivo detectar y cuantificar las secuencias de ácidos nucleicos mediante el marcaje de éstas con compuestos fluorescentes (en su mayoría SYBR Green) permitiendo la recopilación de datos a medida que corren los ciclos del PCR. La detección de los productos amplificados sucede en cada ciclo de la reacción y la señal de fluorescencia es proporcional a la cantidad de producto de PCR generado. El SYBR Green I es el colorante específico de unión a dsDNA más usado en el PCR tiempo real, ya que su fluorescencia es indetectable cuando no está unida al DNA y su afinidad de unión al DNA es 100 veces mayor que la del

bromuro de etidio (Tamay de Dios *et al.*, 2013; Valones *et al.*, 2009; Ståhlberg *et al.*, 2004).

Si hablamos de PCR en tiempo real, la nomenclatura que se usa es diferente, ya que si se usa DNA genómico es nombrado qPCR y si se obtiene primero el DNA complementario y después se hace PCR, se refiere a RT-PCR. La RT-PCR permite el uso de RNA como molde, el RNA se transcribe de forma inversa en DNA complementario utilizando una transcriptasa inversa. Esto porque el RNA es monocatenario y muy inestable, lo que dificulta el trabajo con este material (Bustin *et al.*, 2005; Denman and McSweeny, 2006; Valones *et al.*, 2009).

Para conocer la concentración de las muestras en qPCR se necesita un estándar cuya concentración sea conocida para usarla como referencia (Bustin *et al.*, 2005); por el contrario, el PCR digital no depende de referencias o estándares, ya que con este sistema se cuantifica el número de copias presentes en la muestra con un alto nivel de exactitud, precisión y sensibilidad (Hayden *et al.*, 2013). Esto se debe a que el volumen de reacción es dividido aproximadamente en 20,000 nano gotas, donde se lleva a cabo la reacción de PCR individualmente y posteriormente se cuantifica el número de copias amplificadas por cada nano gota.

5 LITERATURA CITADA

- Attwood, G.T., Altermann, E., Kelly, W.J., Leahy, S.C., Zhang, L. and Morrison, M., 2011. Exploring rumen methanogen genomes to identify targets for methane mitigation strategies. *Anim Feed Sci Tech.* 166-167:65-75.
- Attwood, G., and McSweeney, C., 2008. Methanogen genomics to discover targets for methane mitigation technologies and options for alternative H₂ utilisation in the rumen. *Aus J Agri*, 48: 28–37.
- Beauchemin, K.A., Kreuzer M. O'Mara, F. and Mcallister, A., 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: A review. *Aust J Exp Agri*. 48: 21-27.
- Bodas, R., Prieto, R. N., García-González, R., Andrés, S., Giráldez, F.J. and López, S., 2012. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Anim Feed Sci Tech.* 176(1): 78-93.
- Bustin, S.A., Benes, V., Nolan, T., and Pfaffl, M.W., 2005. Quantitative real-time RT-PCR-a perspective. *J Mol Endocrinol.* 34: 597-601.
- Callaghan, T. M., Podmirseg, S. M., Hohlweck, D., Edwards, J. E., Puniya, A. K., Dagar, S. S. and Griffi, G. W. 2015. *Buwchfawromyces eastonii* gen. nov., sp. nov.: a new anaerobic fungus (Neocallimastigomycota) isolated from buffalo faeces. *MycKeys.* 9:11–29.
- Carmona, J. C., Bolívar, D. M. and L. A. Giraldo, 2005. "El gas metano en la producción ganadera y alternativas para medir sus emisiones y aminorar su impacto a nivel ambiental y productivo." *Rev Col Cienc Pec.* 18(1):49-63.
- Cobellis, G., Trabalza-Marinucci, M., and Yu, Z., 2016. Critical evaluation of essential oils as rumen modifiers in ruminant nutrition: A review. *Sci. Total Environ.* 545–546: 556–568.

- Cobos M. A. and Shimada, A. 2015. Digestión y metabolismo ruminal. *Nutrición animal*. Tercera Edición. Editorial TRILLAS, pp. 67-105
- Cottle, D. J., Nolan, J. V., Wiedemann, S. G., 2011. Ruminant enteric methane mitigation: a review. *Anim Prod Sci*. 51:491-514.
- Delgado, D.C., Galindo, J., González, R., González, N., Scull, I., Dihigo, L., Cairo, J., Aldama, A., and Moreira, O., 2012. Feeding of tropical trees and shrubs foliages as a strategy to reduce ruminal methanogenesis: studies conducted in Cuba. *Trop Anim Health Prod*. 44: 1097-1104.
- Denman, S.E., and McSweeney, 2006. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. *FEMS Microbiol Ecol*. 58(3):572-82.
- Firkins, J. L., and Yu, Z., 2006. Characterisation and quantification of the microbial populations of the rumen. *Ruminant physiology: Digestion, metabolism and impact of nutrition on gene*. Wageningen Academic Publishers. 19-21.
- Gerber, P.J., Steinfeld, H., Henderson, B., Mottet, A., Opio, C., Dijkman, J., Faluccci, A. and Tempio, G. 2013. *Enfrentando el cambio climático a través de la ganadería – Una evaluación global de las emisiones y oportunidades de mitigación*. Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura (FAO), Roma.
- Hayden, R. T., Gu, Z., Ingersoll, J., Abdul-Ali, D., Shi, L., Pounds, S., and Caliendo A.M., 2013. Comparison of Droplet Digital PCR to Real-Time PCR for Quantitative Detection of Cytomegalovirus Caliendo. *J Clin Microbiology*. 51(2):540 –546.
- Henderson. G., Cox. F., Kittelmann. S., Heidarian Miri, V., Zethof, M., Noel, S.J., Waghorn, G. C., Janssen, P. H., 2013. Effect of DNA Extraction Methods and Sampling Techniques on the Apparent Structure of Cow and Sheep Rumen Microbial Communities. *PLoS ONE* 8(9): e74787.

- Hill, J., McSweeney, C., Wright, A-D.G., Bishop-Hurley, G.B-H., and Kalantar-zadeh, K. 2016. Measuring methane production from ruminants. *Trends Biotechnol.* 34 (1): 26-35.
- Hook, S.E., Wright, A.G., and McBride, B.W., 2010. *Methanogens: Methane Producers of the Rumen and Mitigation Strategies*. Hindawi Publishing Corporation. *Archaea*. 1-11.
- Hristov, A.N., Oh, J., Lee, C., Meinen, R., Montes, F., Ott, T., Firkins, J., Rotz, A., Dell, C., Adesogan, A., Yang, W., Tricarico, J., Kebreab, E., Waghorn, G., Dijkstra, J. and Oosting, S. 2013. Mitigación de las emisiones de gases de efecto invernadero en la producción ganadera – Una revisión de las opciones técnicas para la reducción de las emisiones de gases diferentes al CO₂. Editado por Gerber, P. J., Henderson, B. y Harinder P.S. Makkar. *Producción y Sanidad Animal*. FAO. Documento No. 177. FAO, Roma, Italia. 2.
- Hristov, A.N., Oh, J., Firkins, J.L., Dijkstra, J., Kebreab, E., and Waghorn, G., 2014. SPECIAL TOPICS: Mitigation of methane and nitrous oxide emissions from animal operations: I. A review of enteric methane mitigation options. *J Anim Sci.* 91: 5045-5069.
- INECC. 2015. *Inventario nacional de emisiones de gases y compuestos de efecto invernadero*. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. _____
- IPCC. 2007. Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). *Climate change 2007: The physical basis*, in: S. Solomon, D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K.B. Averyt, M. Tignor, H.L. Miller (Editors). *The Fourth Assessment Report, Contribution of Working Group 1 to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, NY, USA. 111.

- Jerez, A., Chihuailaf, R., Gai, M., Noro, M., and Wittwer, F., 2014. Pesquisa de lasalocida y monensina en leche cruda de vacas lecheras suplementadas con estos ionóforos. Arch Med Vet. 46:445-449.
- Johnson, J.M.F., Franzluebbbers, A.J., Lachnicht, S. and Reicosky, D.C. 2007. Review: agricultural opportunities to mitigate greenhouse gas emissions. Environ Pollut. 150: 107-124.
- Johnson, K.A. and Johnson, D.E. 1995. Methane emissions from cattle. J Anim Sci. 73: 2484-2492.
- Kumar, S., Dagar, S.S., Mohanty, A.K., Sirohi, S.K., Puniya, M., Kuhad, R.C., Sangu, K.P.S., Griffith, A.K. 2011. Enumeration of methanogens with a focus on fluorescence *in situ* hybridization. Naturwissenschaften 98(6): 457–472.
- Kumar, S., Puniya, A.K., Puniya, M., Dagar, S., Sirohi, S., Singh, K., Griffith, G., 2009. Factors affecting rumen methanogens and methane mitigation strategies. World J Microbiol Biotechnol. 25: 1557-1566.
- Lin, B., Henderson, G., Zou, C., Cox, F., Liang, X., Janssen, P. H. and Attwood, G.T., 2015. Characterization of the rumen microbial community composition of buffalo breeds consuming diets typical of dairy production systems in Southern China. Anim Feed Sci Techn. 207: 75–84.
- Lovett, D. K., L. Stack, S. Lovell, J. Callan, B. Flynn, M. Hawkins, F. P. O'Mara. 2006. Effect of feeding *Yucca schidigera* extract on performance of lactating dairy cows and ruminal fermentation parameters in steers. Livestock Scie.102: 23–32.
- Newbold, J.C., De la Fuente,G., Belanche, A., Ramos-Morales, E., and McEwan N.R., 2015. The Role of Ciliate Protozoa in the Rumen: review. Front. microbiol. 6:1313.

- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S., Buckley, D.H., Stahl, D.A., 2015. Brock biología de los microorganismos. 14 Edición. Pearson Educación, SA Madrid, España.
- Meale S. J., McAllister, T. A., Beauchemin, K. A., Harstad, O. M., and Chaves, A. V., 2012. Strategies to reduce greenhouse gases from ruminant livestock, *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A. Anim Sci.* 62 (4): 199-211.
- Morgavi, D.P., Forano, E., Martin, C., Newbold, C.J., 2010. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal.* 4(7): 1024-1036.
- Moss, A.R., Jouany, J.P., Newbold, J., 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Ann. Zootech.* 49: 231-253.
- Moss, R., Edmonds, J.A., Hibbard, K.A., Manning, M.R., Rose, S.K., van Vuuren, D.P., Carter, T.R., Emori, S., Kainuma, M., Kram, T., Meehl, G.A., Mitchell, J.F., Nakicenovic, N., Riahi, K., Smith, S.J., Stouffer, R.J., Thomson, A.M., Weyant, J.P., and Wilbanks, T.J., 2010. The next generation of scenarios for climate change research and assessment. *Nature.* 463(7282):747-56
- Olesen, J.E. and Bindi, M., 2002. Consequences of climate change for European agricultural productivity, land use and policy. *Eur J Agro.*16: 239-262.
- Olijhoek, D. W., Hellwing, A. L. F., Brask, M., Weisbjerg, M. R., Højberg, O., and Larsen, M. K., Dijkstra, J., Erlandsen, E. J., and Lund., P., 2015. Effect of dietary nitrate level on enteric methane production, hydrogen emission, rumen fermentation, and nutrient digestibility in dairy cows. *J Dairy Sci.* 99: 6191–6205.
- Patra, A., Park, T., Kim, M., and Yu, Z., 2017. Rumen methanogens and mitigation of methane emission by antimethanogenic compounds and substances. *J Anim Sci Biotechno.* 8:13.

- Patra, A.K., 2012. Enteric methane mitigation technologies for ruminant livestock: a synthesis of current research and future directions. *Environ Monit Assess.* 184:1929–1952.
- Patra, A.K., Saxena, J., 2010. A new perspective on the of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry.* 71: 1198-12223
- Patra, A.K., Saxena, J., 2009. The effect and mode of action of saponins on the microbial populations and fermentation in the rumen and ruminant production. *Nut Res Rev.* 22:204–219.
- Roehe, R., Dewhurst. R.J., Duthie C-A, Rooke, J.A., McKain, N., and Ross, D.W., 2016. Bovine host genetic variation influences rumen microbial methane production with best selection criterion for low methane emitting and efficiently feed converting hosts based on metagenomic gene abundance. *PLoS Genet.* 12(2).
- SIAP, 2016. Poblacion ganadera. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. <https://www.gob.mx/siap/documentos/poblacion-ganadera>
- Ståhlberg, A., Håkansson, J., Xian, X., Semb, H., and Kubista, M., 2004. Properties of the Reverse Transcription Reaction in mRNA Quantification. *Clin Chem.* 50(3): 509–515.
- Stahl, D.A., Flesher, B., Mansfield, H.R. AND Montgomery, R., 1988. Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. *Appl Environ Microb.* 54(5): 1079-1084.
- SEMARNAT, 2013. Inventario nacional de emisiones de gases de efecto invernadero 1990-2010. 325-384
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., and Velasquillo, C., 2013. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. *FEMS Microbiol Ecol.* 58(3):572-82.

- Torres-Acosta, J.F., Alonso Diaz, M.A., Hoste, H., Sandoval-Castro, C.A., Aguilar-Caballero, A.J., 2008. Efectos negativos y positivos del consumo de forrajes ricos en taninos en la producción de caprinos. *Tropical and Subtropical Agroecosystem*. 9(1): 83-90.
- Valones, M. A. A., Guimarães, R. L., Brandão, L. A. C., Eleutério de Souza, P. R., Carvalho, A. de A. T., and Crovela, S., 2009. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: A REVIEW. *Braz J Microbiol*. 40:1-11.
- Wallace, R.J., Snelling, T.J., McCartney, C.A., Tapio, L. and Strozzi, F., 2017. Application of meta-omics techniques to understand greenhouse gas emissions originating from ruminal metabolism. *Genet Sel Evol*. 49(9): 1-11.
- Wilson, K. H., Blitchington, R.B. AND. Greene, R.C., 1990. Amplification of bacterial 16s ribosomal dna with polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 28(9):1942-1946.
- Yu, Z. and Morrison, M., 2004. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *BioTechniques*.36 (5):

CAPITULO I. DIGESTIBILIDAD Y PRODUCCIÓN DE GAS *IN VITRO* DE LOS ÁRBOLES Y ARBUSTOS FORRAJEROS

1.1 INTRODUCCIÓN

El sector ganadero es uno de los principales involucrados en la producción de GEI, contribuyendo con aproximadamente el 14.5 % del total de la producción mundial de estos gases (Gerber *et al.*, 2013). Beauchemin *et al.* (2008) menciona que los rumiantes producen aproximadamente 80 Tg de CH₄ anualmente que representan el 33% de las emisiones de origen antropogénico. Éste CH₄ es generado por arqueas en el rumen a través de la reducción del CO₂ con H₂, los cuales son producidos por bacterias, hongos anaeróbicos y protozoarios durante sus procesos de fermentación (Bodas *et al.*, 2012). Se estima que un bovino adulto genera de 250 a 500 L de CH₄ al día lo que representa una pérdida de 2 al 12% de la energía consumida, ya que existe una relación negativa entre la producción de CH₄ entérico y la energía proveniente de la alimentación (Johnson y Johnson, 1995). Las vías de eliminación de CH₄ en los rumiantes son a través del eructo, por la respiración y en menor cantidad, como flatulencias (Cobellis *et al.*, 2016).

