

COLEGIO DE POSTGRADUADOS



**INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN
CIENCIAS AGRÍCOLAS**

CAMPUS MONTECILLO

**POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA**

**EVALUACIÓN *IN VITRO* E *IN SITU* DE COMBINACIONES DE FORRAJE Y
CONCENTRADO EN DIETAS PARA VACAS HOLSTEIN**

TANIA IVÓN MINOR HINOJOSA

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2017

La presente tesis titulada: **Evaluación *in vitro* e *in situ* de combinaciones de forraje y concentrado en dietas para vacas Holstein** realizada por la alumna: **Tania Ivón Minor Hinojosa** 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

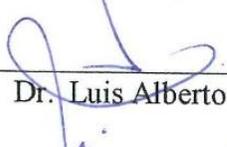
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Dr. Sergio Segundo González Muñoz

DIRECTOR DE TESIS



Dr. Luis Alberto Miranda Romero

ASESOR



Dra. Leonor Miranda Jiménez

Montecillo, Texcoco, Estado de México, 12 de Junio de 2017

EVALUACIÓN *IN VITRO* E *IN SITU* DE COMBINACIONES DE FORRAJE Y
CONCENTRADO EN DIETAS PARA VACAS HOLSTEIN

Minor Hinojosa Tania Ivón, MC

Colegio de postgraduados, 2017

RESUMEN

Tres dietas integrales isoenergéticas e isoprotéicas con tres proporciones de forraje y concentrado, se evaluaron con el objetivo de medir los cambios en la emisión de gases de fermentación mediante la producción de gas *in vitro* y asociarla con la degradación de la materia orgánica en dietas para vacas Holstein. En este estudio se usaron tres novillos Holstein (peso vivo 400 ± 20 kg) con cánula en el rumen. El diseño experimental fue un cuadrado latino 3×3 replicado en el tiempo; los tratamientos (T) fueron tres dietas (forraje:concentrado; F:C) isoprotéicas e isoenergéticas: T1, 40:60; T2 50:50; T3 60:40; 3 períodos de 15 d cada uno y 3 novillos para la prueba *in situ*. Para la prueba *in vitro* el diseño experimental fue el mismo y los tratamientos fueron nueve: tres dietas, tres rechazos y tres heces con tres inóculos de los tres novillos. Los datos se analizaron con un ANDEVA y las medias de tratamientos se compararon mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). Las variables en la prueba *in situ* fueron consumo de nutrientes, pH, N-NH₃, ácido acético, propiónico, butírico y láctico, ácidos grasos volátiles totales (AGVt) y degradación *in situ* de la materia orgánica (DISMO^{72h}) a 0, 3, 6, 9, 12, 24 y 72 h y sus variables de degradación. En la prueba *in vitro* se midió degradación verdadera de 72 h de fermentación (DVIVMS_{72h}), parámetros de la cinética de producción de gas, fracciones de los carbohidratos e índices de emisión potencial de gases de fermentación (IEPGF). La producción de biogás se midió a las 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 30, 36, 42, 48 y 72 h de incubación para obtener una cinética. En la prueba *in situ* el T1, comparado con T3, aumentó el consumo de MO y el de PC, pero redujo el consumo de EE y el FDA; además disminuyó el pH en líquido ruminal respecto a T2 y T3. En AGVt la fermentación fue 17.55 % mayor con T2 respecto a T3; el porcentaje molar para ácido acético fue 13.2% mayor para T3 respecto a T1 y 7 % con T2; para ácido propiónico fue 14 % menor en T3 comparado T1 y T2; y T1 redujo el ácido butírico en 14 %. No hubo cambios en la concentración de ácido láctico ni N-NH₃. La DISMO^{72h} fue mejor en 10.2 % con T1 respecto a T3. La degradación ruminal de la fracción C fue 32.4 % menor con T3 respecto a T1. La DVIVMS_{72h} fue 7.7 % mayor con T1 comparado con T2 y T3. Los tratamientos no cambiaron el volumen máximo (Vm), tasa (S) y tiempo de retardo (L) de gas, ni las fracciones de rápida, media y lenta de fermentación (FR, FM, FL) ni la fracción total

fermentable (FT). Para el IEPGF no hubo diferencias estadísticas entre tratamientos, pero las dietas podrían producir, en una vaca lechera, 1,880 a 2,127 L de gas y 41.8 a 47.2 L⁻¹ leche. De acuerdo con los resultados, la relación de forraje: concentrado 40:60 causó una mejora moderada de la degradación *in situ* y el consumo de materia orgánica.

Palabras clave: Dietas, relación forraje: concentrado, IEPGF, *in situ* e *in vitro*.

IN VITRO AND *IN SITU* EVALUATION OF COMBINATIONS OF FORAGE AND
CONCENTRATE, DIETS FOR HOLSTEIN COWS

Tania Ivón Minor Hinojosa, MC

Colegio de Postgraduados, 2017

ABSTRACT

Three isoenergetic and isoprotein diets with three proportions of forage and concentrate were evaluated in order to measure the changes in the emission of fermentation gases through the production of *in vitro* gas and to associate it with the degradation of the organic matter in diets for Holstein cows. In this study three Holstein steers (live weight 400 ± 20 kg) were used with cannula in the rumen. The experimental design was a 3 x 3 Latin square replicated over time; the treatments (T) were three isoproteic and isoenergetic diets (forage:concentrate F:C):T1, 40:60; T2, 50:50 T3 60:40; 3 periods of 15 d each and 3 steers for the *in situ* test. For the *in vitro* test, the experimental design was the same, and the treatments were nine: three diets, three rejections and three faeces with three inocula of three steers. The data were analyzed with an ANDEVA and the means of treatments were compared by the Tukey's test ($P \leq 0.05$). The variables in the *in situ* test were nutrient consumption, pH, $\text{NH}_3\text{-N}$, acetic, propionic, butyric and lactic acid, total volatile fatty acids (VFAt) and *in situ* degradation of organic matter ($\text{DISMO}^{72\text{h}}$) at 0, 3, 6, 9, 12, 24 and 72 h and their degradation variables. In *in vitro* test, were measure true degradation of 72 h of fermentation ($\text{DVIVMS}^{72\text{h}}$), parameters of gas production kinetics, carbohydrate fractions and indice of potential emission of fermentation gases (IEPGF). The biogas production readings were performed at 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 30, 36, 42, 48 and 72 h of incubation to obtain a kinetics.

In the *in situ* test T1, compared to T3, increased OM and CP intake, but reduced EE and FDA intake; In addition decreased ruminal liquid pH with respect to T2 and T3. In total VFA the fermentation was 17.55 % higher with T2 compared to T3; The molar percentage for acetic acid was 13.2 % higher for T3 respect to T1 and 7 % for T2; for propionic acid was 14 % lower in T3 compared to T1 and T2; and T1 reduced butyric acid in 14 %. There were no changes in lactic acid concentration or $\text{NH}_3\text{-N}$. The $\text{DISMO}^{72\text{h}}$ was better in 10.2 % with T1 respect to T3. Ruminal degradation of fraction C was 32.4 % lower with T3 than T1. The $\text{DVIVMS}^{72\text{h}}$ was 7.7 % high with T1 compared to T2 and T3. The treatments did not changed the maximum volume of gas (Vm), rate (S) and time of delay (L) of gas, neither the fast, medium and slow fermentation fractions (FF, FM, FS) nor the total fermentable fraction (FT). For IEPGF there were no statistical differences between treatments, but the diets could produce 1,880 to 2,127 L of gas per animal and 41.8 to 47.2 L per liter of milk,

in a dairy cow. According to results the ratio of forage:concentrate 40:60 caused a moderate improvement of *in situ* digestion and organic matter intake in Holstein steers.

Keywords: Diets forage relation: concentrate, IEPGF, *in situ* and *in vitro*.

AGRADECIMIENTOS

A mi padre Dios que puso todos los medios para permitir que perteneciera a la comunidad estudiantil del COLPOS y concluir con éxito la maestría

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico durante el período de maestría.

Al Colegio de Postgraduados, en especial al programa de Ganadería, por aceptarme y dejarme ser parte de su orgullosa comunidad.

Al Dr. Sergio Segundo González Muñoz, por darme la oportunidad de pertenecer al Colegio de Postgraduados, por sus enseñanzas y el gran apoyo que me brindó durante mi estancia.

Al Dr. Luis Alberto Miranda Romero por su disposición, consejos, comentarios, recomendaciones y apoyo en la realización de mi tesis.

A la Dra. Leonor Miranda Jiménez por sus comentarios y contribuciones a la realización de esta investigación.

A la Dra. Ma. Magdalena Crosby Galván por las facilidades otorgadas para el uso del Laboratorio de Nutrición de Animal.

Al Dr. Mario Cobos Peralta por haber abierto las puertas de su laboratorio y permitirme analizar mis muestras.

DEDICATORIA

La presente tesis está dedicada a mi padre Dios, a mi madre la Sra. Micaela Hinojosa López, a mi padre el Sr. Cuauhtémoc Minor Ríos, a mi esposo Arturo Alan Lozoya Rodríguez, a mis hermanas Andrea, Bianey y Jaquelin, a mi bebé hermoso Aslan Alday Lozoya Minor y a mi sobrina Ashley, que los AMO por ser el motor que me impulsa a seguir adelante siempre. Gracias por todo el apoyo recibido durante mi estancia en el Colegio de Postgraduados, que Dios los cuide mucho y los llene de bendiciones siempre.

CONTENIDO

	Página
Resumen.....	ii
Abstract.....	iv
Agradecimientos.....	vi
Dedicatoria.....	vii
Contenido.....	viii
Lista de cuadros.....	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. Problema de investigación.....	3
3. Hipótesis.....	3
4. Objetivo general.....	4
4.1 Objetivos particulares.....	4
5. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
5.1 Sistemas de producción de leche bovina en México.....	5
5.2 Ganado lechero.....	5
5.3 Forraje y concentrado.....	6
5.4 Fermentación ruminal de forrajes y concentrados.....	7
5.5 Aprovechamiento de dietas altas en concentrado.....	7
5.6 Impacto ambiental de los sistemas de producción de bovinos.....	8
5.7 Gases de efecto invernadero (GEI) provenientes de las actividades agropecuarias.....	8
5.8 Estrategias nutricionales para mitigar las emisiones de gases de fermentación.....	9
5.9 Técnicas utilizadas para el análisis de las dietas.....	9
5.9.1 <i>In vivo</i>	10
5.9.2 <i>In situ</i>	10
5.9.3 <i>In vitro</i>	10

6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
6.1 Localización.....	12
6.2 Preparación de las dietas experimentales.....	12
6.3 Adaptación de los novillos Holstein.....	14
6.4 Muestreo.....	14
6.5 Digestibilidad <i>in situ</i> y medición del consumo de alimento.....	15
6.6. Determinaciones químicas.....	15
6.6.1 Determinación de pH.....	15
6.6.2 Determinación de nitrógeno amoniacal.....	15
6.6.3 Determinación de la concentración de AGV.....	16
6.6.4 Determinación de ácido láctico.....	16
6.7 Sustratos utilizados.....	16
6.7.1 Muestras solidas.....	16
6.8 Degradación y fermentación <i>in vitro</i>	16
6.9 Análisis estadístico.....	18
6.9.1 Prueba <i>in situ</i>	18
6.9.2 Prueba <i>in vitro</i>	19
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	20
7.1 Prueba <i>in situ</i>	20
7.1.1 Consumo de nutrientes.....	20
7.1.2 Variables químico- fermentativas.....	21
7.1.2.1 Determinación de pH.....	21
7.1.2.2 Determinación de la concentración de AGV.....	22
7.1.2.3 Determinación de ácido láctico.....	24
7.1.2.4 Determinación de nitrógeno amoniacal.....	25
7.1.2.5 Degradación <i>in situ de la materia orgánica</i>	28
7.2 Prueba <i>in vitro</i>	29
7.2.1 Degradación verdadera <i>in vitro</i> de la materia seca.....	29
7.2.2 Fracciones de rápida, media y lenta fermentación, parámetros de cinética de producción de gas.....	30

7.2.3 índices de emisión potencial de gases de fermentación (IEPGF).....	31
8. CONCLUSIÓN.....	33
9. LITERATURA CITADA.....	33

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Composición porcentual de tres dietas isoprotéicas e isoenergéticas para vacas lecheras Holstein altas productoras, para modificar la emisión potencial de gases de fermentación ruminal.	13
Cuadro 2. Contenido nutrimental de las dietas experimentales para vacas lecheras Holstein altas productoras, para modificar la emisión potencial de gases de fermentación ruminal.	14
Cuadro 3. Consumo de nutrientes de tres dietas formuladas con tres proporciones de forraje:concentrado, por novillos Holstein.	20
Cuadro 4. Variables químico-fermentativas en líquido ruminal de novillos alimentados con dietas con tres proporciones de forraje:concentrado (3 h postprandial).	27
Cuadro 5. Degradación <i>in situ</i> de la materia orgánica y variables de degradación ruminal de tres dietas con tres proporciones de forraje y concentrado, en novillos Holstein con cánula en el rumen.	29
Cuadro 6. Degradación verdadera <i>in vitro</i> de la materia seca, fracciones de rápida, media y lenta fermentación, parámetros de cinética de producción de gas e índices de emisión potencial de gases de fermentación (IEPGF) de tres dietas, con tres proporciones de forraje y concentrado evaluadas con tres inóculos obtenidos de tres novillos Holstein con cánula en el rumen.	32

EVALUACIÓN *IN VITRO* E *IN SITU* DE COMBINACIONES DE FORRAJE Y CONCENTRADO EN DIETAS PARA VACAS HOLSTEIN

INTRODUCCIÓN

El calentamiento global se asocia al incremento en las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI) generados de manera natural o antropogénica. Las especies ganaderas, y el ganado bovino en particular, son las principales productoras de metano (CH₄) por fermentación entérica, uno de los GEI más importante; además, sintetizan y emiten bióxido de carbono (CO₂) y óxido nitroso (N₂O), éste último en menor cantidad. La emisión de CO₂ y CH₄ derivados de la fermentación en el rumen es una utilización deficiente de la energía contenida en los alimentos, además de contribuir al calentamiento y cambio climático global. Por tal motivo, la reducción de la metanogénesis ruminal es importante y está influenciada por el consumo de alimento, composición, digestibilidad de la dieta y procesamiento de los alimentos.

Las estrategias propuestas para mitigar las emisiones de los gases de fermentación ruminal son reducir el número de rumiantes, la manipulación genética de microorganismos, desarrollo de razas menos metanogénicas y la manipulación de alimentación. Esta última tiene un potencial mayor y es factible de realizar cuando los rumiantes están en confinamiento. La manipulación nutricional para suprimir la metanogénesis incluye el uso de forrajes de alta calidad (Benchaar *et al.*, 2001) y de aditivos como cloroformo, ácidos orgánicos, levaduras, enzimas, ionóforos, taninos, vacunas, defaunación, ácidos grasos insaturados, acetógenos, bacteriocinas, y extractos de vegetales ricos en aceites esenciales. (Jordán *et al.* 2006; Fonty *et al.*, 2007; Beauchemin *et al.*, 2008; McAllister y Newbold 2008; Foley *et al.*, 2009; Eckard *et al.*, 2010; Hook *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2010; Buddle *et al.*, 2011; Knight *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2011; Mohammed *et al.*, 2011; Muñoz *et al.*, 2012; Shinkai *et al.*, 2012; Capper y Bauman, 2013; Chuntrakort *et al.* 2014).

La adición de 4.75 % de aceite de coco a una dieta de engorda (50:50) para vaquillas productoras de carne, disminuyó la emisión de CH₄ en 22 % (Jordan *et al.*, 2006). El incremento en la proporción de concentrado (dietas altas en granos o con un contenido elevado de carbohidratos de rápida fermentación) es una de las principales medidas para reducir las emisiones de gases de fermentación (Yan *et al.*, 2009) y se considera como la de mayor potencial, simplicidad y factibilidad. Según Beauchemin (2010), el incremento de la proporción de concentrado en la dieta reduce el metano liberado por novillos en finalización. Doreau *et al.* (2011) mostraron que el aumento en la proporción de almidón en la dieta novillos en finalización reduce la producción de CH₄ por kilogramo de alimento. Además, la producción de metano es menor en toros en engorda alimentados con una

dieta alta en almidón más extruido de linaza, comparado con una dieta alta en fibra (Eugéne *et al.*, 2011). La inclusión de aceite de plantas tales como: almendra de coco, semilla de algodón y semilla de girasol en la dieta disminuyen la producción de metano (20.1 vs 50.1) en comparación con una dieta a base de paja de arroz en ganado de carne (Chuntrakort *et al.*, 2014). Hatew *et al.* (2015) Encontraron que al incrementar el nivel de almidón en la dieta a expensas de la fibra e incrementando la tasa de fermentación se reducen las emisiones de metano entérico en ganado lechero al comparar lenta contra rápida tasa de fermentación ruminal (47.4 vs 42.6 g/kg de MO fermentable en rumen estimada) o un nivel alto o bajo de almidón (46.9 vs 43.1 g/kg eRFOM). También Van Gastelen *et al.* (2015) observaron que el metano disminuye de forma lineal cuando la proporción de ensilaje de pasto fue remplazada con ensilaje de maíz en la dieta (67:33, 33:67 y 0:100) en 11, 8 y 7 % (25.0, 24.5 y 22.0 g kg⁻¹ CMS). La mayoría de estos estudios se realizaron con dietas para bovinos productores de carne, pero en la literatura revisada se encontraron pocos estudios acerca del efecto de dietas totalmente mezcladas y con diferentes combinaciones o proporciones de forraje y concentrado, en vacas lecheras. Para dichas investigaciones se puede usar la técnica de producción de gas *in vitro* para estimar la degradación de la materia seca y sus componentes, así como la producción de gases de fermentación ruminal (Karlssona *et al.*, 2009).

Problema de investigación

La transformación de una fracción de nutrientes de la dieta en gases de fermentación como el bióxido de carbono (CO₂) y metano (CH₄) representa el 15 % de la energía consumida con el alimento y que no es aprovechada por el rumiante para la producción de leche o carne (DeRamus *et al.*, 2003). Además, estos compuestos tienen una contribución significativa en las emisiones de gases efecto invernadero (Eckard *et al.*, 2010) ya que estos gases de fermentación son eliminados vía eructo y en el rumen hay una concentración promedio de 65 % de CO₂ y 35 % de CH₄, pero ésta varía según la dieta consumida por el rumiante (Beauchemin *et al.*, 2008).

HIPÓTESIS

La proporción de forraje y concentrado en dietas isoprotéicas e isoenergéticas para vacas lecheras Holstein altas productoras, afecta la degradación *in vitro* e *in situ* y modifica la emisión potencial de gases de fermentación ruminal.

OBJETIVOS

General

Evaluar *in vitro* e *in situ* los cambios en la degradación y emisión potencial de gases de fermentación ruminal de tres dietas diferentes en contenido de forraje y concentrado en dietas formuladas para vacas Holstein.

Particulares

- ✓ Medir la degradación de la materia orgánica *in situ* y degradación verdadera de la materia seca *in vitro* de las dietas.
- ✓ Evaluar *in situ* las variables químico-fermentativas (pH, N-NH₃, AL y AGV) del rumen.
- ✓ Estimar *in vitro* las fracciones de fermentación de los carbohidratos de las dietas, rechazos y heces.
- ✓ Obtener un índice de emisión potencial de gases de fermentación (IEPGF).

REVISIÓN DE LITERATURA

Sistemas de producción de leche bovina en México

La leche bovina se produce en todo el país y hay tres grandes sistemas de producción: intensivo ubicado en las grandes cuencas lecheras del altiplano y del norte, lechería familiar en los estados del centro y regiones montañosas, y de doble propósito localizado en las costas del Golfo y del Pacífico (Nuñez *et al.*, 2009).

Ganado lechero

En México la producción de leche bovina es tecnológica, agropecuaria y socioeconómicamente, muy heterogénea. En el período entre 2005 y 2014 la producción nacional de leche aumentó de manera paulatina desde 9, 868,301 hasta 11,129,621 litros al año, mientras que el inventario de ganado incrementó de 2,197,346 hasta 2,430,581 bovinos lecheros. En el 2014, la Región Lagunera conformada por Coahuila y Durango, tenía el 20.6 % del inventario nacional. En el período mencionado, 49.3 % de la producción nacional se concentró en Jalisco (18.74 %), la Región Lagunera (21.54 %) y Chihuahua (9.05 %) (SIAP-SAGARPA, SE., 2014).

La Región Lagunera es la cuenca lechera más importante del país y ocupa el primer lugar en la producción nacional. Esta región se localiza en la parte central del norte de México entre 102° 22' y 104° 47' O y 24° 22' y 26° 23' N; la altura media sobre el nivel mar es 1,139 m, la reproducción y el mejoramiento de la base genética de los bovinos se realizan mediante la inseminación artificial, la fuerte dependencia de granos y forrajes cultivados limita en cierto grado su expansión ya que se presenta una sobreexplotación de los mantos acuíferos, la producción de alfalfa, sorgo y maíz forrajero se destina a la alimentación del ganado bovino lechero. La mayoría del ganado en producción es de la raza Holstein, y en menor proporción Jersey y Suizo; la alimentación se basa en el uso de forrajes verdes y ensilados, complementados con alimentos balanceados y esquilmos agrícolas; la ordeña se realiza de manera mecanizada y hay establos con sistemas con alta tecnificación (Nuñez *et al.*, 2009). En un sistema tecnificado en el norte del país el rendimiento diario de leche es alrededor de 25 a 30 L vaca⁻¹ con una ordeña aproximada de 270 días, por lo cual la producción anual es de 8,000 L, la cual en su mayor parte está en función de la raza, nutrición y manejo del ganado (Villamar y Olivera, 2005).

La alimentación es uno de los elementos más importantes a considerar en los costos de producción en las explotaciones lecheras, ya que representa el 70 % de los gastos de producción y esto se eleva

por el uso de granos y subproductos de importación. Por lo tanto, la formulación de dietas balanceadas de costo óptimo con forrajes de alta calidad, subproductos, y el uso eficiente de granos permiten una rentabilidad adecuada en las explotaciones lecheras; además, se deben considerar para disminuir el riesgo de contaminación al medio ambiente (Nuñez *et al.*, 2009).