Debido a lo anterior, si se reducen las emisiones de CH₄ en los rumiantes, se contribuiría en la disminución de la tasa de calentamiento global. Al respecto, se han descrito diversas estrategias para reducir dichas emisiones, entre las cuales se incluyen la modificación de la composición de la dieta (aumento de la tasa de pasaje, mayor cantidad de propionato frente al acetato) (Meale *et al.*, 2012), la utilización de antibióticos (ionóforos, bacteriófagos) (Beauchemin *et al.*, 2008), vacunas antimetanogénicas (Patra *et al.*, 2017), inhibidores enzimáticos (compuestos

halogenados sulfatados análogos a Mcr) (Patra *et al.*, 2017) y aditivos alimenticios como grasas (Bodas, 2012), aceites (Cobellis *et al.*, 2016), nitratos (Olijhoek *et al.*, 2015) y metabolitos secundarios, como TC y saponinas, presentes en diversas plantas (Bodas *et al.*, 2011; Patra, 2012). Estos últimos tienen actividad antimicrobiana y reducen la disponibilidad de H₂, el cual es usado por las arqueas metanogénicas para producir CH₄ (Hook *et al.*, 2010). Al respecto, Delgado *et al.* (2012) mencionan que el follaje de *Albizia lebbbeck*, *Leucaena leucocephala*, *Moringa Oleifera* y *Gliricida sepium*, mezclado al 30% con *C.nlemfuensis* produce 91 %, 74 %, 61 % y 55 %, respectivamente, menos CH₄ que el *C. nlemfuensis* solo. Por lo anterior, el objetivo de este capítulo fue evaluar la producción de CH₄ y CO₂ en la fermentación ruminal *in vitro* de follajes tropicales y su correlación con el contenido de TC y saponinas

1.2 MATERIALES Y MÉTODOS

1.2.1 Ubicación

La colecta del follaje de plantas y arbustos forrajeros se realizó en el Colegio de Postgraduados Campus Campeche, localizado geográficamente 19° 49' latitud norte y 90° 55' longitud oeste, con clima subhúmedo con lluvias en el verano.

Los análisis de degradabilidad *in vitro*, producción de gas *in vitro* y análisis bromatológico del follaje se realizaron en el Laboratorio de Nutrición Animal, del programa en Ganadería del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, localizado geográficamente 19° 29" latitud norte, 98° 53" longitud oeste y una altitud de 2241 msnm. El clima es templado semi seco y con precipitación de 632.5 mm/año, la temperatura promedio anual es de 15.2°C (García, 2004).

1.2.2 Tratamientos

En los meses junio-julio del 2016, se colectaron muestras de follaje, simulando el ramoneo de un bovino adulto a un máximo de dos metros de altura, de las siguientes once especies de árboles y arbustos forrajeros: *Leucaena leucocephala*, *Moringa oleifera*, *Albizia lebbbeck*, *Enterolobium cyclocarpum*, *Piscidia piscipula*, *Brosimum alicastrum*, *Lysiloma latisiliquum*, *Guazuma ulmifolia*, *Cnidoscolus aconitifolius*, *Gliricidia sepium* y *Bursera simaruba*, así como de un pasto *Cynodon plectostachyus*. Las muestras se secaron a 50° en una estufa de aire forzado (Rios. Rosa), de 24-72 horas, el tiempo de secado dependió de la humedad en el follaje.

1.2.3 Análisis químicos

Las muestras sin humedad se molieron en un molino Thomas-Wiley Mill con malla de 1 mm y se analizó por triplicado la cantidad de MS, C, PC y E.E de acuerdo con los métodos de la AOAC (2005); la FDA y FDN se determinó de acuerdo a la técnica de Van Soest *et al.*, 1991 (Cuadro 2).

Cuadro 2. Composición química de árboles y arbustos forrajeros tropicales.

Especie	M.S. (%)	P.C (%)	CEN (%)	FDN (%)	FDA (%)	E.E (%)	TC (%)	S (%)	E.M (Mcal)
<i>Cnidoscolus aconitifolius</i>	96.93	19.23	7.512	21.66	18.11	5.71	1.03	3.6	4.50
<i>Guázuma ulminifolia</i>	95.92	16.36	10.33	55.36	37.99	5.22	7.00	6.6	3.21
<i>Piscida piscípula</i>	96.07	14.25	9.587	58.92	43.32	3.53	1.55	4.6	2.92
<i>Leucaena leucocephala</i>	97.02	22.85	4.263	54.21	32.09	2.72	4.19	4.3	4.08
<i>Bursera simaruba</i>	96.48	11.64	11.76	45.17	44.1	3.28	4.62	3.9	2.65
<i>Entorolobium ciclocarpum</i>	97.13	14.18	6.49	67.81	45.3	2.6	1.27	5.0	2.88
<i>Moringa oleífera</i>	96.76	25.37	8.69	16.15	10.45	4.84	0.02	3.2	4.76
<i>Lysiloma latisilicum</i>	96.68	14.16	5.855	54.47	27.8	3.46	3.75	3.3	2.81
<i>Brosimum alicástrum</i>	95.35	16.55	9.807	45.07	35.47	2.44	2.18	4.5	3.73
<i>Cynodon plestostachius</i>	94.46	10.26	7.284	78.31	39.43	2.11	0.34	3.6	2.77
<i>Albizia Lebbek</i>	93.14	16.87	8.114	43.69	27.93	5	1.07	3.8	3.60
<i>Gliricidia septium</i>	93.67	16.59	10.99	51.5	36.92	3.96	1.55	3.8	3.40

M.S. (Materia seca); P.C. (proteína cruda); F.D.N. (Fibra Detergente Neutro); F.D.A. (Fibra Detergente Ácido); E.E. (Extracto Etéreo), TC (taninos condensados), S (saponinas) E.M (energía metabolizable)

1.2.4 Fermentación *in vitro* de la MS

El cuidado de los animales se realizó en apego a la NOM-062-ZOO-1999. El líquido ruminal se colectó de tres novillos de raza Holstein con un peso aproximado de 500-550 kg con cánula ruminal permanente, alimentados con una ración de 14 kg diarios, divididos en dos horarios de alimentación a las 7:00 y 19:00 horas, con una dieta en base seca de 15 % de maíz molido, 15 % pasta de soya, 61.5 % de

rastrojo de maíz, 6 % de melaza, 0.5 % de sal, 1.4 % de fosfato dibásico de calcio, 0.6 % de carbonato de calcio, de acuerdo a los requerimientos sugeridos por NRC (2000) y agua *ad libitum*. La colecta de líquido ruminal se realizó en la mañana una hora antes de la alimentación. El líquido ruminal colectado se filtró a través de cuatro capas de manta cielo, y se depositó en un termo a 39°C, e inmediatamente se transportó al laboratorio. Una vez ahí, el líquido ruminal colectado se filtró nuevamente en cuatro capas de manta cielo y se utilizó para preparar el inóculo.

Previo a la preparación de inóculo se pesaron 0.5 g de cada muestra de follaje molido, por triplicado y se colocaron en un vial de vidrio con capacidad de 120 mL. Posteriormente se colocaron 50 mL de inóculo en cada vial, se taparon con tapón de goma y arillo de aluminio y se colocaron en un baño maria a 39°C, agitándose manualmente cada 2 horas (Menke *et al.* 1979).

La preparación del inóculo se realizó bajo la metodología de Menke *et al.* (1979). Cada litro de inóculo se compone de 166 mL de solución macro mineral, 166 mL de solución buffer, 334 mL de líquido ruminal, 333 mL de agua destilada, y se adiciona 33 mL de la solución reductora, 0.8 mL de rezarsurina y 0.03 mL de microminerales (Apéndice 3).

1.2.5 Degradabilidad *in vitro* de la MS y MO

La DMS (mg/ g MS) (Menke *et al.* 1979) y la DMO (mg/ g MS), se determinaron a las 6, 12, 24, 48 y 72 horas. A cada determinada hora se sacaron los viales del baño maria y se colocaron en el refrigerador a 4°C durante 2 horas, para detener la actividad de los microorganismos ruminales. Una vez realizado lo anterior se filtró el contenido del vial con una bomba de vacío y se colocaron a peso

constante en una estufa a 70°C, durante 24 horas, para obtener DMS. Posteriormente se calcinó en una mufla a 500°C durante 6 horas para obtener DMO. Para calcular el porcentaje de DMS y DMO se usaron las siguientes fórmulas respectivamente:

$$\text{DMS, mg/gMS} = \left(\frac{\text{PMS} - (\text{PRS} - \text{PB})}{\text{PMS}} \right) * 1000$$

Donde:

PMS= Peso de la muestra seca al inicio de la fermentación en gramos.

PRS= Peso residuo seco después de la fermentación en gramos.

PB= Peso del blanco, inóculo sin muestra de follaje en gramos.

$$\text{DMO, mg/gMS} = \left(\frac{\text{MOm} - (\text{MOr} - \text{MOb})}{\text{MOm}} \right) * 1000$$

Donde:

MOm= Materia Orgánica de la muestra al inicio de la fermentación en gramos.

MOr= Materia Orgánica del residuo (al término de la fermentación) en gramos.

MOb = Materia Orgánica del blanco en gramos.

1.2.6 PG de follajes tropicales *in vitro*

La producción de gas se registró a las 6, 12, 24, 48 y 72 horas, por desplazamiento de agua (Fedorak y Hruday, 1983). Con una aguja de 1.2 x 40 mm

se pinchó el tapón de goma del vial con la fermentación y, mientras se agitaba lentamente el vial, se registraron los mililitros de agua desplazados en la bureta de vidrio para obtener la producción de gas. Los cálculos se realizaron de acuerdo con Kholif *et al.*, 2017.

Se usó el programa SAS, 2002 con el modelo:

$$V_o = V_m / (1 + e^{-2.4 * s * (t - L)})$$

Donde

V_o = volumen de gas acumulado en mL/ g MS.

V_m = volumen máximo en mL/ g MS.

S = tasa de fermentación (h^{-1}).

t = tiempo.

L = fase lag (h).

e = base de logaritmos naturales

Para calcular el FP se usó el modelo:

$$FP_{24} = (MSD / PG)$$

Donde:

MSD = Materia seca degradada a las 24 h en mg/ g.

PG = Producción de gas acumulado a las 24h en ml/ g MS.

1.2.7 Determinación de CH₄ y CO₂ por cromatografía de gases

Una vez montada la fermentación *in vitro*, a la hora 24 de la fermentación se colectaron 3 mL de gas con una jeringa de plástico de 5 mL y se agregaron al vial con la solución salina saturada (Elghandour, *et al.*, 2017).

Para preparar la solución salina saturada se agregaron 360 g de NaCl de marca comercial, 5 mL de anaranjado de metilo al 0.1 % por cada litro de solución.

Posteriormente, se agregó HCl (2N) hasta ajustar a un pH de 2, para lo cual se utilizó un potenciómetro. Con la solución saturada se llenaron viales de 40 mL, sin dejar espacio de aire dentro del vial y se sellaron con arillo metálico (Almaraz-Buendia *et al.*, 2016).

Posteriormente, se tomaron 300 μ L de gas colectado en el vial con solución salina saturada y se inyectó en un cromatógrafo, para determinar CH₄ y CO₂ por cromatografía de gases, las condiciones de temperatura del detector, horno y columna fueron de 130°C, 80°C y 170°C respectivamente. Se usó como estándar una mezcla de CH₄ (25%) y CO₂ (75%). Como gas acarreador se usó helio (22.3mL/min) y una columna capilar Porapak.

$$CH_4, \frac{mL}{gMS} = \frac{(\%CH_4)(PG)}{100}$$

Donde:

%CH₄= determinado por cromatógrafo.

PG= Producción de gas en mL/ g MS.

1.2.8 Determinación de metabolitos secundarios: Taninos condensados

Para determinar taninos condensados de los follajes se pesó 0.4 g de muestra seca y molida en un vaso de precipitado (40 mL), se adicionó 10 mL de metanol puro y se tapó con parafilm para evitar pérdida de la muestra. Los vasos se colocaron en una parrilla magnética en agitación constante durante una hora a temperatura ambiente. Se recuperó el sobrenadante en tubos Corning (de plástico

de 15mL) y se centrifugó a 16099 g durante 35-40 min. Posteriormente, se tomó un mililitro del sobrenadante el cual se diluyó en metanol (1:10) debido a su elevada concentración de pigmentos (ISO, 1988). Posteriormente a cada tubo se le agregaron 5 mL de la solución de vainillina y se dejó en reposo 45 minutos a temperatura ambiente en la luz, hasta que viró a una tonalidad rosa.

La vainillina se preparó al 0.5% en metanol acidificado. El metanol acidificado se preparó con HCL (38%) al 8% aforado con metanol.

Para preparar la curva se usó el estándar de catequina en relación 1:1, se pesaron 5 mg de catequina y se disolvieron en 5 mL de metanol. La curva estándar se preparó a concentraciones de 0.008, 0.016, 0.04, 0.08, 0.16 y 0.2 mg/ mL. Para el blanco se usó 1 mL de metanol puro, éste se colocó directamente a la placa de plástico de 96 pozos.

Posteriormente en la placa de lectura se colocaron 200 μ L de la muestra por triplicado. Una vez colocadas en la placa, el blanco, la curva y las muestras se agitaron y se leyeron con un espectrofotómetro a 500 nm.

Para realizar los cálculos se obtuvo de la curva estándar la ecuación de regresión lineal y posteriormente se aplicó la fórmula para determinar los mg de catequina 100 mg de materia seca⁻¹:

$$\text{mg de } \frac{\text{catequina}}{100\text{g MS}} = \left(\frac{\text{CC}}{\text{g MS}} \right) (10 \text{ mL de metanol}) (1000\text{g Muestra}) (FD)$$

Donde:

CC= Concentraciones calculadas en mg/mL.

MS= Materia Seca en gramos.

FD= Factor de dilución.

1.2.9 Determinación de metabolitos secundarios: Taninos condensados

El método que se utilizó fue el propuesto por Lee y colaboradores (2011). De las muestras secas y molidas se pesaron 100 g, se colocaron en cartuchos de papel filtro para someter a reflujo por espacio de 6 horas con metanol a 80%. Después se extrajo con el rotavaporador el disolvente, el extracto se lavó con acetona y agua destilada.