Forraje y concentrado

Forraje: es la parte vegetativa de las gramíneas o de las leguminosas, se caracteriza por contener una proporción alta de fibra (más de 30 % de FDN), y los componentes de mayor cantidad en estos alimentos son celulosa, hemicelulosa, lignina, sílice, nitrógeno ligado a lignina y pectinas (NRC, 2001), los cuales afectan la digestibilidad de acuerdo con la proporción en la que se encuentran. Así, forrajes con 20 a 35 % de FDN presentan mayor digestibilidad respecto a especies con contenidos superiores los cuales son de menor digestibilidad y, además, se relaciona con mayor producción de CO₂ y metano (Singh *et al.*, 2012); de acuerdo con Nuñez *et al.* (2009), el contenido de fibra de los forrajes es uno de los principales factores que limitan el consumo. Las leguminosas como la alfalfa son evaluadas para reducir la producción de metano ya que estos forrajes tienen metabolitos secundarios (taninos condensados o saponinas) que inhiben la producción de gases de fermentación como el metano (Williams *et al.*, 2011). Los forrajes pueden ser pastoreados o preservados como ensilaje o heno. La ingestión de nutrientes energéticos y la producción de leche pueden estar limitadas si hay demasiado forraje en la ración; sin embargo, los alimentos voluminosos son esenciales para estimular la rumia y mantener la salud de la vaca, pero cuanto más alto es el contenido de fibra se reduce la cantidad de energía en el forraje.

Concentrado: es un alimento bajo en fibra y alto en energía, puede ser alto o bajo en proteína, tiene alta palatabilidad, es consumido de forma rápida, tienen bajo volumen por unidad de peso (alta gravedad específica), no estimulan la rumia y son fermentados a mayor velocidad que los forrajes en el rumen. Los concentrados se clasifican en energéticos (granos de cereales y sus subproductos, melaza, grasas y aceites) y proteínicos (semillas y pastas de oleaginosa como la pasta de soya y la canola) se caracterizan por contener más de la mitad de la proteína total de la dieta (NRC, 2001). El incremento en el uso de concentrados en la dieta reduce la proporción de energía que se transforma en gases de fermentación por el cambio de sustratos fermentados de fibra a almidón y, como consecuencia, disminuye el pH.

Fermentación ruminal de forrajes y concentrados

Según Weimer (1998), la fermentación ruminal de los forrajes y de concentrados es llevada a cabo por las bacterias, protozoarios y hongos que cohabitan en el rumen y tienen como sustrato principal a los carbohidratos estructurales (celulosa y hemicelulosa), almidón y pectinas. Dichos polisacáridos primero son digeridos mediante enzimas a glucosa y azúcares de cinco carbonos por los microorganismos ruminales, y después fermentados a ácidos grasos volátiles: acético, propiónico y butírico, y bióxido de carbono e hidrogeno (ambos gases constituyen la materia prima para la producción de metano entérico). La energía biológica útil obtenida por los microorganismos durante la fermentación, es utilizada para la producción de proteína microbiana (Janssen y Kirst, 2008).

Los ácidos grasos volátiles son absorbidos por las paredes del rumen y representan la mayor fuente de energía para el rumiante, la cantidad y producción de estos depende de la ración fermentada, y ésta a su vez de la cantidad de la ración ingerida, tipo y concentración de carbohidratos en la dieta fermentada y la velocidad de degradación (Moss *et al.*, 2000; Calsamiglia y Ferret, 2002).

Aprovechamiento de dietas altas en concentrado

La dieta consumida por los rumiantes tiene un efecto directo en la producción de ácidos grasos volátiles, metanogénesis y salud del animal. Un cambio en la disponibilidad de sustratos en el rumen, induce una modificación en la composición en las comunidades microbianas, la absorción de nutrientes y su metabolismo (Meng-meng *et al.*, 2014). Los concentrados proporcionan mayor cantidad de energía en dietas para vacas lecheras y se caracterizan por contener compuestos de rápida fermentación como azúcares, almidones, ácidos orgánicos y fructanas (NRC, 2001). El incremento de concentrado en las dietas para rumiantes se reportó como estrategia para disminuir la producción entérica de gases de fermentación (Martin *et al.*, 2010). La formación de ácido propiónico en el rumen reduce la cantidad de hidrogeno requerido para producción metano (Knapp *et al.*, 2014). El aumento en la cantidad de concentrados en la dieta tiene la finalidad de reducir la proporción de polisacárido fibrosos e incrementar la de almidón, para estimular la fermentación propiónica, incrementar la tasa de pasaje, reducir la cantidad de hidrógeno disponible para la metanogénesis y en consecuencia disminuir la pérdida de nutrientes energéticos debido a la producción de metano (Beauchemin *et al.*, 2008b). Además es factible que afecte la concentración de protozoarios, hospederos de las arqueas metanogénicas (Kumar *et al.*, 2013).

Impacto ambiental de los sistemas de producción de bovinos

La ganadería en general y el ganado bovino en particular se considera la principal especie emisora de metano entérico (FAO, 2006), con aportaciones menores provenientes del sistema de almacenamiento y manejo de estiércol (Van Middelaar *et al.*, 2013). El CH₄ es producido de acuerdo con el tipo de carbohidratos en la dieta, consumo, tasa de pasaje, presencia de ionóforos, lípidos, niveles de concentrado etc. (Karakurt *et al.*, 2012). En vacas estabuladas la producción de CH₄ varía de 278 a 456 g d⁻¹ durante la lactancia (Garnsworthy *et al.*, 2012), en vaquillas en crecimiento la producción diaria de metano varía de 89 a 180 g d⁻¹ y de 165 a 295 g d⁻¹ en vacas adultas en pastoreo (DeRamus *et al.*, 2003).

Gases efecto invernadero (GEI) provenientes de las actividades agropecuarias

Los GEI presentes en la atmósfera mantienen la temperatura de la tierra en rangos adecuados para vida, y estos gases son emitidos como resultado de procesos naturales. En los últimos 30 años el nivel de GEI aumentó y como consecuencia también se incrementó la temperatura terrestre, lo cual ha traído repercusiones en los ecosistemas provocando cambios en los ciclos climáticos causantes de eventos extremos y de mayor ocurrencia y severidad (IPCC, 2007). Dentro de las principales causas del crecimiento de los niveles de GEI son las actividades del sector agropecuario el cual contribuye con el 13 % de las emisiones mundiales de GEI, y los principales son: CO₂, CH₄ y N₂O, los cuales tienen diferente potencial de calentamiento global debido a sus características físico-químicas y su tiempo de permanencia en la atmósfera. El gas de referencia para medir el impacto ambiental en el calentamiento global es el bióxido de carbono, y se expresa en unidades de CO₂ equivalente (CO₂ eq). El potencial de calentamiento para CO₂, CH₄ y N₂O es 1, 25 y 298 CO₂ eq (IPCC, 2007). La reducción de las emisiones por este sector causa controversia debido a su función importante como productor de alimentos para consumo humano, cuya demanda aumenta cada año, y en regiones de extrema pobreza es el único sustento de vida (FAO, 2011). No obstante, la razón para reducir las emisiones de GEI del sector agropecuario se relaciona con la importancia de sostener sistemas de producción sustentables a largo plazo y demanda alta del comercio internacional de productos alimenticios con baja huella de carbono y, así, contribuir con una producción sustentable de alimentos (IPCC, 2007).

Estrategias nutricionales para mitigar las emisiones de gases de fermentación.

Las estrategias consisten en cambiar el tipo de sustratos disponibles para los microorganismos del rumen, a través de dietas que permiten manipular las comunidades microbianas, estimulando la proliferación de unas y reduciendo otras, lo cual es una consecuencia de la diferencia en los productos finales del metabolismo (AGV, CH₄, y CO₂) (Bonilla y Lemus, 2012). Según Martin *et al.* (2010), el suplemento con lípidos, dentro de los niveles recomendables en cuanto a la digestión de la dieta, disminuye la producción de CH₄. Zhou *et al.* (2010) mostraron un cambio en la diversidad de la población metanogénica ruminal, al incrementar la proporción de concentrado en la dieta para novillos, pero no midieron la producción de CH₄. La adición de 1.5 mL cloroformo diluido en aceite de girasol, en dietas para ganado lechero a base de ensilado y concentrado (81:13 base seca), disminuye la producción de CH₄ de 184 vs 146 ± 23.9 g d⁻¹; sin embargo, el uso de cloroformo no es recomendable ya que produce efectos nocivos en el animal (Knight *et al.*, 2011). La inclusión de 30 g kg⁻¹ de MS de taninos de castañas, en dietas para ovejas reduce 30 % la producción de metano (Liu *et al.*, 2011). La mitigación de síntesis de gases indeseables de fermentación ruminal se fundamenta en la selección de ingredientes, incremento en la tasa de pasaje y uso de dietas de mayor calidad nutricional (Knapp *et al.*, 2014).

Técnicas utilizadas para el análisis de las dietas

La alimentación es fundamental en cualquier sistema de producción, ya que llega a representar hasta el 70 % de los gastos de producción, por lo cual es necesario analizar ingredientes, alimentos y dietas para optimizar la respuesta productiva de los animales. La medición del valor nutricional puede realizarse por métodos *in vivo*, *in situ* e *in vitro*, para caracterizar la degradación de recursos forrajeros (Ceballos *et al.*, 2008).

La técnica de producción de gas *in vitro* (Menke y Steingass, 1988) se utiliza porque ofrece una alternativa práctica y económica con la que se estima la fermentación, se relaciona con la digestibilidad de los alimentos y se incluye como una variable para obtener el valor nutritivo de los alimentos en sustitución de la técnica tradicional de digestibilidad de Tilley y Terry (1963).

Técnica *in vivo*

En estudios *in vivo* los alimentos solo pueden ser evaluados en dietas totalmente mezcladas, requiere elevados recursos económicos técnicos, animales y humanos por lo que son difíciles de estandarizar (Apráez *et al.*, 2014).

Técnica *in situ*

La técnica de bolsas de nylon proporciona estimaciones de la tasa y la dinámica de la degradación de los componentes del alimento como: degradación de la materia orgánica, compuestos nitrogenados y fibras, mediante el uso de bolsas de nylon o de poliseda con poro de 40 micrones de diámetro, y 10 cm de ancho por 20 cm de largo, las cuales son primero numeradas y luego selladas por un termosellador, o en su defecto con silicón, y cosidas. Las muestras de alimento albergado en las bolsas de nylon son introducidas en el rumen e incubadas durante lapsos diversos de tiempo. Esta técnica es laboriosa, costosa e invasiva, un número bajo de muestras puede ser evaluada al mismo tiempo y al menos requiere de tres animales con cánula para corregir la variación debido al animal (Posada y Noguera, 2005). Además puede afectar el consumo de alimento, no permite evaluar alimentos con altos contenidos de material soluble, con tamaño minúsculo de partícula o con alto contenido de almidones y lípidos, porque este material puede escapar de las bolsas sin ser degradado, y la adherencia microbiana en el residuo provoca que las digestibilidades a diferentes horas puedan ser subestimadas (Ceballos *et al*, 2008).