Se tomaron 200 mg del extracto y se disolvió en 1 mL de agua desionizada. De la solución anterior se tomaron 5 µL, depositándolos en un tubo de ensaye. Se añadieron además 95 µL de agua, 1 mL de ácido sulfúrico concentrado, 100 µL de una solución fresca de vainillina a 8%. Posteriormente se incubó a 60°C durante 20 min y luego se pusieron los tubos en baño con hielo. Una vez que se enfriaron los tubos, se midió en el espectrofotómetro a 544 nm. La curva estándar se realizó utilizando saponinas de soya marca sigma.

1.2.10 Concentración de nitrógeno amoniacal en la fermentación *in vitro*

La cantidad nitrógeno amoniacal de la fermentación *in vitro* a las 72 h se determinó con la técnica de McCulloch (1967). Para ello se colectaron 4 mL de inóculo de los viales de la fermentación *in vitro* de las 72 horas y se colocaron en un tubo que contenía 1 mL de ácido metafosfórico al 25%. Posteriormente, se

centrifugaron a 3500g durante 15 minutos en una centrifuga, se recuperó el sobrenadante y se almacenó a 4°C. Para su análisis se colocó 1 mL de fenol, 20 µL de la muestra y 1 mL de hipoclorito de sodio, a continuación, se incubó en baño maria a 37°C, durante 30 minutos y se agregaron 5 mL de agua destilada. Para medir la concentración de nitrógeno amoniacal se usó un espectrofotómetro y se leyó a una longitud de onda de 630 nm. La curva estándar se preparó a concentraciones de 2.5, 5, 10, 15 y 20 mg/ dL, para el blanco se usó un mL de fenol y un mL de hipoclorito.

1.2.11 Cálculos y análisis estadístico

1.2.11.1 Energía metabolizable

La energía metabolizable se calculó de acuerdo a Menke *et al.* (1979)

$$ME = 2.2 + 0.136 (PG) + 0.057 (PC)$$

Donde:

ME = Energía metabolizable en MegaJoules/kgDM.

PG = Producción de gas acumulado a las 24 horas en mL/200mg.

PC= Proteína Cruda en g/Kg MS.

El FP es la relación entre la DMS (mg/ g) y la PG (ml/ g MS), el cual se calculó a las 24 horas de incubación y se usó el siguiente modelo (Kholif *et al.*, 2017):

$$FP_{24} = (MSD / PG)$$

Donde PG es producción de gas acumulado a las 24 horas en mL/200mg y PC es proteína cruda en g/Kg MS.

1.2.11.2 Modelo experimental

Para el análisis estadístico se usó un diseño en bloques completamente al azar. Los resultados se analizaron con el procedimiento GLM de programa estadístico SAS 9.0 (2002) y se realizó la comparación de medias por la prueba de Tukey a una probabilidad menor o igual a 5.

$$Y_{ij} = \mu + \delta_i + \beta_j + E_{ij}$$

Y_{ij} = Variable aleatoria observable del i-ésimo tratamiento a la j-ésima repetición.

μ = Media aritmética

δ_i = Efecto del i-ésimo tratamiento

β_j = Efecto del j-ésimo bloque

E_{ij} = Error aleatorio correspondiente al i-ésimo tratamiento de la j-ésima repetición

1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se analizaron los follajes tropicales mediante un análisis bromatológico, en el cual podemos observar que hay una variación de 10 % a 25 % de PC para los follajes, siendo *Leucaena leucocephala* y *Moringa oleifera* quienes presentaron más del 20% de PC, valores similares se reportaron por Molina *et al.* (2013) y Galindo *et al.* (2014). Como testigo se analizó una gramínea, *Cynodon plestustachius*, quien presentó el menor porcentaje de PC (10.26 %), lo que concuerda con lo reportado por Molina *et al.* (2013), quienes mencionan que las gramíneas tienen bajo contenido de PC, y más del 73 % de FDN; la cantidad de FDN en los follajes se refiere al contenido la hemicelulosa, celulosa y lignina principalmente, estos resultados concuerdan con lo obtenido en esta investigación, ya que el tratamiento testigo presento 78 % de FDN. También podemos destacar que *Moringa oleifera* presentó el menor porcentaje de FND (16.15%) que el resto de los follajes evaluados. Los resultados se muestran en el cuadro 2.

De los análisis realizados para cuantificar TC y saponinas podemos destacar que hubo una gran variación en el contenido de estos metabolitos entre los diferentes follajes; sin embargo, se destaca que *Guazuma ulmifolia* posee el contenido más elevado de TC y saponinas (7% y 6.6%, respectivamente), mientras que *Moringa oleifera* y *Cynodon plestostachius* el contenido más bajo de TC (0.02% y 0.36%, respectivamente), valores que difieren con lo reportado en otros estudios (Garcia *et al.*, 2008). Esta variación puede deberse al método de extracción utilizado, el estado fisiológico de la planta, la temporada del año es que se colectó y tipo de suelo (Márquez y Suárez, 2008; Santacoloma *et al.*, 2014).

1.3.1 Degradación de la materia seca (DMS) y la materia orgánica (DMO)

En el cuadro 3 se muestra la cinética de la degradación de la materia seca de los follajes tropicales, presentando mayor degradabilidad el *Brosimum alicastrum* (69 %) y *Cnidoscolus aconitifolius* (61 %) en un periodo de incubación hasta las 72h, encontrándose diferencia significativa con $P < 0.05$ con los demás tratamientos. Los follajes que presentaron menos del 35% de degradabilidad fueron: *Guazuma ulminifolia*, *Piscidia piscipula*, *Leucaena leucocephala*, *Enterolobium cyclocarpum*, *lysiloma latisulicum*, en los diferentes tiempos evaluados. Esto es contrario a lo reportado por *Molina et al. (2013)*, que menciona que las leguminosas presentaron mayor degradabilidad que las gramíneas. En esta investigación se usó a la *Leucaena leucocephala* como punto de referencia, ya que es una especie tropical usada frecuentemente en la alimentación de rumiantes, sin embargo, al comparar la DMS de la *Leucaena leucocephala* se observa que fue menor a lo reportado por *Gaviria et al. (2015)* y *Molina et al. (2013)*.

La DMO de los follajes incubados se muestra en el cuadro 4, observándose mayor degradabilidad en el follaje *Brosimum alicastrum* y *Cnidoscolus aconitifolius* con 63 y 66% respectivamente, y por debajo de 30% de degradabilidad se encuentra *Piscidia piscipula*, *lysiloma latisulicum*, *Enterolobium cyclocarpum*, *Guazuma ulminifolia*, mostrando diferencias significativas con el testigo *Cynodon plectostachius* con $P < 0.05$, el cual presentó el 52% de degradabilidad.

Cuadro 3. Cinética de la DMS *in vitro* de la MS de follajes tropicales en mg/g MS.

Especie	Horas				
	6	12	24	48	72
<i>Cynodon plectostachius</i>	233.81 ^{cd}	301.84 ^{cd}	322.16 ^{bc}	518.77 ^{cd}	578.52 ^{bc}
<i>Cnidocolus aconitifolius</i>	464.00 ^a	565.00 ^a	582.76 ^a	615.82 ^{ab}	619.95 ^b
<i>Guazuma ulmifolia</i>	105.28 ^e	184.02 ^{ef}	196.68 ^d	232.49 ^h	277.41 ^f
<i>Piscidia piscipula</i>	151.10 ^e	188.45 ^{ef}	194.91 ^d	282.34 ^{gh}	313.30 ^f
<i>Leucaena leucocephala</i>	131.91 ^e	168.64 ^f	194.31 ^d	265.42 ^{gh}	339.48 ^{ef}
<i>Bursera simaruba</i>	167.99 ^{de}	217.35 ^{def}	259.94 ^{cd}	326.50 ^{fg}	386.15 ^e
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	133.81 ^e	172.29 ^f	199.31 ^d	240.72 ^{hg}	287.47 ^f
<i>Moringa oleifera</i>	394.77 ^a	411.87 ^b	430.04 ^b	550.15 ^{bc}	574.13 ^{bc}
<i>Lysiloma latisilicium</i>	121.07 ^e	131.45 ^f	161.29 ^d	288.54 ^{hg}	310.29 ^f
<i>Brosimun alicastrum</i>	317.54 ^b	462.02 ^b	431.90 ^b	679.64 ^a	698.19 ^a
<i>Albizia lebeck</i>	268.64 ^{bc}	280.61 ^{cde}	333.47 ^{bc}	433.65 ^{de}	514.91 ^{cd}
<i>Gliricidia sepium</i>	295.03 ^{bc}	362.97 ^{bc}	388.07 ^b	402.57 ^{ef}	467.19 ^a
E.E	13.35	16.32	17.08	17.67	15.58

a, b, c, d, e, f, g, h Superíndices diferentes en una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

Cuadro 4. Cinética de la DMO *in vitro* de follajes tropicales en mg/g MS.

Especie	Horas				
	6	12	24	48	72
<i>Cynodon plectostachius</i>	221.52 ^{bcd}	246.23 ^{ef}	268.08 ^{cd}	521.09 ^b	523.84 ^b
<i>Cnidocolus aconitifolius</i>	421.59 ^a	570.85 ^a	559.23 ^a	655.21 ^a	637.75 ^a
<i>Guazuma ulmifolia</i>	129.3 ^d	207.53 ^{efg}	208.09 ^d	257.54 ^{ef}	237.44 ^f
<i>Piscidia piscipula</i>	135.63 ^d	165.53 ^{fg}	229.44 ^d	271.53 ^{ef}	292.48 ^{ef}
<i>Leucaena leucocephala</i>	192.89 ^{cd}	223.51 ^{efg}	233.32 ^d	306.04 ^{ef}	361.98 ^{de}
<i>Bursera simaruba</i>	176.97 ^{cd}	226.27 ^{efg}	260.97 ^{cd}	325.89 ^{de}	358.68 ^{de}
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	133.97 ^d	169.94 ^{fg}	189.92 ^d	226.64 ^f	241.83 ^f
<i>Moringa oleifera</i>	322.47 ^{ab}	403.76 ^{bc}	439.45 ^b	562.99 ^b	549.26 ^b
<i>Lysiloma latisilicium</i>	143.75 ^d	136.87 ^g	179.89 ^d	274.52 ^{ef}	276.56 ^{ef}
<i>Brosimun alicastrum</i>	375.01 ^a	443.16 ^b	397.88 ^b	605.47 ^{ab}	669.74 ^a
<i>Albizia lebeck</i>	257.62 ^{bc}	272.58 ^{de}	285.32 ^{cd}	404.86 ^{cd}	463.81 ^{bc}
<i>Gliricidia sepium</i>	239.69 ^{bcd}	343.11 ^{cd}	352.63 ^{bc}	419.18 ^c	424.24 ^{cd}
E.E	11.90	14.22	13.54	16.16	15.47

a, b, c, d, e, f, g Superíndices diferentes en una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

1.3.2 Comportamiento de la PG en la fermentación *in vitro* de follajes tropicales y la producción de metano y bióxido de carbono.

La cinética de la producción de gas se muestra en el cuadro 5, donde se observó mayor cantidad de gas producido por *Cnidoscolus aconitifolius* y *Cynodon plectostachius* con 258 y 236 mL / g MS respectivamente, no habiendo diferencia estadística entre estos forrajes ($P < 0.05$). Tampoco se observaron diferencia entre el *Cynodon plectostachius*, que es el tratamiento testigo, con la *Moringa oleífera*, *Brosimum alicastrum*, *Albizia lebbek*, a las 72 horas de incubación. No obstante, Meale *et al.* (2012), reportó una producción de gas mayor de los follajes *Gliricidia sepium*, *Leucaena leucocephala* y *Moringa oleífera* (148.5 mL/ g MS, 126.8 mL/ g MS y 187 mL/ g MS respectivamente) a las 24 horas de incubación. Así también, Gaviri *et al.* (2015) reportaron que la *Leucaena leucocephala* tiene una producción de gas de 250 mL/ g MS a la hora 48, este valor es superior a lo encontrado en esta investigación, en la cual produjo 82 mL/ g MS. Lo anterior puede explicarse por su baja degradabilidad, ya que existe relación entre la degradabilidad del follaje con la cantidad de gas producido.

Cuadro 5. Comportamiento de la PG en la fermentación *in vitro* de follajes tropicales a través del tiempo en mL /g MS.

Especie	Horas				
	6	12	24	48	72
<i>Cynodon plectostachius</i>	57.63 ^b	95.66 ^b	142.00 ^b	208.04 ^{ab}	236.28 ^{ab}
<i>Cnidoscolus aconitifolius</i>	103.78 ^a	163.07 ^a	208.10 ^a	241.08 ^a	258.70 ^a
<i>Guazuma ulmifolia</i>	35.06 ^c	53.09 ^d	69.97 ^e	101.25 ^{efg}	115.58 ^{de}
<i>Piscidia piscipula</i>	38.15 ^c	57.27 ^{cd}	69.81 ^e	91.89 ^{fg}	113.51 ^{de}

<i>Leucaena leucocephala</i>	29.51 ^c	50.56 ^d	68.75 ^e	82.92 ^{fg}	95.04 ^{de}
<i>Bursera simaruba</i>	34.98 ^c	59.94 ^{cd}	82.72 ^{de}	104.25 ^{efg}	119.31 ^{de}
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	35.35 ^c	52.49 ^d	65.71 ^e	77.24 ^g	86.17 ^e
<i>Moringa oleífera</i>	59.44 ^b	96.78 ^b	134.06 ^{bc}	172.25 ^{bcd}	191.57 ^{bc}
<i>Lysiloma latisilicium</i>	31.33 ^c	49.88 ^d	67.90 ^e	87.88 ^{fg}	105.53 ^{de}
<i>Brosimum alicastrum</i>	66.03 ^b	114.06 ^b	141.41 ^b	179.61 ^{bc}	202.66 ^{bc}
<i>Albizia lebbbeck</i>	65.79 ^b	93.24 ^b	119.12 ^{bcd}	143.46 ^{cde}	151.82 ^{bc}
<i>Gliricidia sepium</i>	61.13 ^b	88.71 ^{bc}	94.38 ^{cde}	125.4 ^{def}	135.16 ^{de}
E.E	2.51	4.19	5.03	5.89	6.32

a, b, c, d, e, f, g Superíndices diferentes en una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

La producción de CH₄ y CO₂ fue diferente ($P < 0.05$) en los follajes evaluados. Como se observa en el Cuadro 6, el tratamiento testigo produjo mayor cantidad de CH₄ respecto a los demás follajes. Esto es similar a lo reportado por Galindo *et al.* (2004), quienes obtuvieron mayor producción de CH₄ con la gramínea (*Cynodon nlemfuensis*, 65.15 $\mu\text{L gMS}^{-1}$) en comparación a los demás follajes evaluados. Asimismo Delgado *et al.* (2012) menciona que al usar follajes forrajeros como parte una dieta disminuye la cantidad de CH₄. Se puede destacar a la *Leucaena leucocephala* que produjo la menor cantidad de CH₄ a las 24 horas después de la incubación *in vitro*, lo cual puede deberse a su baja DMS y DMO en comparación con los demás follajes, además que presentó una baja PG (Kholif *et al.*, 2017).

La tasa de fermentación es la velocidad en la cual los microorganismos fermentan los componentes de la dieta y la fase *lag* es el tiempo en que se adaptan a las condiciones de crecimiento. Los follajes no muestran diferencia estadística en la fase lag, pero sí hay diferencia estadística ($P < 0.05$) en la tasa de fermentación y el factor de partición entre *Gliricidia sepium* y el testigo. Por otro lado, es conveniente recordar que en esta investigación, los follajes se evaluaron de manera individual y,

aunque se han realizado estudios donde demuestran que los follajes disminuyen las emisiones de CH₄ en rumiantes (Galindo *et al.*, 2014; Delgado *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2013; Mira *et al.*, 2015), se necesitan estudios en donde los follajes se evalúen como parte de una dieta para ver su efecto de la producción de CH₄.

Cuadro 6. Producción de CH₄, CO₂ y parámetros de la PG de la fermentación *in vitro* de follajes tropicales.

Especie	Vmax mL/ g MS	L h ⁻¹	S h ⁻¹	FP ₂₄ mg MSD/ ml gas	CH ₄ ml/g MS 24h	CO ₂ mL/g MS 24h
<i>Cynodon plectostachius</i>	225.54 ^{ab}	0.028 ^a	0.113 ^b	2.16 ^b	40.41 ^a	39.91 ^a
<i>Cnidocolus aconitifolius</i>	237.8 ^a	0.063 ^a	0.402 ^b	2.61 ^{ab}	18.31 ^{cd}	30.60 ^{bc}
<i>Guazuma ulmifolia</i>	112.80 ^{def}	0.066 ^a	0.517 ^b	2.24 ^b	13.11 ^{de}	31.63 ^{abc}
<i>Piscidia piscipula</i>	112.82 ^{def}	0.054 ^a	-1.795 ^b	3.04 ^{ab}	9.72 ^{def}	18.76 ^{de}
<i>Leucaena leucocephala</i>	86.90 ^{ef}	0.056 ^a	0.387 ^b	3.12 ^{ab}	1.53 ^f	4.48 ^f
<i>Bursera simaruba</i>	108.9 ^{def}	0.055 ^a	1.209 ^{ab}	3.2 ^{ab}	12.85 ^{de}	30.47 ^{bc}
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	77.50 ^f	0.061 ^a	-0.180 ^b	3.17 ^{ab}	7.85 ^{ef}	11.86 ^{ef}
<i>Moringa oleifera</i>	178.94 ^{bc}	0.041 ^a	-1.021 ^b	3.43 ^{ab}	24.71 ^{bc}	40.20 ^a
<i>Lysiloma latisilicuum</i>	81.79 ^{ef}	0.035 ^a	-2.501 ^b	3.0 ^{ab}	6.87 ^{ef}	14.50 ^{de}
<i>Brosimum alicastrum</i>	191.27 ^{ab}	0.049 ^a	-0.124 ^b	3.24 ^{ab}	29.21 ^b	37.51 ^{ab}
<i>Albizia lebbeck</i>	141.08 ^{cd}	0.061 ^a	-0.270 ^b	2.48 ^{ab}	13.05 ^{de}	18.24 ^{de}
<i>Gliricidia sepium</i>	128.56 ^{de}	0.043 ^a	5.064 ^a	4.1 ^a	17.66 ^{cd}	22.42 ^{dc}
E.E	5.858	0.003	0.3058	0.10	1.42	1.65

Volumen máximo (Vmax), FP (Factor de partición), fase lag (L), tasa de fermentación (S). ^{a, b, c, d, e, f,} Superíndices diferentes en una misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

1.3.3 Producción de AGVs en la fermentación *in vitro* de follajes tropicales

Otro factor importante a considerar en la fermentación ruminal *in vitro* es la producción de AGVs, los cuales mostraron diferencias por efecto de los diferentes follajes (Cuadro 7). Es de resaltar que *Cnidocolus aconitifolius*, *Moringa oleifera*, *Brosimum alicastrum* y *Albizia lebbeck*, tienen mayor producción de ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico, no encontrando diferencia estadística entre ellos.

Moss *et al* (2000) señalan que el acetato y el butirato promueven la producción de CH₄, mientras que el propionato puede ser considerado como una forma competitiva en el uso del H₂ en el rumen, regulando los hidrógenos disponibles. Asimismo, Jayanegara *et al.* (2011) mencionan que la disminución en la emisión de CH₄ está relacionada con la disminución de acetato frente al propionato y dado que la relación acético:propiónico puede variar entre 0.9 a 4, también las pérdidas por CH₄ varían ampliamente (Johnson y Johnson, 1995).

También se puede observar en el cuadro 7 la producción de nitrógeno amoniacal, donde se muestra que la *Leucaena leucocephala* produjo menor cantidad de N-NH₃; sin embargo, no hay diferencia estadística con *Guazuma ulmifolia*, *Lysiloma latisilicium*, *Gliricidia sepium*, en comparación con el testigo si se observó diferencia. Siendo similares estadísticamente con el testigo, *Cnidocolus aconitifolius*, *Enterolobium cyclocarpum*, *Moringa oleífera* y *Albizia lebbeck*.

Cuadro 7. Características de la fermentación *in vitro* de árboles y arbustos tropicales a las 72 horas.

Especie	NH ₃ -N (mg/dL)	AGVs (mmol/L)						Total
		Acético	Propiónico	Isobutírico	Butírico	Isovalérico	Valérico	
<i>Cynodon plectostachius</i>	26.96 ^a	40.64 ^{bc}	10.45 ^{bc}	0.8665 ^{ab}	5.71 ^{abc}	1.3279 ^{abc}	0.9097 ^{ab}	59.9 ^{bc}
<i>Cnidocolus aconitifolius</i>	26.31 ^{abc}	50.07 ^{ab}	14.05 ^a	0.9006 ^{ab}	7.68 ^a	1.4823 ^{abc}	1.0505 ^a	75.24 ^a
<i>Guazuma ulmifolia</i>	19.20 ^{de}	24.67 ^d	6.089 ^d	0.3372 ^b	3.54 ^{cd}	0.5862 ^c	0.4541 ^c	35.674 ^d

<i>Piscidia piscipula</i>	23.61 ^{bcd}	29.07 ^d	7.286 ^{cd}	0.5477 ^{ab}	3.51 ^{cd}	0.8844 ^{bc}	0.4743 ^c	41.771 ^d
<i>Leucaena leucocephala</i>	14.61 ^e	29.57 ^d	7.515 ^{cd}	0.4308 ^{ab}	3.51 ^{cd}	0.66 ^c	0.457 ^c	42.14 ^d
<i>Bursera simaruba</i>	22.57 ^{bcd}	28.97 ^d	7.232 ^{cd}	0.5277 ^{ab}	3.31 ^d	0.8378 ^{bc}	0.4968 ^{bc}	41.375 ^d
<i>Enterolobium cyclocarpum</i>	25.48 ^{abcd}	29.20 ^d	7.767 ^{cd}	0.6127 ^{ab}	3.75 ^{cd}	0.9733 ^{bc}	0.4509 ^c	42.751 ^d
<i>Moringa oleífera</i>	25.03 ^{abcd}	52.70 ^a	13.19 ^{ab}	0.9518 ^{ab}	6.62 ^{ab}	1.6523 ^{ab}	1.1516 ^a	76.264 ^a
<i>Lysiloma latisilicium</i>	19.89 ^{cde}	31.40 ^{cd}	7.817 ^{cd}	0.6422 ^{ab}	4.55 ^{bcd}	1.0044 ^{abc}	0.5212 ^{bc}	45.941 ^{cd}
<i>Brosimum alicastrum</i>	27.05 ^{ab}	48.84 ^{ab}	12.16 ^{ab}	0.9218 ^{ab}	7.86 ^a	1.531 ^{abc}	0.9704 ^a	72.279 ^{ab}
<i>Albizia lebeck</i>	30.42 ^a	42.34 ^{abc}	12.21 ^{ab}	1.0904 ^a	5.66 ^{abc}	1.9551 ^a	1.0216 ^a	64.27 ^{ab}
<i>Gliricidia sepium</i>	21.19 ^{bcde}	34.19 ^{cd}	8.11 ^{cd}	0.6592 ^{ab}	3.52 ^{cd}	1.2129 ^{abc}	0.8019 ^{abc}	48.49 ^{cd}
E.E	0.730	1.465	0.422	0.047	0.267	0.077	0.044	2.198

Para conocer si TC y saponinas influyen en la producción de CH₄ se realizó una correlación de Pearson. En el Cuadro 8 se muestra que existe una correlación negativa con la cantidad de TC y la producción de CH₄, no así entre el contenido de saponinas y la producción de CH₄. Parte de la disminución de CH₄ con TC pudiera atribuirse a una disminución en la DMS de los nutrientes, resultado de complejos formados por taninos con proteínas e hidratos de carbono (McSweeney *et al*, 2001). Cualquier reducción en la degradación de la fibra es probable que reduzca la formación de CH₄, ya que se emiten H₂ como sustrato para la metanogénesis (Moss *et al.*, 2000).

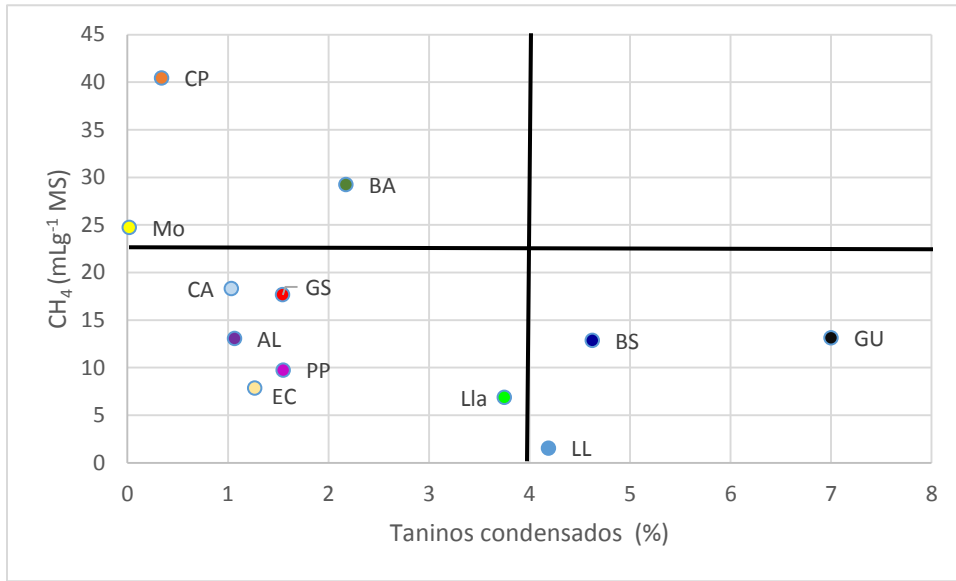
Cuadro 8. Coeficientes de correlación Pearson, N = 55

	TC	Saponinas	CH ₄	DMS
TC	1.00000	0.19120	-0.43771	-0.59764
Saponinas	0.19120	1.00000	-0.06023	0.27386
CH ₄	-0.43771	-0.06023	1.00000	0.68732
DMS	-0.59764	0.27386	0.68732	1.00000
		0.1620	0.0008	<.0001
		0.1620	0.6623	0.0431
		0.0008	0.6623	<.0001
		0.0431	<.0001	

La relación TC-CH₄ y saponinas-CH₄ se observa en la Figura 4a, donde se aprecia que a mayor cantidad de TC menor producción de CH₄. Los follajes que se encuentran en el cuadrante inferior izquierdo (*Cnidoscopus aconitifolius*, *Gliricidia sepium*, *Albizia lebbek*, *Piscidia piscipula*, *Enterolobium cyclocarpum*, *Lysiloma latisilicuum*), son los que tienen una mejor relación.

Por otro lado, en la figura 4b se muestra el contenido de saponinas de los follajes evaluados y la producción de CH₄. Se observa que la mayoría de los follajes tienen 3-5% de saponinas, excepto *Cnidoscopus aconitifolius*, que es cercano a 7%. Sin embargo, no se observa una correlación entre estas dos variables.

a)



b)

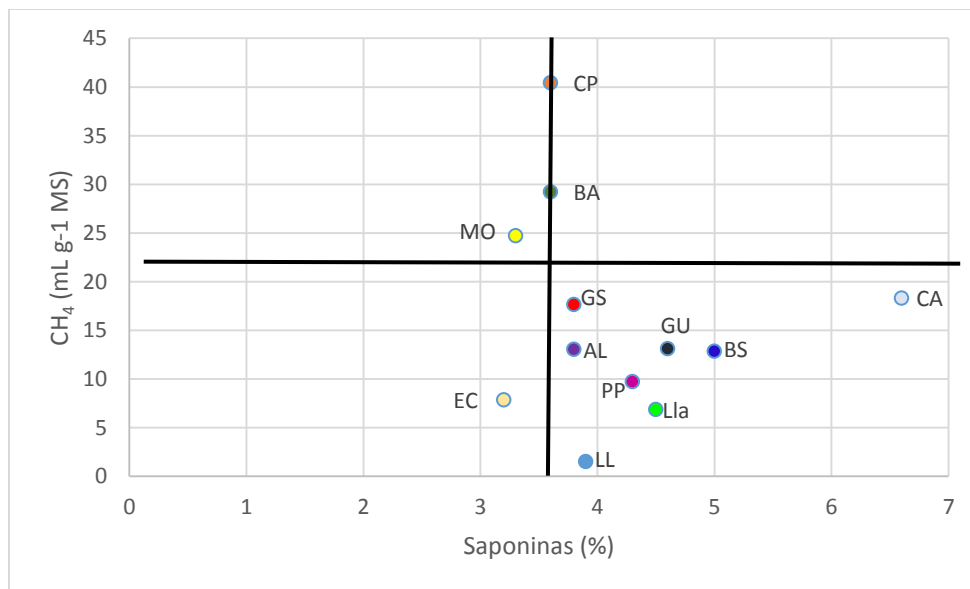


Figura 4. Relación TC-CH₄ y saponinas-CH₄. CP-*Cynodon plectostachius*; CA-*Cnidocolus aconitifolius*; GU-*Guazuma ulmifolia*; PP-*Piscidia piscipula*; LL-*Leucaena leucocephala*; BS-*Bursera simaruba*; EC-*Enterolobium cyclocarpum*; MO-*Moringa oleifera*; LLa-*Lysiloma latisilicium*; BA-*Brosimum alicastrum*; AL-*Albizia lebbek*; GS-*Gliricidia sepium*.