Técnica *in vitro*

Los métodos *in vitro*, a diferencia de las técnicas *in vivo* e *in situ*, son menos costosos, requieren menos tiempo y permiten mantener controladas las condiciones experimentales, por lo cual las condiciones son más precisas. Dentro de las técnicas de *in vitro*, la de uso más frecuente es la descrita por Tilley y Terry (1963), la cual fue modificada por Goering y Van Soest (1970) para estimar la digestibilidad verdadera de la materia seca (DVIVMS, En este tipo de prácticas también se pueden utilizar enzimas en lugar de microorganismos, cuya principal ventaja es no requerir animales donadores de inóculo, éstas son usadas como procedimientos para estimar la digestibilidad final del sustrato pero no provee información sobre la cinética de digestión (Posada y Noguera, 2005)

La técnica del sistema Daisy^{II} (ANKOM Corp., Fairport, NY, EEUU) se utiliza como método alternativo para calcular la degradación del alimento en condiciones de laboratorio y permite simplificar el proceso de medición de la degradación del alimento. Este sistema consiste en una cámara aislada con temperatura controlada 39 °C y cuatro jarras independientes que giran durante el proceso, cada jarra permite la incubación de 25 muestras que están en contacto con una solución

amortiguadora y líquido ruminal. Las muestras son incubadas en bolsas de poliéster/polietileno y se considera que el material que desaparece de la bolsa correspondería al digerido en el rumen. Julier *et al.* (1999) y Vogel *et al.* (1999) reportan que las predicciones de digestibilidad aparente y verdadera realizadas por este sistema son muy precisas, esta técnica se utiliza también para determinar la tasa de degradación de la materia seca y otras fracciones de los alimentos, retirando las bolsas de las jarras a diferentes tiempos de incubación (Mould y Nordheim, 1998).

En las técnicas *in vitro* e *in situ* mencionadas, las mediciones son gravimétricas y la desaparición estimada de los alimentos o sustratos no están de forma precisa relacionados con la fermentación microbiana. La técnica de producción de gas *in vitro* (TPG), por el contrario, determina la extensión y la cinética de degradación del alimento al medir el volumen de gas producido durante el proceso fermentativo (Posada y Noguera, 2005). Los alcances de la TPG son: predicción de la digestibilidad relacionada con la desaparición de la FDN (Nsahlai *et al.*, 1995), predicción de la energía metabolizable, determinación de la calidad de los alimentos (Williams, 2000), y sus constituyentes (Nsahlai *et al.*, 1995), predicción de consumo (Liu *et al.*, 2002) y cinética de fermentación (Gatechew *et al.*, 1998). Esta técnica emplea sustratos molidos, medio anaeróbico, temperatura de 39 °C e inóculo ruminal; los sustratos se muelen a través de una malla de 1 mm, la cantidad de material requerido para cinética de fermentación varía 0.1 a 1 g, los medios en uso tienen en común amortiguador de bicarbonato y fosfato, un agente reductor, una fuente de nitrógeno, diferentes minerales, y resazurina como indicador de potencial redox, también se usa CO₂ durante la preparación para asegurar un bajo potencial redox al momento de la inoculación (Williams, 2000). La proporción de inóculo a medio se ha encontrado en 20 a 25 % de fluido ruminal (Schofield, 2000). Con esta técnica se puede medir el volumen de gas a presión atmosférica constante, la presión de gas se convierte a volumen fijo o se hace una combinación de ambos procedimientos, para lo cual hay metodologías manuales, semiautomáticas y automáticas (Gatechew *et al.*, 1998). Los perfiles de producción de gas obtenidos pueden ajustarse a diferentes ecuaciones para resumir la información cinética, permitiendo la comparación de los sustratos, la evaluación de diferentes ambientes de fermentación y la obtención de las tasas de fermentación de los constituyentes solubles y estructurales. Las mediciones son realizadas a determinados intervalos de tiempo, se obtiene la producción de materia seca u orgánica, y algunos factores que afectan la producción de gas son: el tipo de sustrato, el tipo de inóculo, la especie animal donadora de inóculo, su alimentación, el pH del medio y el amortiguador empleado (Williams, 2000).

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización

Parte del estudio se llevó a cabo en la Unidad Metabólica de Rumiantes del Posgrado IREGEP-Ganadería y en el laboratorio de Nutrición de Rumiantes del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, ubicado en el km 36.5 de la carretera México-Texcoco, Estado de México.

Los estudios de la técnica *in vitro* de producción de gas, fermentación ruminal y desaparición de la materia seca se realizaron en el laboratorio de Microbiología Pecuaria del Departamento de Zootecnia en la Universidad Autónoma Chapingo, Km. 38.5, Carretera México-Texcoco, Chapingo 56227, Texcoco de Mora, México.

Preparación de las dietas experimentales: se formularon tres dietas isoprotéicas e isoenergéticas a base de forraje:concentrado (F:C 40:60, 50:50 y 60:40 (Cuadro 1), con base a los ingredientes de una dieta usada para vacas Holstein altas productoras en la zona de La Laguna. Las dietas fueron balanceadas utilizando la opción SOLVER del programa de Excel.

Cuadro 1. Composición porcentual de tres dietas isoprotéicas e isoenergéticas para vacas lecheras Holstein altas productoras.

Ingredientes	Dietas y % de inclusión		
	1	2	3
Dieta			
% F:C [†]	40:60	50:50	60:40
Maíz rolado	35	23	17
Pasta de soya	8	10	11
Pasta de canola	3	4.5	1
Salvado de trigo	7	3	1
Melaza	6	6	5
Grasa de sobrepaso	0	2.5	4
Vitasal Lechero*	1	1	1
Heno de avena	5	20	21
Heno de alfalfa	35	30	39
Total	100	100	100

[†]F:C = forraje:concentrado. *Vitasal Lechero mezcla mineral con vitaminas: calcio 20.00 %, cloro 10.50 %, fosforo 8.00 %, magnesio 4.00 %, potasio 0.50 %, azufre 0.50 %, sodio 7.00 %, cinc 5,000 mg, cobalto 40 mg, cobre 800 mg, hierro 4000 mg, manganeso 3,000 mg, selenio 30 mg, yodo 300 mg, vitamina A 300,000 UI, vitamina D 200,000 UI, vitamina E 500 UI, antioxidante 0.05 %.

Cuadro 2. Contenido nutrimental de las dietas experimentales para vacas lecheras Holstein altas productoras.

Dieta	1	2	3
% F:C [†]	40:60	50:50	60:40
Compuesto			
% MS	95.10	95.56	95.53
% MO	92.48	91.09	90.73
% PC	14.94	14.62	14.10
% EE	2.45	3.31	3.71
% FDN	33.73	39.42	46.86
% FDA	14.53	19.58	20.83
% Cenizas	7.52	8.91	9.27

[†]F:C= forraje:Concentrado

Adaptación de los novillos Holstein

Para la prueba *in situ* y para la fuente de inóculo para la prueba *in vitro*, se utilizaron tres novillos Holstein con cánula (Bar Diamond, Inc.) en rumen, y con un peso vivo de 400 ± 20 kg. Los novillos fueron desparasitados con ivermectina (Ivomec-F®, Merial) (1 mL por cada 50 kg), y se les aplicó una bacterina (BOBACT 8® Intervet/Schering Plougt Animal Health) (5 mL).

La fistulación se realizó bajo las normas de cuidado y bienestar animal estipulados por el consejo de cuidado animal del Colegio de Postgraduados. Después los novillos fueron alojados en corrales (5 m de largo por 2 m de ancho), con piletas con agua a libre acceso, y alimentados a las 9:00 y 18:00 h con las dietas utilizadas como tratamientos (Cuadro 1). Los novillos tuvieron 10 d para adaptación a la dieta correspondiente de acuerdo con el diseño experimental, durante el cual se ofreció incorporando un 20 % diario de la dieta durante 5 d, hasta que estuviera consumiendo el 100 % de la dieta asignada; los 5 d restantes el consumo de la dieta fue 100 %.

Muestreo

Al término de la adaptación a la dieta se tomó una muestra homogénea aproximada de $100 \text{ g novillo}^{-1} \text{ d}^{-1}$, de alimento ofrecido, alimento residual directo del comedero y heces del recto de los novillos. Con las muestras de tres días seguidos se obtuvo una muestra compuesta de cada sustrato (alimento, rechazo y heces). También durante este mismo lapso de tres días, se tomaron muestras de contenido ruminal (100 mL) a las 3, 6 y 9 h postprandial para medir el pH y una submuestra de

4 mL de contenido ruminal fue fijada con ácido metafosfórico (25 % p/v), almacenada en refrigeración a 4 °C, centrifugada a 13,000 g por 15 min y usada para el análisis químico.

Digestibilidad *in situ* y medición del consumo de alimento.

Durante este mismo lapso de tres días, se realizó la prueba de degradabilidad *in situ* y la medición del consumo de alimento. Este último se obtuvo registrando el peso del alimento ofrecido y del alimento rechazado, por diferencia se obtuvo el consumo de la MS y de nutrientes. Para la digestibilidad *in situ* las dietas fueron secadas a 65 °C por 48 h, molidas en un molino Wiley con criba de 2 mm. Cinco gramos de dieta secadas y pesadas, fueron colocados en bolsas de poliseda de 10 x 20 cm y tamaño de poro de 40 µm de diámetro. Las bolsas bien cerradas, etiquetadas y atadas a una cadena de hierro, fueron incubadas por 0, 3, 6, 12, 24, 48 y 72 h, en el fluido ruminal de los novillos Holstein adaptados a la dieta correspondiente. Se usaron dos bolsas por dieta y por tiempo. Al término de la incubación, las bolsas fueron lavadas en agua potable hasta que el agua del lavado fuera clara y se escurrieron. Después las bolsas se colocaron en bandejas de aluminio, se secaron en estufa de ventilación forzada a 65 °C por 48 h, se pesaron y se almacenaron para su posterior análisis químico. La diferencia del peso inicial y el peso residual de la muestra se usó para determinar la desaparición *in situ* de la MS y la MO con las fórmulas siguientes:

$$\% \text{ DISMS}_{72\text{h}} = 100 - ((\text{g materia seca residual/g materia seca original}) * 100)$$

$$\% \text{ DISMO}_{72\text{h}} = ((\text{MO inicial} - \text{MO final}) / \text{MO inicial}) * 100)$$

Los parámetros de degradación ruminal (a, b, c y k) fueron estimados por regresión no lineal de acuerdo con el modelo propuesto por Ørskov y McDonald (1979) $Y = a + b * (1 - \exp(-k * t))$; donde Y corresponde a la fracción degradada para el tiempo (h) de incubación “t”; a (%) es la fracción soluble de la muestra; b (%) la potencial fracción degradable; k (% h⁻¹) la tasa constante de degradación de la fracción b; t (h) es el tiempo de incubación y; c (%) es la fracción indigestible.

Determinaciones químicas

En muestras de líquido ruminal fresco el pH fue medido con un potenciómetro (Modelo 10, FISHER SCIENTIFIC). En la submuestra de contenido ruminal fijado con ácido metafosfórico se cuantificó el contenido NH₄ mediante la técnica colorimétrica de McCullough (1967); además, ácidos grasos volátiles (AGV), nitrógeno amoniacal (N-NH₃) y ácido láctico fueron medidos. El contenido de AGV (acético, propiónico y butírico) se determinó en un cromatógrafo de gases (CLARUS 500

PERKIN ELMER, de columna capilar de 6 ¼ y 1/8 PE OD SS parapak 80/100 250°C maot, serial #9675 y columna empacada; algunas constantes del equipo son: aire 40, hidrogeno 60, nitrógeno 60, temperatura de la columna o inyector 250 °C, temperatura del horno TCD 115 °C, temperatura del FID 250°C, presión del gas acarreador 8.0 psi, Spit 18.0. Erwin *et al.*, 1961).