1.4 CONCLUSIONES

Bajo las condiciones de este experimento, se concluye que los follajes evaluados presentaron una gran variabilidad en la composición química. También, todos produjeron menor cantidad de CH₄ comparado con el testigo (*Cynodon plectostachius*), debido probablemente al contenido de TC presente en los follajes, ya que TC influye en la degradabilidad de la MS, MO y, por ende, en la PG.

Respecto a la producción de AGVs, follajes como *Cnidocolus aconitifolius*, *Brosimum alicastrum* y *Moringa oleífera* favorecen una mayor producción. Estos follajes produjeron mayor cantidad de ácido propiónico, y a pesar que tienen una elevada PG, la producción de CH₄ fue baja, lo que pudiera tener efectos positivos en la producción de los animales. Sin embargo, es altamente conveniente que se realicen estudios *in vitro* e *in vivo* utilizando los follajes como parte de una dieta integral, de tal manera que los resultados que se obtengan sean más realistas.

1.5 LITERATURA CITADA

- Almaráz-Buendía, I., Del Razo-Rodríguez, O.E., Campos-Montiel, R.G., Soriano-Robles, R., Ramirez-Bibriesca, E., Buendía-Rodríguez, G., Salinas-Martínez, J.A. y Espinosa-Muñoz, V., 2016. Producción de metano a partir de desperdicios vegetales usando la técnica de producción de gas *in vitro*. Paz, F. y Torres, R. (editores). Estado actual del Conocimiento del Ciclo del carbono y sus Interacciones en México: Síntesis a 2006. Serie Síntesis Nacionales. Programa Mexicano del Carbono en colaboración con la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Texcoco, Estado de México, México. ISBN en trámite. 462-467
- A.O.A.C., 2005 Official Methods of Analysis International Association of Official Analytical Chemists. 18th Edition. Arlington.
- Beauchemin, K.A., Kreuzer M. O'Mara, F. and Mcallister, A., 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: A review. *Aust J Exp Agri*. 48: 21-27.
- Bodas, R., Prieto, R. N., García-González, R., Andrés, S., Giráldez, F.J. and López, S., 2012. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Anim Feed Sci Tech*. 176(1): 78-93.
- Cobellis, G., Trabalza-Marinucci, M., and Yu, Z., 2016. Critical evaluation of essential oils as rumen modifiers in ruminant nutrition: A review. *Sci. Total Environ*. 545–546: 556–568.
- Delgado, D.C., Galindo, J., González, R., González, N., Scull, I., Dihigo, L., Cairo, J., Aldama, A., and Moreira, O., 2012. Feeding of tropical trees and shrubs foliages as a strategy to reduce ruminal methanogenesis: studies conducted in Cuba. *Trop Anim Health Prod*. 44: 1097-1104.
- Elghandou, M.M. Y., Vallejo, L.H., Salem, A.Z.M., Camacho, M. L., Buendía, G., and Odongo, N.E., 2017. Effects of Schizochytrium microalgae and sunflower oil

as sources of unsaturated fatty acids for the sustainable mitigation of ruminal biogases methane and carbon dioxide. *J of Clean Prod* 168: 1389-1397

Galindo, J., Gonzales, N., Marrero, Y., Sosa, A., Ruiz, T., Febles, G., Torres, V., Aldana, A., Achang, G., Moreira, O., Sarduy., L., Noda, A.C., 2014. Efecto del follaje de plantas tropicales en el control de la población de metano, y la producción de protozoos ruminales in vitro. *Revista cubana de ciencia agrícola*. 48(4): 359-364.

García, E., 2004. Modificación del sistema de clasificación climática de Köppen. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. 5 (6): 11-90.

Gerber, P.J., Steinfeld, H., Henderson, B., Mottet, A., Opio, C., Dijkman, J., Falcucci, A. and Tempio, G. 2013. Enfrentando el cambio climático a través de la ganadería – Una evaluación global de las emisiones y oportunidades de mitigación. Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura (FAO), Roma.

Hook, S.E., Wright, A.G., and McBride, B.W., 2010. Methanogens: Methane Producers of the Rumen and Mitigation Strategies. Hindawi Publishing Corporation. *Archaea*. 1-11.

ISO 9648; Determination of tannin content in sorgum; first edition.1988.

<https://www.evs.ee/preview/iso-9648-1988-en.pdf>

Johnson, K.A. and Johnson, D.E. 1995. Methane emissions from cattle. *J Anim Sci*. 73: 2484-2492.

Kholif, A.E., Elghandour, M.M.Y., Rodríguez, Olafadehan, O.A., Salem, A.Z.M., 2017. Anaerobic ensiling of raw agricultural waste with a fibrolytic enzyme cocktail as a cleaner and sustainable biological product. *Journal of Cleaner Production*. 142: 2649-2655.

- Lee J. H., Jeon J. K., Kim S. G., Kim S. H. Chun T., Imm J. Y. 2011. Comparative analyses of total phenols, flavonoids, saponins and antioxidant activity in yellow soy beans and mung beans. *International Journal of Food Science and Technology*. 46, 2513-2519.
- McCullough, H., 1967. The determination of ammonia in whole blood by direct colorimetric method. *Clinical Chemistry*, 17: 297-304
- Meale S. J., McAllister, T. A., Beauchemin, K. A., Harstad, O. M., and Chaves, A. V., 2012. Strategies to reduce greenhouse gases from ruminant livestock, *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A. Anim Sci*. 62 (4): 199-211.
- Menke, H.K., Raab, L., Salewski, A., Steingass H., Fritz, D. and Schneider, W., 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. *Journal Agricultural Science*. 93: 217-222.
- Moss, A.R., Jouany, J.P., Newbold, J., 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Ann. Zootech*. 49: 231-253.
- NOM-062-ZOO-1999. Revisado el día 02 de noviembre de 2016, en el link <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO.PDF>
- Olijhoek, D. W., Hellwing, A. L. F., Brask, M., Weisbjerg, M. R., Højberg, O., and Larsen, M. K., Dijkstra, J., Erlandsen, E. J., and Lund., P., 2015. Effect of dietary nitrate level on enteric methane production, hydrogen emission, rumen fermentation, and nutrient digestibility in dairy cows. *J Dairy Sci*. 99: 6191–6205.
- Patra, A., Park, T., Kim, M., and Yu, Z., 2017. Rumen methanogens and mitigation of methane emission by antimethanogenic compounds and substances. *J Anim Sci Biotechno*. 8:13.

Patra, A.K., 2012. Enteric methane mitigation technologies for ruminant livestock: a synthesis of current research and future directions. *Environ Monit Assess.* 184:1929–1952.

SAS. Statistical Analysis System. Versión 0.9

Van Soest, P. J., Roberson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal Dairy Science*, 74: 3583-3597.

CAPITULO II. DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS RUMINALES POR MÉTODO DE LA PCR PUNTO FINAL.

2.1 INTRODUCCIÓN

El sector pecuario contribuye significativamente al aumento en la emisión de GEI, específicamente la emisión de CH₄ entérico por los rumiantes (Gerber *et al.*, 2013). Por ello varias investigaciones se han enfocado en desarrollar alternativas para disminuir la producción de GEI ya sea con aditivos como ionóforos, grasas, aceites esenciales, o uso de follajes forrajeros de calidad, entre otros, en las dietas de los rumiantes (Patra, 2012); sin embargo pocas investigaciones son las que se enfocan en los microorganismos ruminales, quienes son los que realmente producen estos gases. La mayoría de microorganismos ruminales viven en anaerobiosis y se desconocen las relaciones simbióticas entre ellos, ni sus condiciones de cultivo, motivo por el cual no se han podido cultivar en condiciones de laboratorio, dificultando su estudio. La mayoría de las investigaciones se limitan a conocer la concentración de los grupos microbianos ruminales (bacterias, hongos, protozoarios y los metanógenos), pero actualmente se implementan análisis con la técnica de PCR favoreciendo la identificación de un mayor número de estos microorganismos en comparación a las técnicas microbiológicas convencionales (Madigan, 2015). Por lo anterior, el objetivo de este capítulo fue establecer un protocolo de extracción de DNA de rutina para la futura evaluación de poblaciones microbianas de líquido ruminal.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

La extracción de DNA y la identificación de microorganismos ruminales se realizó en el Colegio de Postgraduados Campus Campeche en el Laboratorio de Fisiología Genómica y Molecular, localizado geográficamente 19° 49' latitud norte y 90° 55' longitud oeste, con clima subhúmedo con lluvias en el verano (García, 2004).

2.2.1 Colecta de la muestra de la fermentación *in vitro* de follajes tropicales.

Primera colecta:

Se realizó la fermentación *in vitro* de los follajes como se describe en el capítulo 1. Se colectaron muestras de líquido ruminal filtrado y recién colectado (hora cero), del blanco (líquido ruminal más el inóculo) tanto a la 0 y 72 horas y de la fermentación de cada uno de los follajes evaluados a las 72 horas. Se colectó 1 mL de cada una de las muestras anteriores, el cual se colocó en un tubo microcentrífugo de 1.5 mL y se centrifugó a 3,000 g durante 4 minutos. El sobrenadante de cada tubo se transfirió en otro tubo de igual capacidad y se congeló con nitrógeno líquido. Se realizaron 5 replicados de cada una de las muestras y horarios. Lo anterior se realizó en la primera y segunda etapa de colecta. En la tercera etapa, se colocó 1.5 mL de las muestras previamente descritas directamente al tubo microcentrífugo (estas muestras no se centrifugaron por falta de la microcentrífuga) y se congeló con nitrógeno líquido. Las muestras colectadas de las tres etapas se almacenaron a -80°C.

Segunda colecta:

Dentro de la segunda colecta, la muestra de la fermentación *in vitro* de los follajes tropicales se procesó de diferente manera, con el objetivo de conocer cuál es la mejor opción para almacenarla, sin que se degraden los ácidos nucleicos.

En la primera etapa de la colecta a la hora cero, se colectó la muestra en tubos microcentrífugos con tapón de rosca de 2 mL, que contenía perlas de vidrio (0.1 g de 0.1 mm y 0.1 g de 0.5 mm; las perlas se pesaron previo al experimento), los cuales se centrifugaron a 12,000 g durante 5 minutos; sin embargo debido al movimiento de las perlas durante la centrifugación no se formó una pastilla, lo que dificultó descartar el sobrenadante. A éstas muestras les quedo una parte del sobrenadante, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento de extracción.

Para la segunda y tercera etapa de la segunda colecta se realizaron tres maneras diferentes de almacenar la muestras, tal como se describe a continuación:

En la primera forma de colecta, se realizó un pellet celular, para ello se tomó 1.5 mL de muestra del vial con la fermentación *in vitro* de los follajes y se centrifugó a 12,000 g durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Este paso se repitió 3 veces en el tubo microcentrífugo por cada muestra y finalmente las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C.

En la segunda forma de colecta, se colectaron 1.5 mL de la muestra del vial con la fermentación *in vitro* de los follajes y se centrifugó a 200 g durante 2 minutos,

el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se centrifugó a 12,000 g durante 5 minutos, el sobrenadante se descartó, para tener un paquete celular suficiente para la extracción de DNA. Nuevamente se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C

En la tercera forma de colecta, se colectaron 1.5 mL de muestra de la fermentación *in vitro* de cada uno de los follajes y se colocaron en un tubo microcentrífugo de 1.5 mL. Se centrifugó a 12,000 g durante 5 min para hacer un paquete celular, se le adicionó 1 mL de la solución de lisis del protocolo de Wilson *et al.* (1990) y se agitó con vórtex (esto se realizó para que la pastilla entrara en contacto con la solución y evitar la degradación de los ácidos nucleicos). Posteriormente las muestras se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento.

2.2.2 Extracción de DNA de microorganismos ruminales de la fermentación *in vitro* de follajes tropicales

Dado que la calidad del DNA depende del método de extracción (Henderson *et al.*, 2013) se optó por probar la eficiencia de dos diferentes protocolos, el de Yu y Morrison (2004) y el de Wilson *et al.* (1991), los cuales se han usado ampliamente para la extracción de DNA de microorganismos ruminales. Yu y Morrison (2004) mencionan que con este protocolo se obtiene mejores rendimientos de DNA y libre de sustancias inhibidoras.

A continuación, se describen los protocolos de Yu y Morrison (2004) y Wilson *et al.* (1990), en el apéndice 5 se describe cómo preparar la solución stock y de trabajo:

Protocolo de Wilson *et al.*, 1990 (versión Original):

1. Centrifugar la muestra a 2,000 g durante 20 minutos a 4°C.
2. Adicionar 0.5 mL de solución de lisis, un volumen igual de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (50:48:2) y 0.05 volumen de perlas de vidrio de diámetro 0.25 a 0.50µm.
3. Mezclar en el mini beadbug durante 1 minuto.
4. Centrifugar a 16,000 g durante 1 minuto a temperatura ambiente.
5. Recuperar el sobrenadante y agregar fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (50:48:2).
6. Centrifugar 16,000 g durante 1 minuto a temperatura ambiente.
7. Agregar cloroformo-alcohol isoamílico (48:2).
8. Centrifugar 16,000 g durante 1 minuto a temperatura ambiente.
9. Recuperar fase acuosa en un tubo microcentrífugo.
10. Precipitar con 0.1 vol de LiCl 2M y 2.5 vol de etanol, incubar durante 15 minutos en hielo.
11. Centrifugar a 16,000 g por 20 minutos a 4°C.
12. Lavar el pellet con etanol al 95%.
13. Resuspender el pellet con agua millipore (mp) y precipitar con 0.1 vol de acetato de sodio 2M y 3 vol de etanol.
14. Lavar con etanol los ácidos nucleicos, secar al vacío y disolver en 50 µL de agua mp destilada.

Protocolo de Yu y Morrison, 2004 (protocolo original):

1. En tubo microcentrífugo de 2.0 mL colocar 0.25 g de muestra, adicionar 1 mL de la solución buffer y 0.4 g de perlas (0.3 g de 0.1 mm y 0.1 g de 0.5 mm).
2. Homogenizar en el mini beadbug por tres minutos a velocidad máxima
3. Incubar a 70°C por 15 minutos, y agitar suavemente por 5 minutos.
4. Centrifugar durante 5 minutos a 16,000 g a 4°C, transferir el sobrenadante a un tubo microcentrifugo de 2 mL.
5. Adicionar 300 µL de solución de lisis y repetir paso 2 - 4.
6. Adicionar 260 µl de acetato de sodio, mezclar e incubar 5 minutos en hielo.
7. Centrifugar a 16,000g durante 10 minutos a 4°C.
8. Transferir el sobrenadante a dos tubos microcentrifugos de 1.5 mL, adicionar un volumen de isopropanol, mezclar e incubar en hielo por 30 minutos.
9. Centrifugar a 16,000g durante 15 minutos a 4°C. Remover el sobrenadante usando aspiración, lavar con los ácidos nucleicos con etanol al 70% y secar el pellet con vacío durante 3 minutos.
10. Disolver el pellet de los ácidos nucleicos en 100 µl de buffer TE (Tris-EDTA).
11. Para remover el RNA y proteínas se adiciona 2 µl de RNasa libre de DNasa (10 mg/mL), incubar a 37°C durante 15 minutos.
12. Se utiliza el QIAamp DNA Stool mini kit para purificar DNA
13. El DNA se almacena a -20°C

Primero se realizó la extracción de la muestra de fermentación *in vitro* de *Cnidocolus aconitifolius* (T1) y *Brosimum alicastrum* (T9) (almacenadas en la

primera colecta) con el protocolo de Yu y Morrison (2004) con algunas modificaciones, como se muestra a continuación:

Protocolo de Yu y Morrison, 2004 (versión 1):

1. De la muestra descongelada, se tomaron 250 μ L y colocaron en un segundo tubo de 2 mL con tapón de rosca y base cónica con 0.2g de perlas (0.1g de 0.1mm y 0.1g de 0.5mm), se adicionó 1 mL de la solución de lisis.
2. Se realizó la lisis mecánica con en el mini beadbug durante tres minutos a velocidad máxima.
3. Se centrifugó durante 5 minutos a 16,000 g y se recuperó el sobrenadante.
4. Al sobrenadante recuperado se le adicionó 260 μ l de acetato de amonio (10M), se mezcló suavemente, posteriormente se incubó 5 minutos en frío.
5. Se centrifugó a 16,000 g durante 10 minutos a 4°C.
6. El sobrenadante se transfirió a dos tubos de 1.5 mL y adicionó un volumen de isopropanol, se mezcló suavemente y se incubó en frío durante 30 minutos.
7. Se centrifugó a 16,000g durante 15 minutos a 4°C y remover el sobrenadante
8. Se lavó el pellet con 1 mL de etanol al 75%, se centrifugó a 16,000g durante 5 minutos a 4°C y se removió el sobrenadante.
9. El pellet se secó en la estufa a 36°C, se resuspendió en agua mp y se almacenó a -20 °C.

A la par se extrajo DNA con el protocolo de Yu y Morrison versión 2, el cual consiste en cambiar el paso 4, 5 y 6 del protocolo versión 1, donde después de

recuperar el sobrenadante se adicionó un volumen igual de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, se agitó con vórtex y se centrifugó en las mismas condiciones descritas del protocolo y finalmente se recuperó el sobrenadante al cual se le adicionó 0.2 volumen de acetato de sodio (3M). Los demás pasos no se modificaron.

Posteriormente se realizó la extracción de DNA de la muestra blanco (colectado a la hora cero) y del testigo (T10-*Cynodon plestustachius*, colectado al as 72 h), mediante el protocolo de Yu y Morrison (2004) versión 2 y con el protocolo de Wilson *et al.* (1990) versión 1.

Protocolo de Wilson *et al.*, 1990 (versión 1):

1. De la muestra descongelada se tomaron 450 μ L y se colocó en un segundo tubo de 2 mL con tapón de rosca y base cónica con 0.2 g de perlas (0.1 g de 0.1 mm y 0.1 g de 0.5 mm), se adicionó 450 μ L de la solución de lisis y un volumen igual de fenol- cloroformo- alcohol isoamílico (50: 48: 2).
2. Se mezclaron en el mini beadbug, durante 3 minutos a velocidad máxima y se centrifugó a 16,000 g durante 1 minuto a 4°C.
3. Al sobrenadante recuperado se le agregó fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (50:48:2), se agitó con vórtex.
4. Se centrifugó a 16,000g durante 1 minutos a 4°C.
5. Se recuperó la fase acuosa y se adicionó un volumen igual de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, se agitó con vórtex.
6. Se centrifugó a 16,000g durante 4 minutos a 4°C.

7. A la fase acuosa recuperada se le agregó 0.1 vol de LiCl al 3M y 2.5 volúmenes de etanol, y se incubó durante 15 minutos en frío.
8. Se centrifugó a 16,000g durante 20 minutos a 4°C.
9. Se tiró el sobrenadante y se lavó el pellet con 1 mL de etanol al 75%
10. Se centrifugó a 16,000 g durante 5 minutos a 4°C
11. Se resuspendió con agua mp.
12. Se realizó una segunda precipitación con 0.1 vol de acetato de sodio 2M y 3 vol de etanol. Se centrifugó a 16,000 g durante 5 minutos a 4°C.
13. Se tiró el sobrenadante y se lavó el pellet con 1 mL de etanol al 75%, se centrifugó a 16,000g durante 5 minutos a 4°C.
14. Se secó el pellet, se resuspendió en agua mp y se almacenó a -20°C

Se realizó la extracción de la muestra blanco (de la primera colecta, a la hora cero). Para ello la muestra se centrifugó a 12,000 g durante 5 minutos para hacer un pellet de la muestra. Una vez obtenido el pellet se le adicionó 1 mL de solución de lisis, se homogenizó con vortex y se colocó en el vial con perlas, para seguir el protocolo de Yu y Morrison versión 2.

Posteriormente a la muestra de líquido ruminal y el blanco (almacenado de la segunda colecta, a la hora cero) se les extrajo DNA con el protocolo de Wilson *et al.* (1990) versión 2.

1. Al paquete celular se le agregó 600 µl de sol. de lisis, se agitó con vórtex y se transfirió a un segundo tubo de 2 mL con tapón de rosca y base cónica

con 0.2 g de perlas (0.1g de 0.1mm y 0.1g de 0.5mm). Se adicionó 600 μ L de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (1 vol).

2. Se homogenizó en el mini beadbug durante 90 segundos a velocidad máxima, se colocó en hielo aproximadamente 5 minutos y se homogenizó nuevamente durante 90 segundos a velocidad máxima, esto para evitar que la muestra se sobrecalentara.
3. Se centrifugó durante 5 minutos a 16,000 g, la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo de 2 mL.
4. Al sobrenadante se le adicionó 300 μ l (1 vol) fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, se agito con vórtex, y se centrifugó a 16,000 g durante 5 minutos a 4°C
5. Se repitió el paso 4.
6. Se colectó la fase acuosa, se adicionó 0.1 vol de LiCl 2 M (30 μ L en cada tubo) y 2.5 vol de etanol (750 μ L cada tubo).
7. Se incubó 15 minutos en frio.
8. Se centrifugó a 16,000 g durante 20 minutos a 4°C.
9. Se removió el sobrenadante y se lavó el pellet con 1 mL de etanol al 75%.
10. Se centrifugó a 16,000 g durante 5 minutos a 4°C y se tiró el sobrenadante
11. Se resuspendió con 100 μ l de agua mp.
12. Se realizó una segunda precipitación con 0.1 vol de acetato de amonio 3 M y 3 vol de etanol, se agitó suavemente y se incubó 15 minutos en frio.
13. Se repitieron los pasos 8, 9, 10, y se resuspendió en 50 μ l con agua mp.
14. Se realizó la cuantificación y la electroforesis (cuadro 10, figura 4).

Para determinar si hay influencia por el método de colecta, se realizaron extracciones de DNA de líquido ruminal recién filtrado, líquido ruminal centrifugado, el blanco y el blanco centrifugado de la hora cero, por el método de Yu y Morrison (2004) versión 2, haciendo algunas modificaciones como se describe a continuación (versión 3):

1. Al paquete celular se le agregó 1 mL de solución de lisis, se agitó con vortex y se transfirió a un segundo tubo de 2 mL con tapón de rosca y base cónica con 0.2 g de perlas (0.1 g de 0.1 mm y 0.1 g de 0.5 mm).
2. Se realizó la lisis con en el mini beadbug durante tres minutos a velocidad máxima.
3. La muestra lisada se incubó a 70°C durante 15 minutos, posteriormente se agitó suavemente, por aproximadamente 5 minutos.
4. Se centrifugó durante 5 min a 16,000g y se recuperó el sobrenadante.
5. Al sobrenadante recuperado se le adicionó 300 µl de la solución de lisis, se agitó con vórtex y se centrifugó durante 5 minutos a 16,000g.
6. Se recuperó el sobrenadante y se le agregaron 260 µl de acetato de amonio 10M, se mezcló suavemente y posteriormente se incubó 5 minutos en frío.
7. Se centrifugó a 16,000g durante 10 minutos a 4°C.
8. El sobrenadante se transfirió a dos tubos de 1.5 mL y adicionó un volumen de isopropanol, se mezcló suavemente y se incubó en frío durante 30 minutos.
9. Se centrifugó a 16,000g durante 15 minutos a 4°C y se removió el sobrenadante.

10. Se lavó el pellet con 1 mL de etanol al 75%.
11. Se centrifugó a 16,000g durante 5 minutos a 4°C y se removió el sobrenadante.
12. El pellet se secó en la estufa a 36 °C, se resuspendió en agua mp y se almacenó a -20 °C.
13. Se realizó la cuantificación y la electroforesis (Cuadro 11 y Figura 5).

Una vez obtenido el DNA con el protocolo de Yu y Morrison versión 3, a un duplicado de la muestra se le adicionó una segunda precipitación con 0.1 vol de acetato de sodio 3 M y 3 vol de etanol. Se agitó suavemente y se incubó 15 minutos en frío, posteriormente se repitieron los pasos 9, 10, 11 y 12 (Versión 4).

Al proceso de extracción de Wilson *et al.* (1990) versión 2, sólo se le modificó el intervalo de lisis, estos fueron tres repeticiones de 60 segundos a velocidad máxima, al término de los 60 segundos se colocó la muestra lisada en hielo para enfriar la muestra (Versión 3).

Posteriormente se realizó la extracción de la muestra de líquido ruminal (hora 0) y el blanco (hora 24) almacenados de la segunda colecta, el DNA se extrajo por el protocolo de Yu y Morrison (versión 4) y las muestras de líquido ruminal y el blanco centrifugado (a la hora cero), colectadas mediante la versión 3 del protocolo de Wilson *et al.* (1990). Estas muestras colectadas con la solución de lisis se descongelaron y transfirieron al tubo con perlas, y la muestra en pellet se le adicionó 1 mL de solución de lisis y se transfirió al tubo con perlas. Después se realizó la lisis y se siguió todo el protocolo (versión 3).

Posteriormente, se realizó la extracción de DNA de las muestras obtenidas en la primera colecta. Se les extrajo DNA a diferentes muestras, colectadas en los diferentes horarios. Las muestras (líquido ruminal, blanco a la hora 0, de los tratamientos 1 y 11) que se trabajaron con el protocolo de Yu y Morrison (versión 4), se descongelaron a temperatura ambiente, una vez que las muestras se descongelaron se tomaron 1 mL y se colocaron en el tubo con perlas y se le adicionó 1 mL de la solución de lisis, después de tener la muestra lisada, se siguieron los pasos de la versión 4.

En el caso de la extracción con el protocolo de Wilson *et al.*, (1990) a las muestras T9, T10, T12 Y T13 se les adicionó 800 ml de la solución de lisis, para evitar que al descongelarse el DNA no se degradara, se tomó 1 mL y se colocó en el tubo con perlas y se adicionó un volumen igual de fenol cloroformo alcohol isoamilico, y se realizó la lisis en tres periodos de 30 segundos, en los intervalos se puso en hielo, posteriormente se realizó la metodología de Wilson *et al.* (1990) versión 3.

Se realizó un pool de la muestra T2 con los tres periodos de colecta, y se extrajo DNA con ambos protocolos Wilson *et al.* (versión 3) y Yu y Morrison (versión 4). Para ello, se descongelaron las muestras de las diferentes etapas a temperatura ambiente, de cada etapa se tomaron 350 μ L y se colocaron en el tubo con tapón de rosca de 2 mL con perlas de vidrio y se adicionó 1 mL de la solución de lisis, posteriormente se realizó el protocolo sin modificaciones.

2.2.3 Electroforesis

Se prepararon geles de agarosa al 1.2%, bajo las recomendaciones de Sambrook y Russell (2001). Para preparar el gel se usó 0.72 g de agarosa y TBE 1X (apéndice 5) y 54 mL de agua destilada estéril, y se calentó hasta que la agarosa se disolvió, se vierte al molde con precaución para no generar burbujas en el gel, se colocó el peine de 14 o 20 pozos, dependiendo del número muestras. Se deja enfriar por completo el gel.

El gel se colocó en la cámara de electroforesis, se colocó el TBE 1x hasta cubrir totalmente el gel. Como buffer de carga se usó UVIEW™ 6x. La corrida se realizó a 75-80 mA y se demoró 2 horas aproximadamente.

2.2.4 Reacción de PCR.

El DNA extraído del pool de la fermentación *in vitro*, se usó como molde para la amplificación del gen 16S rRNA por PCR punto final, con los oligonucleótidos para bacteria universal 1114F y 1221R (cuadro 10) y la DNA polimerasa iproof™ High-Fidelity DNA. Para ello se calculó una reacción de 20 µl, con las especificaciones del kit, la cual menciona que se deben tener la siguiente concentración final (cuadro 8) y condiciones de PCR (cuadro 9):

Cuadro 8. Componentes de la reacción de PCR.

	Wilson <i>et al.</i> (μ L)	Yu y Morrison (μ L)	Control negativo (μ l)	Concentración final
5x iProof HF Buffer	4	4	4	1x
10 mM dNTP mix	0.4	0.4	0.4	200 μ M/cada uno
Primer F	1.0	1.0	1.0	0.5 μ M
Primer R	1.0	1.0	1.0	0.5 μ M
DNA	0.5	0.3	0	*
H₂O	12.9	13.1	13.8	
iProof DNA polimerasa	0.2	0.2	0.2	0.02U/ μ L

*Se utilizó por reacción 50ng de DNA

Se colocó la reacción en el termociclador y se ejecutó el programa de PCR con las condiciones que se describen en el cuadro 9:

Cuadro 9. Condiciones de PCR

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	98°C	30 s	
Desnaturalización	98°C	10 s	
Alineación *	58°C	15 s	35
Extensión	72°C	30 s	
Extensión final	73°C	7 min	

* La temperatura de alineación depende del primer a usar

Cuadro 10. Oligonucleotido Universal para bacteria.

Secuencias	Tm.	Gen.	Pb	Ref.
1114(F)5'CGGCAACGAGCGCAAC CC 3'	60°C	16S rRNA	130	Lane (1991). Denman and McSweeney, (2006).
1221(R)5' CCATTGTAGCACGTGTGTAGCC 3'				

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Cuantificación por espectrofotometría

Una vez obtenido el DNA de la fermentación *in vitro* bajo las metodologías antes descritas, se evaluó la cantidad y la calidad, por espectrofotometría. En los cuadros 11, 12 y 13 se mencionan las concentraciones de DNA obtenido con los protocolos de Yu y Morrison (2004) y Wilson *et al.* (1990) y sus respectivas modificaciones. En el cuadro 11 se puede observar que la concentración de DNA, y la relación 260/230 y 260/280 no se vio afectada por la precipitación con acetato de sodio.