Para la cuantificación del ácido láctico se hizo una adaptación de la técnica colorimétrica desarrollada por Barker y Summerson (1941) y modificada por Taylor (1996) para muestras de ensilado. Del líquido ruminal se transfirieron 500 µL a tubos de ensayo y se adicionaron 3.0 mL de H₂SO₄ concentrado, se mezcló en un agitador vortex y los tubos se colocaron en un baño a ebullición por 10 min, se dejaron enfriar 10 min a temperatura ambiente, se adicionaron 50 µL de CuSO₄.5H₂O (4 % p/v), 100 µL de p-hidroxidifenil (1.5 % p/v) y mezcló en vortex. Luego se leyó la absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro (UV/VIS; VARIAN, modelo CARY I-E). La concentración de ácido láctico se calculó con la ecuación lineal $AL (\mu\text{g mL}^{-1}) = [7.5245*(Abs)]*2$, y los datos fueron transformados a milimoles.

Sustratos utilizados

En muestras sólidas: en el alimento, rechazo y heces se determinó el contenido de materia seca (MS), materia orgánica (MO) y proteína cruda (PC) por los métodos especificados por la AOAC (2007). También se les midió el contenido de fibra detergente neutra (FDN) y fibra detergente ácida (FDA) por la técnica de la bolsa de filtro Ankom²⁰⁰. En el residuo de muestra en la prueba de digestibilidad *in situ*, se determinó el contenido de cenizas a 550 °C por 3 h y por diferencia con la MS se obtuvo la proporción de MO (AOAC, 2007).

Degradación y fermentación *in vitro*

La fermentación *in vitro* se determinó de forma indirecta por la técnica de producción de gas (Menke y Steingas, 1988) descrita por Miranda *et al.* (2016) y Soto *et al.* (2015). El inóculo ruminal fue obtenido de los novillos Holstein cánula en rumen y adaptados a la dieta correspondiente, según el tratamiento. Cada inóculo por separado fue diluido (1:10) con solución mineral reducida. Se colocaron 90 mL del inóculo diluido y un flujo continuo de CO₂, en frascos de 125 mL de capacidad, los cuales contenían 500 mg de sustrato (dieta, rechazo, heces) a fermentar, se sellaron y se incubaron en baño maría a 39 °C. La producción de gas se midió a las 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 30, 36, 42, 48, 60 y 72 h de incubación.

El volumen acumulado para cada tiempo se usó para estimar el volumen máximo (V_m ; mL g^{-1}), la tasa (S , h^{-1}) y la fase Lag o de retardo (L , h) del modelo logístico $V_a = V_m / (1 + \exp^{-(2 - 4 * S * (T - L))})$ (Schofield y Pell, 1995), para lo cual se utilizó SAS (SAS, 2001, ver 9.0) y el procedimiento NLIN.

Los datos también se usaron para obtener los volúmenes fraccionales $V_{f_{0-8}}$, $V_{f_{8-24}}$ y $V_{f_{24-72}}$, correspondientes a los períodos de 0 a 8, 8 a 24 y 24 a 72 h de incubación. Los volúmenes fraccionales fueron transformados a fracciones fermentables (g kg^{-1}) de rápida (FR), media (FM) y lenta (FL) fermentación, con las ecuaciones: $V_{f_{0-8}} = 0.4266 * (\text{FR})$, $V_{f_{8-24}} = 0.06152 * (\text{FM})$, y $V_{f_{24-72}} = 0.3453 * (\text{FL})$ (Miranda *et al.*, 2015).

Para la degradación verdadera *in vitro*, al término de la incubación (72 h), se adicionó detergente neutro a los frascos de fermentación y se pusieron en autoclave a 15 libras por 10 min. Después se filtraron en papel Whatman No. 541, se secaron a 65°C por 24 h en una estufa de ventilación forzada y, se pesaron para determinar fibra residual insoluble en detergente neutro (FDNr) y con ella calcular la digestibilidad verdadera ($\text{DV}_{72\text{h}}$) mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ DV}_{72\text{h}} = \left[\frac{\text{MS inicial} - \text{FDN residual}}{\text{MS inicial}} \right] * 100$$

El índice de emisión potencial de gases de fermentación (IEPGF) se estimó considerando el volumen máximo de gas producido por gramo de dieta y por gramo de heces, determinada por la técnica de producción de gas, la cantidad de alimento consumido y heces desechadas. Estos datos se utilizaron en la siguiente fórmula:

$$\text{IEPGF} (\text{dL animal}^{-1} \text{ d}^{-1}) = \{ [V_{m_a} (\text{mL g}^{-1}) * \text{AC} (\text{kg MS})] - [V_{m_h} (\text{mL g}^{-1}) * \text{HD} (\text{kg MS})] \} / 10,000$$

Para el IEPGF expresada como $\text{dL vaca}^{-1} \text{ L}^{-1}$ de leche, se dividió entre la cantidad de leche producida por día, por vacas altas productoras de La Laguna

Análisis estadístico

El diseño experimental fue un cuadrado latino 3 x 3 replicado en el tiempo, con 3 tratamientos (dietas), 3 períodos de 15 d cada uno y 3 novillos. Los períodos se dividieron en dos fases o lapsos, uno de adaptación al cambio de dieta de 10 d y el segundo de 5 d para muestreo de líquido ruminal,

dieta, rechazo y heces, así como para realizar las pruebas de digestibilidad *in situ e in vitro*. Los datos de consumo de nutrientes (CMS, CMO, CPC, CEE, CFDN y CFDA), variables fisicoquímicas de líquido ruminal (pH, NH₃, AL y AGV), degradación *in situ* de la materia MO y variables de la cinética de degradación *in situ* (A, B, C y Kd) fueron analizados por el procedimiento GLM y la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey ($P \leq 0.05$) (Steel y Torrie, 1992; SAS ver. 9.0, 2001).

El modelo estadístico fue:

$$Y_{ijkl} = \mu + S_i + H_j + C_{k:i} + T_{(l)} + \epsilon_{ijkl}$$

Donde:

Y_{ijkl} = variables de respuesta al tratamiento l del período j en el novillo k (dentro del cuadrado i).

μ = media general de los tratamientos

S_i = efecto del i-ésimo cuadrado latino

H_j = efecto de la j-ésima hilera (período)

C_k = efecto de la k-ésima columna (novillo)

T_l = efecto del l-ésimo tratamiento (dietas)

$\epsilon_{ijk(l)}$ = error experimental aleatorio

i = 1 y 2

j = 1, 2 y 3

k = 1, 2 y 3

l = 1, 2 y 3

Para la prueba *in vitro* el diseño experimental fue un cuadrado latino 3 x 3 replicado, los tratamientos fueron nueve (tres dietas, tres rechazos y tres heces) y tres inóculos correspondientes a los tres novillos. Los datos de degradación verdadera *in vitro* de la materia seca (DVIVMS_{72h}), parámetros de cinética de producción de gas (Vmax, mL g⁻¹; S, h⁻¹ y L h), fracciones de carbohidratos (FR, FM y FL), el IEPGF total (dL animal⁻¹ d⁻¹) y el IEPGF total (dL animal⁻¹ L⁻¹ de leche), fueron analizados estadísticamente usando el procedimiento GLM y la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey ($P \leq 0.05$) (Steel y Torrie, 1992; SAS ver. 9.0; 2001).

El modelo estadístico fue:

$$Y_{ijkl} = \mu + S_i + H_j + C_{k:i} + T_{(l)} + \epsilon_{ijkl}$$

Donde:

Y_{ijkl} = variables de respuesta al tratamiento l del período j en el novillo k (dentro del cuadrado i)

μ = media general de los tratamientos

S_i = efecto del i-ésimo cuadrado latino

H_j = efecto de la j-ésima hilera (período)

C_k = efecto de la k-ésima columna (inóculo)

T_l = efecto del l-ésimo tratamiento (dietas, rechazo y heces)

$\varepsilon_{ij(k)}$ = error experimental aleatorio

i = 1 y 2

j = 1, 2 y 3

k = 1, 2 y 3

l = 1, 2, 3, ..., 9 (D1, D2, D3, R1, R2, R3, H1, H2, H3)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Prueba *in situ*

Consumo de nutrientes: El consumo de nutrientes (Cuadro 3) mostró que la variación en la relación forraje: concentrado en las dietas no modificó ($P > 0.05$) el consumo de materia seca (CMS) y de fibra detergente neutro (CFDN). El consumo de materia orgánica (CMO), PC (CPC), EE (CEE) y FDA (CFDA) fueron afectados ($P < 0.05$) por la proporción forraje:concentrado de la dieta. El consumo de materia orgánica y de proteína disminuyó conforme la proporción de forraje en la dieta fue mayor. Las dieta con proporción F.C de 40:60 indujo 5.48 % más consumo de materia orgánica en comparación con la dieta de relación F.C 60:40. El consumo de proteína cruda con la dieta de relación F:C 40:60 fue 9.66 % mayor, en comparación con las dietas con relación 60:40. Por el contrario, los consumos de EE y FDA fueron mayores ($P < 0.05$) conforme la relación de forraje en la dieta aumentó 23.6 y 25.83% para CEE y CFDA, con respecto a la dieta con 40:60 F:C. La disminución ($P \leq 0.06$) en el consumo de la MO y PC, conforme se aumentó la relación de F:C en la dieta, es causado por la mayor cantidad de fibra y su grado de lignificación en los forrajes, ya que es uno de los principales factores de la ración que limitan el consumo (Nuñez *et al.*, 2009). No obstante, el forraje de baja calidad es la causa más frecuente de la reducción de la ingesta (Kellems y Church, 2002).

CUADRO 3. Consumo de nutrientes de tres dietas formuladas con tres proporciones de forraje concentrado, por novillos Holstein.

Relación F:C	CMS, kg	CMO, kg	CPC, kg	CEE, kg	CFDN, kg	CFDA, kg
40:60	13.19	12.21 ^a	2.07 ^a	0.34 ^b	4.68	2.01 ^b
50:50	13.01	11.86 ^{ab}	1.99 ^{ab}	0.45 ^a	5.38	2.67 ^a
60:40	12.70	11.54 ^b	1.87 ^b	0.44 ^a	6.25	2.76 ^a
EEM	0.15	0.15	0.05	0.02	0.65	0.08
<i>P</i>	0.1086	0.0298	0.0568	0.0015	0.2770	0.0001

^{a, b, ab} Medias con diferente literal en una columna son diferentes estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$);

F:C: proporción forraje concentrado, CMS: consumo de materia seca, CMO: consumo de materia orgánica, CPC: consumo de proteína cruda, CEE: consumo de extracto etéreo, CFDN: consumo de fibra detergente neutro, CFDA: consumo de fibra detergente ácido, CCEN: consumo de cenizas, EEM: error estándar de la media.