Cuando se comparó la extracción de Wilson *et al.* (versión 1) con la de Yu y Morrison (versión 2), se observó una mejoría en la concentración al momento de extraer con el protocolo de Wilson *et al.*, sin embargo, se muestra una mejor concentración de DNA al hacer un pellet celular (cuadro 12).

En el cuadro 13 se observa la concentración de DNA de microorganismos ruminales de la fermentación *in vitro* de follajes tropicales, extraído con el protocolo de Wilson *et al.* (versión 2).

El DNA obtenido y cuantificado, como se observa en el cuadro 11, 12 y 13, se usó para elaborar la electroforesis. En la figura 4 se muestra que del pozo 1 al pozo 9, excepto el 6, las bandas están barridas, lo que indica que el DNA se degradó, mientras que del pozo 10 al 13 se muestra una banda más definida,

indicando que hay DNA integro, en el pozo 6, se obtuvo baja concentración de DNA que no se puede observar en la imagen.

Cuadro 11. Concentración y pureza de DNA de microorganismos ruminales, extraído mediante el protocolo versión 1 de Yu y Morrison, 2004.

Pozo	Muestra	ng/uL	260/280	260/230
1	T1 (III) fenol +A de sodio	140.0	1.75	1.58
2	T1 (III) fenol	122.1	1.75	1.43
3	T9 (II) fenol + A de sodio	133.1	1.68	1.08
4	T9 (III) fenol	119.0	1.65	1.24

Cnidioscolus aconitifolius (T1) y *Brosimum alicastrum* (T9) colectados en la etapa III. Acetato de sodio (A)

Cuadro 12. Concentración y pureza de DNA de microorganismos ruminales, extraído mediante el protocolo de Yu y Morrison (2004; versión 2) y Wilson et al. (1990; versión 1).

Pozo	Muestra	ng/uL	260/280	260/230
5	blanco 0 (III) ^W	572.30	1.77	1.41
6	blanco 0 (III) ^Y	9.09	2.22	1.84
7	blanco 0 (III) ^Y P	452.60	1.84	1.31
8	T10 (II) ^W	212.27	1.52	0.95
9	T10 (II) ^Y	43.55	1.71	0.93

DNA extraído por el método de Yu y Morrison (Y) o de Wilson et al. (W). La muestra blanco fue colectado en la etapa III y *Cynodon pleustachius* (T10) colectado en la etapa II. La muestra se centrifugó para hacer un pellet (P).

Cuadro 13. Concentración y pureza de DNA de microorganismos ruminales, extraído mediante el protocolo Wilson et al. (1990; versión 2).

Pozo	Muestra	ng/UI	260/280	260/230
10	Líquido Ruminal	358.3	1.64	1.1
11	Líquido Ruminal *	389.8	1.63	1.07
12	Blanco 0*	164.4	1.55	0.62
13	Blanco 0	132.2	1.73	1.13

*Repetición técnica de la muestra durante la extracción.

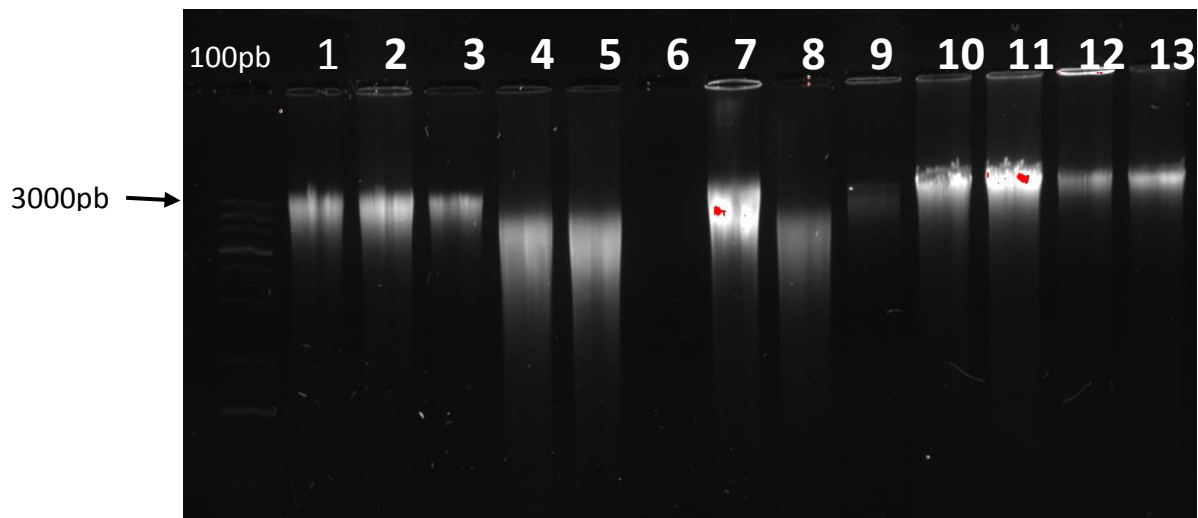


Figura 4. DNA de microorganismos ruminales obtenido mediante distintos protocolos de extracción. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % con TBE 1X. DNA Pozos 1-4 DNA extraído con el protocolo de Yu y Morrison, 2004 (cuadro 11), pozos 5-9 se muestra DNA extraído por el protocolo de Yu y Morrison, 2004 versión 2 y de Wilson *et al.*, 1990 (cuadro 12) y pozos 10-13 DNA extraído con el protocolo de Wilson *et al.* (1990) versión 2 (cuadro 13).

En el cuadro 14 se muestra la concentración y pureza de DNA de microorganismos ruminales, el cual se almacenó en la segunda colecta con la segunda forma de colecta. El DNA se extrajo con el protocolo de Yu y Morrison (versión 3). Al DNA de las muestras se les adicionó una segunda precipitación con acetato de sodio (3M). Puede observarse que la concentración de DNA es similar con una o dos precipitaciones y que las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230 tampoco cambiaron.

En el cuadro 15 se muestra la concentración de DNA de microorganismo ruminales, de las muestras colectadas en pellet, el cual se extrajo con el protocolo de Wilson *et al.* (Versión 3), la concentración obtenida fue superior a las concentraciones del cuadro 14, sin embargo, en el gel de agarosa, se observa que

las bandas de los pozos 5-9, correspondientes al protocolo de Wilson *et al.*, están barridas, lo que indica que el DNA esta degradado.

Cuadro 14. Concentración y pureza de DNA de microorganismos ruminales extraído mediante el protocolo Yu y Morrison, 2004 (versión 3).

Pozo	Muestra	ng/uL	260/280	260/230
1	LRC	507.7	1.56	0.79
2	LR	369.9	1.51	0.63
3	BC0	423.3	1.55	0.67
4	B0	374.1	1.62	0.72
10	LRC (A)	567.1	1.41	1.01
11	LR (A)	550	1.5	0.9
12	B0 (A)	763.4	1.67	0.84
13	BC0 (A)	685.5	1.74	1.01

LRC-líquido ruminal centrifugado; LR-líquido ruminal; BC0- blanco centrifugado a la hora 0; B0- blanco a la hora 0. (A) indica una segunda precipitación con acetato de sodio.

Cuadro 15. Concentración y pureza de DNA de microorganismos ruminales extraído mediante el protocolo Wilson *et al.*, 1990 (versión 3).

Pozo	Muestra	ng/uL	260/280	260/230
5	LRC	1712.6	1.85	0.79
6	LR	1198.4	1.86	0.63
7	BC0	1652.6	1.81	0.67
8	B0	1185.6	1.85	0.72
9	BC0W	1265.0	1.90	1.76

LRC-líquido ruminal centrifugado; LR-líquido ruminal; BC0- blanco centrifugado a la hora 0; B0- blanco a la hora 0; BC0W- blanco a la hora 0 centrifugado almacenado con solución de lisis de Wilson *et al.*

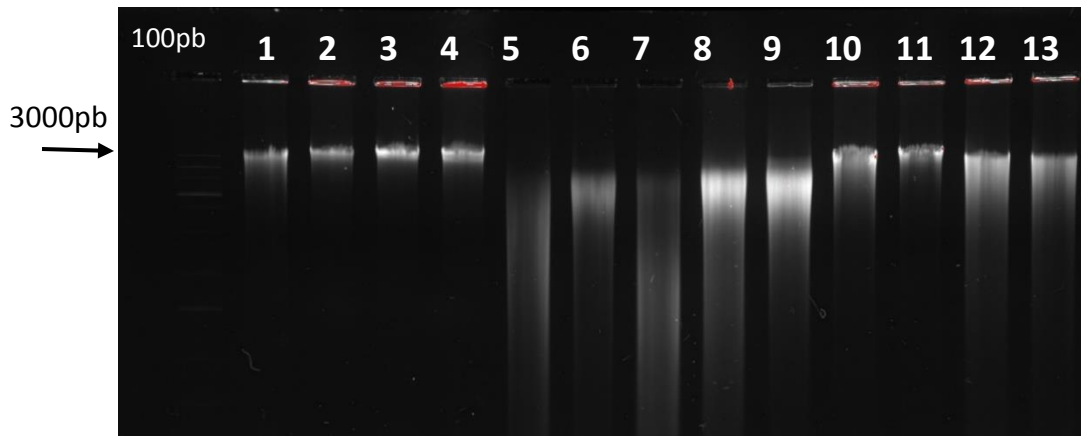


Figura 5. DNA de microorganismos ruminales extraído con variaciones de los protocolos de Yu-Morrison, 2004 y Wilson *et al.*, 1990 (ver texto y cuadros). Electroforesis en gel de agarosa al 1.2%. Pozos 1- 4 DNA extraído con el protocolo de Yu y Morrison 2004 versión 3 y del 10-13 Yu y Morrison, 2004 con una segunda precipitación con acetato de sodio. Pozos 5-9 es DNA extraído con el protocolo de Wilson *et al.* versión 3.

En el cuadro 16 se muestra la concentración y pureza de DNA de líquido ruminal de las muestras almacenadas con la solución de lisis del protocolo de Wilson *et al.*, se denota una mayor la concentración de DNA; sin embargo, en la electroforesis (figura 6), muestra que el DNA extraído por el protocolo Wilson *et al.* (versión 3) está degradado evidenciado por un barrido en los carriles 1-3. Por el contrario, se observan dos bandas nítidas en los pozos 4 y 5 correspondientes a las extracciones por el método de Yu y Morrison (versión 4).

Cuadro 16. Concentración y pureza de DNA de líquido ruminal extraído mediante el protocolo de Yu y Morrison, 2004 y Wilson *et al.*, 1990.

Pozo	Muestra	ng/uL	260/280	260/230
1	B0 ^W P	924.8	1.81	1.29
2	BC0 ^{W*}	560.8	1.83	1.61
3	LR ^W *	1014.5	1.79	1.29
4	B24 ^Y P	441.2	1.62	0.82
5	LR ^Y P	1500	1.67	0.75

B0- blanco a la hora 0; BC0- blanco centrifugado a la hora 0; LR-líquido ruminal; B24- blanco a la hora 24. Muestra en Pellet (P). * Muestra almacenada con solución de lisis.

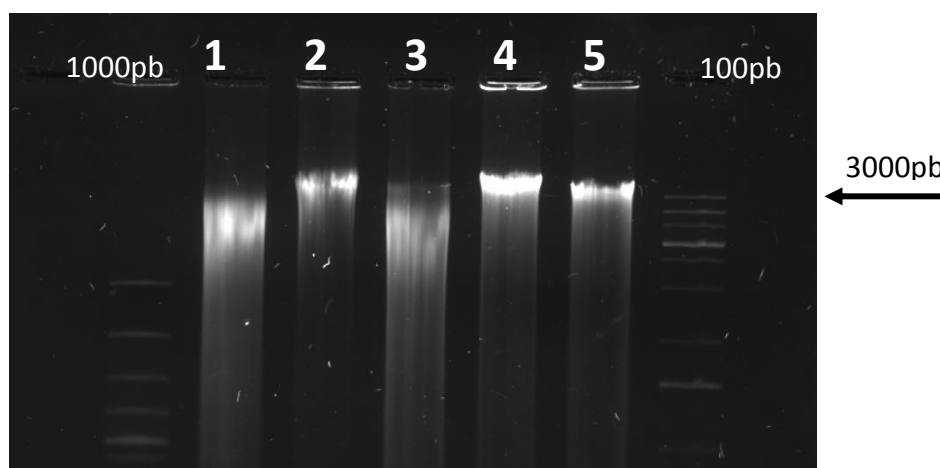


Figura 6. DNA de microorganismos ruminales extraído por el el método de Wilson *et al.*, 1990 versión 3 y Yu-Morrison, 2004 versión 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2%. Pozos 1-3 DNA extraído con el método de Wilson *et al.*, 1990 y pozos 4 y 5 con el método de Yu-Morrison, 2004 (cuadro 16).

De la extracción con las muestras almacenadas en la primera colecta, por ambos protocolos versión 3, se puede observar en el cuadro 17 y 18, que se obtiene menor concentración de DNA de las muestras, en comparación con las extracciones realizadas a las muestras almacenadas en pastilla. Así también, se observa que las mejores relaciones 260 /280 y 260/230 son obtenidos por el protocolo de Yu y Morrison, aunque al observar el gel de electroforesis se aprecian bandas nítidas en

ambos protocolos (figura 6 y 7), aunque se aprecian un poco mejor en el protocolo de Wilson *et al.*

Cuadro 17. Concentración y pureza de DNA de microorganismos ruminales, obtenido mediante el protocolo de Yu y Morrison optimizado.

Pozo	Muestra	ng/uL	260/280	260/230
1	LR (III)	478.25	1.92	1.77
2	B0 (III)	206.9	1.90	1.81
3	T1 (II)	69.42	1.78	1.94
4	T11 (II)	887.16	1.79	1.92

LR- Líquido ruminal; B0- blanco hora 0; T1-*Cnidioscolus aconitifolius*; T11- *Albizia lebbek*. El número entre paréntesis indica la fase de la colecta.

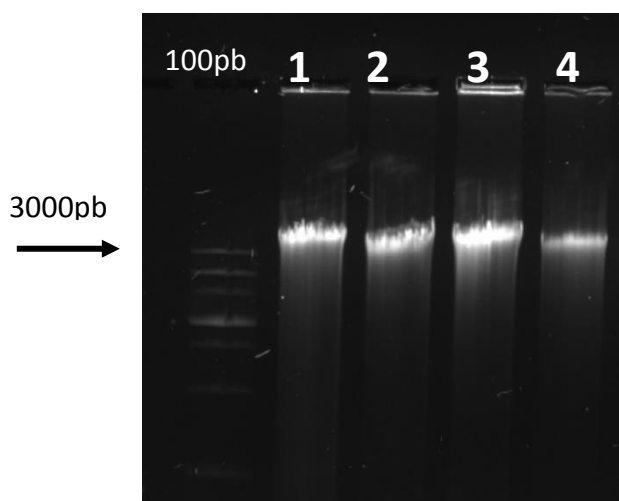


Figura 7. DNA de microorganismos ruminales extraído con el método de Yu y Morrison, 2004 optimizado (cuadro 17). Electroforesis en gel de agarosa al 1.2%.