Las dietas con mayor cantidad de forraje (50:50 y 60:40) tuvieron una mayor cantidad de avena, la cual es de menor calidad que la alfalfa, aunque la avena contiene menos lignina que la alfalfa, la pared celular de la avena tiene una tasa de digestión menor debido a la forma en que la lignina se relaciona con la celulosa y la hemicelulosa, por lo que la menor digestión provoca un mayor llenado ruminal e induce un menor consumo de alimento (Palladino *et al.*, 2006). Puesto que la dietas con 50:50 y 60:40 de relación F:C tuvieron mayor cantidad de grasa, FDN y FDA (Cuadro 1), se pudieron presentar efectos confundidos y el consumo de estos mismos nutrientes (EE y FDA) fue mayor ($P \leq 0.05$), con excepción del CFDN en el cual se presentó un error estándar mayor en comparación con el CEE y CFDA.

Agle *et al.* (2010) y Aguerre *et al.* (2011) no encontraron efectos significativos en el consumo de materia seca y materia orgánica al evaluar el efecto de la relación de forraje:concentrado de 47:53, 54:46, 61:39 y 68:32 (Aguerre *et al.*, 2011) y de 28:72 y 48:52 % (Agle *et al.*, 2010). En contraste, en la presente investigación el consumo de MO sí fue afectado por el incremento en el nivel de concentrado (Cuadro 3). Respecto al consumo de FDN, Aguerre *et al.* (2011) encontraron que fue mayor (6.5 kg d^{-1}) cuando la dieta contenía más forraje (F:C = 68:32) con respecto a la dieta con mayor cantidad de concentrado (F:C = 47:53; 5.4 kg d^{-1}), y Agle *et al.* (2010) hallaron también que el consumo de FDN fue 19.5 % mayor en los rumiantes alimentados con la dieta baja en concentrado, respecto a la dieta alta en concentrado ($8.2 \text{ vs } 6.6 \text{ kg d}^{-1}$). En cambio, en el presente estudio no se encontró diferencia ($P = 0.27$) en el consumo de FDN a pesar de un ligero aumento a medida que la relación de forraje es mayor. El no haber obtenido diferencia se atribuye a que su error estándar fue el más alto entre las variables de consumo.

Variables químico- fermentativas de líquido ruminal

Determinación de pH

En el Cuadro 4 se muestran los valores para las variables químico-fermentativas del líquido ruminal en los novillos. El pH ruminal medido en los novillos a las 3 h se mantuvo dentro de los valores reportados como óptimo en vacas lecheras (5.7 a 6.4; Colocolino, 2015) y dentro del límite fisiológico (5.5 a 7.0; Krause y Oetzel, 2006). El pH ruminal varía de 5.5 a 6.0 en rumiantes sin desordenes digestivos y consumiendo dietas altas en grano y, de 6.0 a 6.9 cuando consumen dietas ricas en fibra (Relling y Mattioli, 2003), mientras que en rumiantes con acidosis ruminal subaguda el pH puede variar de 5.0 a 5.5 entre las 2 y 5 h después de la alimentación (Owens *et al.*, 1998; Krause y Oetzel, 2006). En la presente investigación, los novillos que consumieron la dieta con

mayor contenido de concentrado (F:C = 40:60) tuvieron el pH ruminal menor ($P \leq 0.001$), respecto al pH en novillos alimentados con dietas 50:50 y 60:40 de F:C. Lo anterior se atribuye al mayor contenido de forraje en los tratamientos con la relación F:C 50:50 y 60:40, ya que el incremento de forraje estimula la secreción de saliva cuyos componentes químicos neutralizan los ácidos (Fischer *et al.*, 1994). Además, el aumento de forraje en las dietas incrementa la cantidad de carbohidratos estructurales que se fermentan a una tasa baja lo cual, aunado a la tasa de absorción a través de la pared ruminal y la tasa de pasaje, evita que los AGV producidos se acumulen en el rumen a niveles que causen un desorden fermentativo ruminal (Krause y Oetzel, 2006). En cambio, el consumo de granos o carbohidratos de rápida fermentación genera una concentración importante de estos ácidos, lo que resulta en un aumento de la tasa de fermentación y baja repentina de pH ocasionando que se acumulen en el rumen (Bach, 2002). Los valores obtenidos para esta variable concuerdan con los reportados por González *et al.* (2010), quienes encontraron que al aumentar el nivel de concentrado en la dietas con relación F:C de 70:30, 60:40, 50:50 y 40:60, el pH ruminal varió 6.94, 6.91, 6.84 y 6.72, para cada una de ellas ($P > 0.01$). Además, Agle *et al.* (2010) observaron que el pH ruminal disminuye de 6.14 y 6.04 a causa del consumo de dieta con una relación F:C de 52:48 y 28:72 ($P=0.048$), mientras que Chen *et al.* (2015) midieron el pH ruminal en yaks machos alimentados con dietas 70:30, 60:40, 50:50 y 40:60 F:C y encontraron el mismo efecto ($P \leq 0.001$) en la disminución del pH de 6.4 para las dietas altas en forraje a 6.2 para las dietas altas en concentrado.

Determinación de la concentración de AGV

La concentración de ácidos grasos volátiles totales en el líquido ruminal de vacas lecheras varía entre 80 a 120 mmol L⁻¹, con una proporción molar de acético: propiónico: butírico de 70:20:10 en una dieta a base de heno, y de 50:35:15 en dietas concentradas (Rémond *et al.*, 1996), y los datos del presente estudio concuerdan con esos resultados. En cuanto a la concentración molar de AGVt la comparación entre las tres dietas muestra un comportamiento raro de AGVt porque la dieta con la relación F:C 50:50 tuvo una mayor fermentación, 17.55 %, en comparación con la dieta 60:40; Serment *et al.* (2011) y Chen *et al.* (2015) no encontraron efecto en la concentración de AGVt ruminales al usar dietas con 35 % o 70 % de concentrado o con una relación F:C de 70:30, 60:40, 50:50 y 40:60, respectivamente. El comportamiento obtenido en la presente investigación es semejante al reportados por Serment *et al.*, (2011) (100, 102, 109 y 105 mmol L⁻¹), pero son mayores que los observados por Chen *et al.* (2015) (64.02, 62.14, 60.83 y 61.15 mmol L⁻¹). Cantalapedra *et al.* (2009) no encontraron efecto ($P = 0.12$) para AGVt de 68.89 a 74.7 mmol L⁻¹ cuando la

proporción de concentrado aumentó de 30 a 70 % (F:C 70:30 vs. 30:70); sin embargo, Agle *et al.* (2010) reportaron un aumento de 2.1 % para la dieta con mayor proporción de concentrado, comparado con la dieta alta en fibra.

El porcentaje molar de acético, propiónico y butírico fue afectado ($P \leq 0.0001$) por la proporción F:C. La proporción de ácido propiónico y ácido butírico disminuyó conforme aumentó la relación de forraje, mientras que la del ácido acético se incrementó (Cuadro 4). La dieta con una relación F:C 60:40 indujo 7 y 13.2 % más ácido acético, en comparación con las dietas con 50:50 y la dieta 40:60. Por el contrario, el ácido propiónico fue 14 % menor en la dieta con una relación F:C 60:40, respecto a dietas con 40:60 y 50:50 F:C. El ácido butírico disminuyó conforme el incremento de la proporción de forraje en la dieta. Las relaciones F:C 50:50 y 60:40 produjeron una proporción semejante de butírico, mientras que la relación 40:60 indujo 14 % menos butírico respecto a las anteriores. La proporción molar del acético fue semejante a la encontrada por Chen *et al.* (2015) en yaks alimentados con dietas de proporción de F:C diferente, pero no hubo diferencias estadísticas entre tratamientos. Serment *et al.* (2011) también encontraron un incremento de 6.9 % en la concentración de acetato en dietas con mayor cantidad de forraje en comparación con otras de alto porcentaje de concentrado y para propionato el aumento fue 21 % al incrementar el concentrado; sin embargo, para butirato no se encontró efecto entre los tratamientos en cabras de media lactancia. Al evaluar cinco dietas con diferente relación F:C (20:80, 40:60, 50:50, 75:25 y 100:00), Phillipson (1970) encontró que las proporciones molares de AGV fueron: 53.6, 58.8, 65.3, 68.2 y 71.4 %, para acetato; 30.6, 25.9, 18.4, 18.1 y 16.0 %, para propionato y 10.7, 10.2, 10.4, 8.0 y 7.9, para butirato y los resultados obtenidos en nuestro estudio concuerdan con los de dicho autor.

La relación F:C en las dietas es uno de los factores que más influye en las condiciones del ecosistema ruminal (Ramos *et al.*, 2009) y el pH es uno de los factores más fluctuantes que afecta la concentración de AGV y la población microbiana del rumen, por lo que determina el perfil de fermentación ruminal (Yokohama y Johnson, 1988). Los carbohidratos de las raciones altas en forrajes se fermentan y producen ácidos grasos volátiles más lento que dietas altas en concentrado MCallister *et al.* (1993) y, además, promueven la producción de gran cantidad de saliva mediante la masticación, manteniendo así un pH ruminal más alto (Bach, 2002). Con lo anterior se favorece el establecimiento predominante de un consorcio microbiano fibrolítico con cepas de *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus spp*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Eubacterium*

cellulosolvens, *Fibrobacter succinogenes* (Finlayson, 1986; McAllister *et al.*, 1990; Russell, 1991; Ricke *et al.*, 1996; Wells *et al.*, 1997) y disminuyen los consorcios microbianos amilolíticos productores de ácido láctico como *Streptococcus bovis*, *Ruminobacter amylophilus*, *Lactobacilli sp.*, *Lactobacillus ruminis* y *Lactobacillus vitulinus* (Sharpe *et al.*, 1973; Nagaraja y Miller, 1989 y Gill *et al.*, 2000); así como *Lactobacilli* homofermentadores de isómeros (L- y D-) y heterofermentadores de (lactato y acetato o etanol) (Counotte *et al.*, 1981; Al Jassim y Rowe, 1999).

Los carbohidratos fibrosos son fermentados en mayor medida a acetato y butirato por las bacterias fibrolíticas antes mencionadas (Orskov, 1992). Estas rutas metabólicas en cuanto a energía son menos eficientes que la fermentación propiónica favorecida por carbohidratos no fibrosos (almidón y azúcares solubles), ya que por cada mol de ácido acético formado se liberan también dos moles de CO₂ y dos de H₂, parte de los cuales dan lugar a CH₄ por acción de las bacterias metanogénicas (Riquelme, 1987). La fermentación de almidón y azúcares solubles incrementa la producción de propionato, ruta metabólica que reduce la utilización deficiente de la energía contenida en los alimentos por la formación de CH₄, dado que no genera CO₂ ni H₂ y por el contrario consume H₂ (Riquelme, 1987; Van Soest, 1994). A pesar de tal ineficiencia, la producción de acetato y butirato es fundamental para la síntesis de grasa láctea en la glándula mamaria (McDonald *et al.*, 2002), la fermentación rápida y casi completa de los carbohidratos no estructurales en el rumen, incrementa la concentración de AGV y la reducción del pH, con lo que se puede inhibir la fermentación de la fibra (McAllister *et al.*, 1993).

Determinación de ácido láctico

La concentración de ácido láctico (AL) no fue afectada por la relación F.C (P > 0.05; Cuadro 4). En condiciones normales, la fermentación ruminal es de tipo acético-propiónico-butírica y la concentración de ácido láctico es baja, en cambio, en dietas con alta disponibilidad de carbohidratos de fácil fermentación y bajo contenido de fibra, la fermentación ruminal puede transformarse en tipo láctica (Palladino *et al.*, 2006) con concentraciones de ácido láctico hasta 100 mM L⁻¹. El ácido láctico es un ácido más fuerte (pKa = 3.86) que los AGV: propiónico (pKa = 4.87), acético (pKa = 4.76) o butírico (pKa = 4.82), por lo que su concentración en rumen tiene un efecto más marcado porque el fluido ruminal se acidifica con mayor facilidad como consecuencia de un desequilibrio en la producción de protones (H⁺) y de eliminación del medio ruminal ya sea por absorción o flujo al tracto inferior (Calsamiglia y Ferret, 2002; Palladino *et al.*, 2006). Una concentración entre 0.0 y 5

mmol L⁻¹ de ácido láctico es considerada adecuada en vacas lecheras (Nagaraja and Titgemeyer, 2007; Colocolino, 2015). Los valores observados en la presente investigación se encuentran dentro del intervalo mencionado. El no haber encontrado efecto en la concentración de ácido láctico por efecto de la relación F:C, pudo deberse a que las raciones alimenticias fueron manejadas de forma adecuada mediante un ofrecimiento gradual de las dietas altas en concentrado a los novillos. Este manejo evita la acumulación drástica del ácido láctico ya que el descenso rápido del pH ocasiona la inhibición y disminución de la población de bacterias utilizadoras de lactato (*Megasphaera elsdenii*, *Selenomonas* spp. y *Propionobacterium* spp.) (Huber *et al.*, 1976; Bach, 2002). La adaptación de dichas bacterias mediante el manejo alimenticio indicado permite un balance y solo un aumento transitorio en la acumulación de láctico (Mould y Ørskov, 1983; Dehority y Orpin, 1988). Además, Storm y Kristensen (2010) tampoco encontraron efecto ($P=0.31$) del tratamiento en la concentración de L- lactato.

Determinación de nitrógeno amoniacal

La concentración de N-NH₃ no fue afectada por la relación F:C ($P > 0.05$). Existe controversia respecto al nivel óptimo de N-NH₃ ruminal, entre otras razones, debido a que varía de acuerdo a si se busca maximizar la producción de proteína microbiana (Okorie *et al.*, 1977), la tasa de degradación de celulosa (Krebs y Leng, 1984) o consumo de materia orgánica digerible (Boniface *et al.*, 1986). En la literatura revisada hay valores tan bajos como 0.82 mmol L⁻¹ para tasa máxima de crecimiento microbiano (Okorie *et al.*, 1977) hasta 15.09 mmol L⁻¹ para maximizar el consumo de forraje (Hess *et al.*, 1999). De acuerdo con Hess *et al.* (1999), el nivel considerado como deficiente para la digestión y consumo de forrajes fibrosos es de 3.46 mmol L⁻¹ y el óptimo para maximizar el consumo de forraje es de 15.09 mmol L⁻¹. En vacas lecheras, el intervalo considerado apropiado va desde 6.0 hasta 17.5 mmol L⁻¹ de N-NH₃ (Colocolino, 2015). Los resultados obtenidos en el presente estudio se encuentran dentro de dicho intervalo, lo cual significa que estos niveles serían adecuados para que los microorganismos del rumen crezcan, se reproduzcan y formen suficiente proteína microbiana para el rumiante (Okorie *et al.*, 1977; Shaefer *et al.*, 1980), para maximizar la tasa de degradación (Mehrez *et al.*, 1977) y un buen consumo de forraje (Hess *et al.*, 1999).

A pesar de la gran importancia del amoníaco en el crecimiento de los microorganismos del rumen, es mucho más importante su efecto sobre la degradación de la proteína, ya que la actividad

proteolítica es mayor en dietas altas en concentrado que en dietas altas en forraje porque los microorganismos proteolíticos son principalmente amilolíticos (France y Siddons, 1993). Los valores obtenidos en nuestro estudio también coinciden con los reportados por Driedger y Loerch (1999) quienes no reportaron diferencias entre las dietas porque tenían similar concentración de proteína. En contraste, Agle *et al.* (2010) muestran diferencia ($P = 0.018$) en la concentración de N-NH₃ (7.4 y 6.5 mmol L⁻¹ para una dieta baja y alta en concentrado. Sin embargo coinciden con los reportados por González *et al.* (2010) de 10.92 y 10.39 mmol L⁻¹ de N-NH₃ en líquido ruminal ($P > 0.05$) de borregos alimentados con dietas con relación F:C 40:60 y 70:30, a las 3 h postprandial. Así mismo concuerdan con lo reportados por Storm y Kristensen (2010) para vacas lecheras alimentadas con 44.3 y 53.8 % de MS y dos tamaños de partícula (corta 3.0 y larga 30 mm) y no encontraron efecto en la concentración de N-NH₃, ($P=0.24$; 10.2 y 10.7 mmol L⁻¹) para partículas cortas, y para partículas largas 9.4 y 8.8 mmol L⁻¹. En cambio, Cantalapiedra-Hijar *et al.*, 2014) compararon una dieta baja contra una dieta alta en concentrado (70:30 vs 30:70) y encontraron un aumento ($P \leq 0.001$) de 26.15 % para la dieta con mayor cantidad de concentrado. Sin embargo coincidimos con Chen *et al.* (2015) quienes reportan la ausencia de efecto ($P = 0.178$) para N-NH₃ en yaks alimentados con dietas con diferente proporción F:C (70:30, 60:40, 50:50 y 40:60) y los valores de fueron 15.02, 16.29, 17.05 y 17.4 mmol L⁻¹, respectivamente.

CUADRO 4. Variables químico-fermentativas en líquido ruminal de novillos alimentados con dietas con tres proporciones de forraje concentrado (3 h postprandial).

Relación F:C	pH	NH ₃ ----- mmol L ⁻¹ -----	AL	AGVt	Acético ----- % molar -----	Propiónico	Butírico
40:60	5.74 ^b	10.95	0.34	95.12 ^{ab}	52.49 ^c	29.06 ^a	18.44 ^a
50:50	6.04 ^a	10.71	0.31	101.53 ^a	56.31 ^b	27.41 ^a	16.27 ^b
60:40	6.17 ^a	10.93	0.30	83.71 ^b	60.49 ^a	24.09 ^b	15.41 ^b
EEM	0.04	0.65	0.01	4.84	0.56	0.57	0.40
<i>P</i>	<.0001	0.9596	0.1472	0.0468	<.0001	<.0001	<.0001

^{a, b, ab} Medias con diferente literal en una columna son diferentes estadísticamente (Tukey, $P \leq 0,05$); F:C: proporción forraje concentrado, pH: potencial de hidrogeno, NNH₃: nitrógeno amoniacal, mmol L⁻¹: milimoles por litro, EEM: error estándar de la media.

Degradación *in situ* de la materia orgánica

La degradación de la materia orgánica (Cuadro 5) para las tres dietas fue parecida ($P > 0.05$) a 3, 6, 9, 12, 24 y 48 h de incubación ruminal, lo cual se pudo deber a que el error estándar de las medias en la DMO en estos horarios fue mayor y por eso no hubo diferencia. La DMO cambia al aumentar el porcentaje de inclusión de forraje en las dietas, puesto que aportan más fibra que el concentrado, y sus componentes (celulosa, hemicelulosa, lignina, sílice, nitrógeno ligado a lignina y pectinas) son menos digestibles (NRC, 2001). Este comportamiento difiere ($P \leq 0.05$) en el horario de 72 h de incubación en rumen, obteniendo 10.2 % mayor digestibilidad para la dieta con relación 40:60 en comparación con la dieta con relación F:C 60.40. El grado en el cual el concentrado afecta la digestión de la fibra depende de la naturaleza y proporción del concentrado, así como también de la calidad del forraje (Matejousky y Sanson, 1995). Calsamiglia y Ferret (2002) mencionan que las raciones con mayor digestibilidad ruminal de la MO son aquellas con menor contenido en FDN de los forrajes, a lo cual pudiera atribuirse lo ocurrido con esta variable. En general es aceptado que la adición de concentrado en la dieta de rumiantes incrementa la digestibilidad de la materia seca y la materia orgánica, lo cual puede variar de acuerdo al tipo de ingredientes empleados en cada experimento y al pH en el rumen (Fimbres *et al.*, 2002). Al respecto, Cantalapiedra *et al.* (2009) encontraron un efecto parecido al reportar valores de una digestibilidad aparente de la materia orgánica 16 % mayor en una dieta alta en concentrado, comparada con una dieta alta en forraje ($P \leq 0.001$). Sin embargo, Agle *et al.* (2010) no reportan diferencias estadísticas ($P = 0.31$) al evaluar el

efecto de dos niveles de concentrado (52 y 72 %) sobre la digestibilidad aparente de la materia orgánica (71.1 vs 67.6), pero los resultados de la presente investigación son diferentes.

Los parámetros de degradación ruminal (Kd, A, B y C) se muestran en el Cuadro 5. La relación F:C solo afectó ($P \leq 0.05$) la fracción indigestible o fracción C. Esta fracción fue menor en la dieta con la relación F:C 60:40, por lo que la degradación fue 32.4 % menor que la observada con la relación F:C de 40:60. Aunque la tasa de digestión, la fracción soluble y fracción potencialmente degradable no mostraron diferencia ($P > 0.05$) estos factores solo pudieron estar relacionados con la selección de bacterias ruminales con mayor tasa de reproducción, al diseño usado o el error estándar. Jaakola y Huhtanen (1993) observaron que a medida que aumenta la proporción de concentrado en la ración se producía un incremento paralelo de la digestibilidad *in vitro* de la MS y la MO así como una disminución de la digestión de los componentes de la pared celular. Esto por los cambios en la digestión en el rumen y diversos mecanismos en los que destaca las modificaciones que producen el crecimiento y actividad, o ambos, de los microorganismos ruminales (Mould, 1988).

CUADRO 5. Degradación *in situ* de la materia orgánica y variables de degradación ruminal de tres dietas con tres proporciones de forraje y concentrado, en novillos Holstein con cánula en el rumen.

Tiempo postprandial (h)	Relación F:C			EEM
	40:60	50:50	60:40	
3	44.90	41.16	39.54	2.48
6	53.05	49.48	47.33	3.08
9	57.14	56.45	52.03	2.66
12	60.71	59.87	55.16	3.45
24	73.76	67.69	64.36	3.62
48	78.57	73.62	70.77	2.58
72	82.47 ^a	79.29 ^{ab}	74.07 ^b	2.04
Kd, h ⁻¹	0.49257	0.47053	0.44483	0.02
A, %	52.13	49.38	46.55	2.88
B, %	30.34	29.90	27.51	1.87
C, %	17.52 ^b	20.70 ^{ab}	25.93 ^a	1.93

^{a, b, ab} Medias con diferente literal en una hilera son diferentes estadísticamente (Tukey, $P \leq 0,05$); F:C: proporción forraje concentrado, Kd: coeficiente de degradación expresado en horas, A: fracción soluble expresado en porcentaje, B: fracción potencialmente degradable expresado en porcentaje, C: fracción indigestible expresado en porcentaje, EEM: error estándar de la media.