Cuadro 18. Concentración y pureza de DNA de microorganismos ruminales, obtenido mediante el protocolo de Wilson *et al.*, 1990 optimizado.

Pozo	Muestra	ng/uL	260/280	260/230
1	T9 (II)	212.4	1.42	0.82
2	T10 (II)	100	1.59	1.08
3	T12 (III)	76.2	1.72	1.39
4	T13	81.1	1.44	0.84
5	LRC P	698.3	1.78	1.27

T9- *Brosimum alicastrum*; T10-*Cnidoscolus aconitifolius*; T12- *Gliricidia sepium*; T13-*Cnidoscolus aconitifolius*. El número entre paréntesis indica la fase de la colecta.

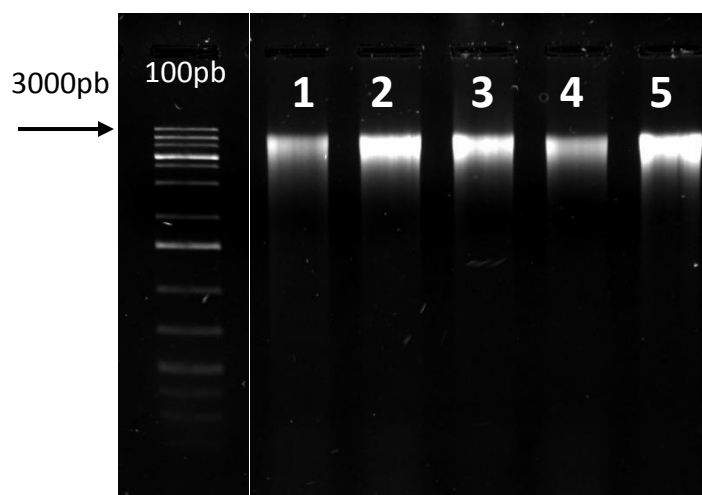


Figura 8. DNA de microorganismos ruminales extraído con el método de Wilson *et al.*, 1990 optimizado (cuadro 18). Electroforesis en gel de agarosa al 1.2%.

Posteriormente se realizó la extracción de DNA de microorganismos ruminales de la fermentación *in vitro* de follajes tropicales del pool de las muestras colectadas en las tres etapas, con los diferentes protocolos de extracción versión 3. Como se muestra en el cuadro 19, se obtuvo mayor concentración de DNA con el protocolo de Wilson *et al.*, pero al observar el gel de agarosa (figura 9), se muestra que el DNA obtenido con este protocolo estaba degradado mientras que el DNA obtenido

con el protocolo de Yu y Morrison se muestra en el gel como una banda nítida en el pozo 1, lo que indica que el DNA está integro.

Cuadro 19. Concentración y pureza de DNA de microorganismos ruminales, del pool de las tres etapas de la primera colecta.

Pozo	Muestra	ng/uL	260/280	260/230
1	T2 ^Y	176.1	1.75	1.10
2	T2 ^W	352.7	1.37	0.59

T2- *Guazuma ulmifolia*; DNA extraído con el protocolo de Yu y Morrison (versión 3) y Wilson *et al.* (versión 3).

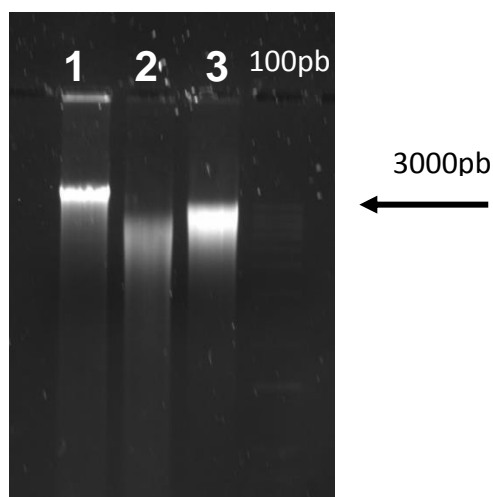


Figura 9. DNA de microorganismos ruminales obtenidos de las fermentaciones *in vitro* con los protocolos optimizados. Electroforesis en gel al 1.2 %. Pozo 1, DNA extraído con el protocolo de Yu y Morrison. Pozo 2, DNA extraído con el protocolo de Wilson *et al.* Pozo 3, control positivo (DNA de líquido ruminal centrifugado).

En la figura 10 se observa el producto de PCR a partir del DNA de la fermentación *in vitro* de follajes tropicales extraído con el protocolo de Yu y Morrison y Wilson *et al.*

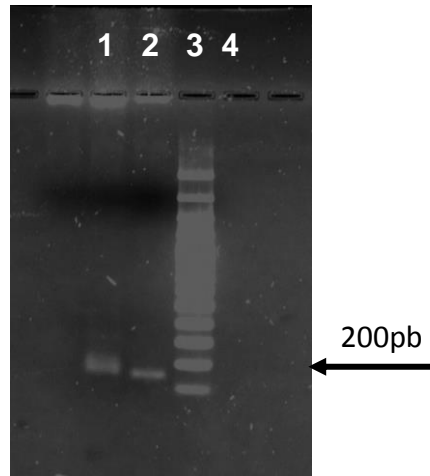


Figura 10. Amplificación del gen 16S rRNA con el oligonucleótido universal para bacteria a partir del DNA extraído de las fermentaciones in vitro de follajes tropicales. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos amplificados por PCR. Se observa una banda de aproximadamente 130pb correspondiente al tamaño esperado del amplicón. Pozo 1, testigo negativo (mezcla de reacción sin DNA). Pozo 2, DNA extraído del pool extraído con el protocolo de Wilson *et al.* optimizado. Pozo 3, DNA de pool extraído con el protocolo Yu y Morrison optimizado. Pozo 4, marcador molecular 100 pb.

2.4 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Se ensayaron varios protocolos de extracción de DNA, así como distintas formas de colecta de muestras provenientes de líquido ruminal con lo cual en el presente trabajo se establecieron los métodos a seguir para la colecta de muestras y su ulterior extracción de ácidos nucleicos. Se demostró que el DNA extraído es de calidad al poder emplearse para la identificación de grupos de microorganismos mediante PCR. Con el establecimiento de estos métodos futuros trabajos podrán identificar y cuantificar grupos microbianos de muestras provenientes de líquido ruminal mediante PCR o PCR cuantitativo.

2.5 LITERATURA CITADA

- García, E., 2004. Modificación del sistema de clasificación climática de Köppen. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. 5 (6): 11-90.
- Gerber, P.J., Steinfeld, H., Henderson, B., Mottet, A., Opio, C., Dijkman, J., Falcucci, A. and Tempio, G. 2013. Enfrentando el cambio climático a través de la ganadería – Una evaluación global de las emisiones y oportunidades de mitigación. Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura (FAO), Roma.
- Henderson. G., Cox. F., Kittelmann. S., Heidarian Miri, V., Zethof, M., Noel, S.J., Waghorn, G. C., Janssen, P. H., 2013. Effect of DNA Extraction Methods and Sampling Techniques on the Apparent Structure of Cow and Sheep Rumen Microbial Communities. PLoS ONE 8(9): e74787.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S., Buckley, D.H., Stahl, D.A., 2015. Brock biología de los microorganismos. 14 Edición. Pearson Educación, SA Madrid, España.
- Patra, A.K., 2012. Enteric methane mitigation technologies for ruminant livestock: a synthesis of current research and future directions. Environ Monit Assess. 184:1929–1952.
- Sambrook J. and Russell D.W. 2001. Molecular Cloning. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, EUA.
- Wilson, K. H., Blitchington, R.B. AND. Greene, R.C., 1990. Amplification of bacterial 16s ribosomal DNA with polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 28(9):1942-1946.
- Yu, Z. and Morrison, M., 2004. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. BioTechniques.36 (5):

CONCLUSIÓN GENERAL

Los follajes evaluados presentan gran variabilidad en la composición química, cantidad de TC y saponinas; sin embargo, todos produjeron menos cantidad de CH₄ comparado al testigo, siendo *Cnidocolus aconitifolius*, *Brosimum alicastrum* y *Moringa oleífera* las especies vegetales que presentan mayor cantidad de ácido propiónico y, a pesar de que tienen una elevada PG, la producción de CH₄ fue baja, lo que indica que, probablemente, los microorganismos ruminales juegan un papel muy importante en la producción de estos gases. Para conocer los cambios en la microbiota del rumen es fundamental realizar protocolos confiables. En este caso, se observó que con el método de extracción de Yu y Morrison (2004) se obtuvo DNA de calidad, motivo por el cual se recomienda utilizar al momento de hacer extracciones de DNA de microorganismo ruminales.

APÉNDICE 1

Material para elaboración de soluciones y buffers para biología molecular (capítulo II).

- Vasos de precipitado de 100 mL, 250 mL, 500 mL, 1000 mL
- Barras de agitación
- Probetas de 50 y 100 mL
- Tubos falcon de 50 mL
- Filtro milipore de 0.2 μm
- Jeringa de 20 mL
- Espátula

Materiales para extracción de DNA de líquido ruminal.

- Puntas de 10 μL , 200 μL y 1000 μL
- Tubos con tapón de rosca de 2 mL
- Tubos microcentrífugo con base cónica de 1.5 mL
- Tubos microcentrífugo de 2 mL
- Perlas de vidrio de 1 mm y 5 mm
- Pipetas de 2 μL , 20 μL , 200 μL y 1000 μL

Materiales para electroforesis

- Tubos para PCR 100 μL
- Peine de 15 pozos de 14 cm x 0.75 mm (1704445- BIO-RAD)

- Peine de 20 pozos de 14 cm x 0.75 mm (1704447- BIO-RAD)
- Placa para gel de electroforesis (BIO-RAD)

Materiales para PCR

Tubos para PCR 100 μ L

APÉNDICE 2

EQUIPOS:

Equipo usado en el capitulo I:

- Potenciómetro (Pelican 1400 case)
- Cromatógrafo (Clarus 500, PerkinElmer)
- Bomba de vacío (FE-1500)
- Estufa (Riossa)
- mufla (Themolyne)
- Centrifuga (EBA 21 de Hettich)
- Espectrofotómetro (PowerWave XS MARCA BioTeK) para determinar TC
- Espectrofotómetro (Varian-CARY1E) para determinar NH₄

Equipo usado en el capitulo II:

- Cámara de electroforesis (BIO-RAD)
- Balanza analítica (Ohaus)
- Parrilla con agitación magnética (Ohaus)
- Microcentrifuga (Heraeus Fresco 17 centrifuga. Thermo Scientific)
- Bead bug (BeadBug Homogenizer, BenchMark Scientific)
- Minicentrífuga (BIO-RAD)
- Vórtex (BR-2000. BIO-RAD)
- Termoblock (SELECT HEAT, dry block wáter. Select Bioproducts)
- Fuente de poder (Power Pac Basic BIO-RAD)

QX 200:

- T100 Thermal cycler (BIO-RAD).

APÉNDICE 3

Buffer para preparar el inóculo de la fermentación *in vitro* de los follajes tropicales.

1 litro de solución buffer :			
4.00 g	bicarbonato de amonio	NH_4HCO_3	Sigma, Aldrich, A6141
35.00 g	bicarbonato de sodio	NaHCO_3	Macron, 7412-12
1 litro solución macro mineral			
5.70g	fosfato de sodio dibásico	Na_2HPO_4	J.T. Baker, 3828-01
6.20 g	fosfato de potasio monobásico	KH_2PO_4	Merck, A262673
0.60 g	sulfato de magnesio heptahidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	J.T. Baker, D29126
250 mL de la solución reductora			
1.43 g	sulfato de sodio anhidro	Na_2SO_4	J.T.Baker, 3891-10
10 mL	hidróxido de sodio al 0.1 N	4g NaOH/L	MEYER, TL1208706
100 mL de solución micromineral			
13.2 g	cloruro de calcio dihidratado	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Sigma, C3306
10 g	cloruro de manganeso tetrahidratado	$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Sigma, M8054
1 g	cloruro de cobalto hexahidratado	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Sigma, C-3169
8 g	cloruro férrico	FeCl_3	Sigma, F7134

APÉNDICE 4

Reactivos que se usaron después de la fermentación ruminal (el capítulo I), para determinar los TC.

Reactivo	Marca comercial
solución de vainillina	SIGMA, v-2375
HCL	J.T Baker, 9535-05
Catequina	SIGMA, C-1251
Metanol	J.T Baker, 9070-30

APÉNDICE 5

Preparación de solución para la extracción de DNA, electroforesis y PCR.

Las soluciones stock se realizaron bajo las recomendaciones de Sambrook and Russell (2001). El uso de asteriscos es para indicar la forma de esterilizar la solución.

Reactivos	Conc.	
NaCl*	5 M	J.T Baker, 3624-01
NaOH**	5 M	J.T. Baker, 6697-01
Tris-HCl* Se ajustó el pH a 8 con NaOH (5M).	1 M	PROMEGA
Solución EDTA* se ajusta a pH 8 (aprox. 20 g de NaOH por litro de solución) ¹ .	0.5 M	J.T. Baker, 8993.01
Dodesil sulfato de sodio (SDS) ** se ajustó a pH 7.2 con HCl concentrado.	10%	PROMEGA
Acetato de sodio* se ajustó el pH a 5.3 con ácido acético glacial	3 M	J.T. Baker, 3470-01
Acetato de amonio*** Al momento de disolver, poner la mitad de agua, para no pasar el aforo.	10M	Fermont, 11052
Cloruro de litio***	2M	CTR scientific, 02076
*se esterilizo con calor húmedo a 15 PSI, 121°C durante 15 min ** No se esteriliza *** Se esterilizó a través de un filtro millipore de 0.22 µm ¹ La adición de NaOH es necesaria pues de lo contrario no entrará en solución.		

Para preparar un litro de Buffer TBE, 10 X:

Tris base	108 g
ácido bórico	55 g
EDTA, 0.5M	40 mL
ajusta pH a 8.3 con HCl 5M y se afora a 1 litro	

Solución de lisis para el protocolo de Yu y Morrison, 2004:

Solución	Concentración final
NaCl	500 Mm
Tris-HCl (pH 8)	50 Mm
EDTA	50 Mm
SDS	4%

Solución de lisis para el protocolo de Wilson *et al.*, 1990:

Solución	Concentración final
LiCl	100 Mm
Tris-HCl (pH 7, 8)	10 Mm
EDTA	10 Mm
SDS	1%