Prueba *in vitro*

Degradación verdadera *in vitro* de la materia seca

La digestibilidad verdadera (DVIV) a 72 h de incubación *in vitro* fue diferente ($P \leq 0.05$), porque la DVIV fue 7.7 % mayor para la dieta con relación F:C de 40:60, respecto a las otras dos dietas. Estos datos coinciden con los obtenidos *in situ* (Cuadro 6). El volumen máximo de gas (V_m), tasa (S) y tiempo de retardo (L) de la producción de gas no fueron afectados ($P > 0.05$) por las proporciones de F:C en las dietas. Aunque el V_m mostró una conducta semejante a la DVIV, cuando se calcula el V_m en función de la materia orgánica digerida, la similitud entre dietas es mayor. Sin embargo, dado que el volumen de gas solo manifiesta que un sustrato se fermenta más o menos que otro, es conveniente transformar este dato a cantidad de materia seca digerida, y con ese objetivo se

obtuvieron las fracciones de rápida, media y lenta de fermentación (FR, FM, FL); así como la fracción total fermentable (FT) expresada en % o g kg^{-1} MS (Miranda *et al.*, 2016; Vázquez, 2016), pero tampoco hubo diferencias estadísticas ($P > 0.05$) entre dietas. La fracción de mayor proporción en las dietas es FR y FM, en comparación a la fracción FL. Puesto que los carbohidratos en los alimentos para rumiantes son los principales compuestos fermentables por los microorganismos ruminales, las fracciones calculadas (FR, FM, FL y FT) corresponden, aunque no en forma total, a carbohidratos solubles de rápida fermentación (azúcares y oligosacáridos), polisacáridos de fermentación media como el almidón y ciertas porciones de pectina y hemicelulosa, y polisacáridos estructurales de pared celular de lenta fermentación (Stockes, 1997). En este sentido, las dietas investigadas tienen una mayor proporción de FR y FM con respecto a FL. El valor de FM está subestimado dado que las dietas fueron formuladas con alta cantidad de concentrado (40, 50 y 60 %). La fracción FL es baja y puede estar afectado por los cambios en las poblaciones microbianas y pH causado por este tipo de dietas altas en concentrado (40 a 60 %), debido a que la degradación de los carbohidratos fibrosos disminuye al añadir alimentos ricos en carbohidratos no estructurales (Valdiveloo y Holmas, 1979). En estudios *in vitro*, *in situ* e *in vivo* se ha observado una disminución en la degradación de la fibra debido a un decremento del pH menor a 6 al aumentar la cantidad de concentrado en la dieta (Hover, 1986; Shriver *et al.*, 1986; Russell y Wilson, 1996). Además, la fracción fermentable total deberá relacionarse con la digestibilidad; sin embargo, en el presente estudio los valores de FT son menores a los de la DIS o DVIV (Cuadros 5 y 6). Dado que ambas variables representan procesos metabólicos distintos, esto indicaría que no todo lo digerible es fermentable, al menos para este tipo de dietas. La degradación verdadera de la materia seca obtenida en este estudio concuerda con lo reportado por González *et al.* (2015), quienes encontraron digestibilidades de la materia seca de 79.3, 81.8, 84.6 y 83.9, para dietas para borregos con relaciones de F:C de 70:30, 60:40, 50:50 y 40:60.

En el Cuadro 6 se muestran los valores de las fracciones de rápida, media y lenta fermentación. La producción de gas resulta de la fermentación de los carbohidratos solubles y estructurales del sustrato. El desarrollo de consorcios microbianos sacarolíticos, amilolíticos y fibrolíticos está determinada por la fermentación de los carbohidratos del alimento ofrecido al rumiante (Hall y Weimer, 2007; Firkins, 2010). Las poblaciones sacarolíticas crecen en las primeras horas de fermentación y decrecen conforme se agote FR, después inicia de manera interpuesta el crecimiento de las bacterias amilolíticas a medida que se fermente el almidón a partir de las 8 hasta 24 h de incubación *in vitro* y al final, el consorcio fibrolítico se desarrolla hasta el final y de forma más lenta

de las 24 a 72 h de incubación *in vitro* (Fluck *et al.*, 2013; Miranda *et al.*, 2015, 2016). Las dietas tuvieron mayor cantidad de CFR (Vf 0-8) y en menor proporción de CFM (Vf 8-24) de reserva, y una proporción escasa de carbohidratos estructurales (Vf 24-72). Esto es debido a que la fracción fibrosa contiene celulosa, hemicelulosa y lignina, que es la estructura de soporte de la planta, por lo cual los forrajes presentan menor digestibilidad (Singh *et al.*, 2012). Estas dietas tienen más forraje y, en consecuencia, más carbohidratos estructurales, por lo cual es difícil que se presente mayor degradación de las dietas, en comparación con las altas en carbohidratos de fácil fermentación. Otro factor al cual se puede atribuir la disminución en la degradación de la fibra es la competencia por nutrientes esenciales, debido a la proliferación de bacterias que crecen más rápido que otras, despojando de los nutrientes a las bacterias que son más lentas (Russell *et al.*, 1983).

El índice de emisión potencial de gases de fermentación (IEPGF) representa el gas que potencialmente se puede emitir al ambiente por cada gramo de alimento fermentado si el alimento se mantuviera por 72 h en incubación, y puede servir para comparar sustratos con mayor potencial contaminante a la atmósfera, más al considerar que aproximadamente el 92 % de la composición del gas de fermentación corresponde a CO₂ y CH₄, gases de efecto invernadero (Beauchemin *et al.*, 2008). El análisis no mostró diferencias ($P > 0.05$) por efecto de dieta ya que estos valores presentan errores estándares muy altos; sin embargo, el IEPGF indica que estas dietas pueden producir entre 1,880 a 2,127 L de gas por animal y entre 41.8 a 47.2 L por litro de leche producida, y que la dieta con mayor proporción de concentrado tiene un mayor IEPGF. Sería muy conveniente conocer la proporción de metano y bióxido de carbono para observar cómo cambia este índice.

Na *et al.* (2013) reportan valores de metano (CH₄) de 32.88, 22.54 y 20.27 L⁻¹ kg⁻¹ de leche en dietas para vacas lecheras con proporciones 40:60 tallos de maíz: forraje, 40:60 ensilaje de maíz: forraje y 60:40 ensilaje de maíz: forraje.

CUADRO 6. Degradación verdadera *in vitro* de la materia seca, fracciones de rápida, media y lenta fermentación, parámetros de cinética de producción de gas e índices de emisión potencial de gases de fermentación (IEPGF) de tres dietas, con tres proporciones de forraje y concentrado evaluadas con tres inóculos obtenidos de tres novillos Holstein con cánula en el rumen.

Variable	Relación F:C			P	EEM
	40:60	50:50	60:40		
DVIVMS _{72h} , %	86.32 ^a	80.06 ^b	79.15 ^b	0.0201	1.60
FR, %	19.66	17.51	18.14	0.4471	1.18
FM, %	13.86	12.03	12.04	0.6872	1.69
FL, %	7.09	9.09	7.81	0.7653	1.92
FT, %	40.63	38.65	37.99	0.8929	4.05
Vm mL g ⁻¹ MS	202.25	186.22	185.32	0.9088	-
Vm mL g ⁻¹ MOD	234.30	232.40	234.13		
S, h ⁻¹	0.1364	0.0459	0.0512	0.3565	-
L, h	1.2169	0.2873	0.5534	0.4322	-
IEPGF					
Total dL animal ⁻¹ d ⁻¹	212.71	190.58	188.08	0.6613	20.64
Total dL animal ⁻¹ L ⁻¹	4.72	4.23	4.18	0.6629	0.45

^{a, b} Medias con diferente literal en una hilera son diferentes estadísticamente (Tukey, $P \leq 0,05$); F:C: proporción forraje concentrado; % DVIVMS_{72h}: porcentaje de digestibilidad verdadera *in vitro* de la materia seca a 72 h de incubación; % FR: porcentaje de fracción de rápida fermentación; % FM: porcentaje de mediana fermentación; % FL: porcentaje de lenta fermentación; FT: fermentación total; Vm, mL g⁻¹: volumen máximo de gas producido; Vm mL g⁻¹ MOD: volumen máximo de gas producido en función de la materia orgánica digerida; S, h⁻¹: tasa de producción de gas; L, h: tiempo Lag; IEPGF total de dL animal⁻¹ d⁻¹ Índice de emisión potencial de gases de fermentación total de decalitros por animal por día; IEPGF total de dL animal⁻¹ L⁻¹ Índice de emisión potencial de gases de fermentación total de decalitros por animal por litro de leche y EEM: error estándar de la media.

CONCLUSIÓN

De acuerdo con las condiciones y características en las que se efectuó este experimento podemos concluir que la relación de forraje: concentrado 40:60 mejoró moderadamente la digestión *in situ* y el consumo de la materia orgánica en novillos Holstein. Y aunque en el análisis estadístico el índice de emisión potencial de gases de fermentación (IEPGF) no mostro diferencias entre los tratamientos, se encontró que las dietas usadas en este estudio pueden producir entre 1,880 a 2,127 L de gas por animal por día y de 41.8 a 47.2 L por litro de leche producida. Sin embargo, sería conveniente conocer la proporción de metano y dióxido de carbono para observar cómo cambia este índice.

BIBLIOGRAFÍA

- Agle, M., A. N. Hristov, S. Zaman, C. Schneider, P. M. Ndegwa, and V. K. Vaddella. 2010. Effects of dietary concentrate on rumen fermentation, digestibility, and nitrogen losses in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93: 421-4222.
- Aguerre, M. J., M. A. Wattiaux, J. M. Powell, G. A. Broderick, and C. Arndt. 2011. Effects of forage to concentrate ratio in dairy cows on emission of methane, carbon dioxide, and ammonia, lactation. *J. Dairy Sci.* 94: 3081-3093.
- Al Jassim, R. A. M., and J. B. Rowe. 1999. Better understanding of acidosis and its control. *Recent Adv. in Anim. Nutrit. In Aust.* 12: 91-97.
- AOAC (Association of Official Agricultural Chemists). 2007. *Official Methods of the Association of the Agricultural Chemists (18th Ed)* Washington D.C. A.O.A.C International.
- Apréiz G., A. Gálvez, y C. Jojoa R. 2014. Valoración nutricional y emisión de gas de algunos recursos forrajeros del trópico de altura. *Rev. Cienc. Agríc.* 31 (2): 122-134.
- Bach A. 2002. Trastornos ruminales en el vacuno lechero: un enfoque practico-acidosis ruminal y laminitis. IRTA-Sistemas de producción de vacuno lechero. XVIII curso de especialización FEDNA, Barcelona, España. 4 y 5 de noviembre de 2002. Disponible en: <http://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/3494/articulos-rumiantes-archivo/trastornos-ruminales-en-el-vacuno-lechero:-un-enfoque-practico.html>. Visitado 26 de octubre de 2016. 20 p.
- Barker, S. B., and W. H. Summerson. 1941. The colorimetric determination of lactic acid in biological material. *J. Biol. Chem.* 138: 335-354.

- Beauchemin, K. A., D. M. Kreuzer, F. O'Marac, and T. A. McAllister. 2008a. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Aust. J. Exp. Agric.* 48: 21-27.
- Beauchemin, K. A., S. M. McGinn, and C. Grainger. 2008b. Reducing methane emissions from dairy cows. *WCDS Adv. Dairy Tech.* 20: 79-93.
- Beauchemin, K. A., H. H. Janzen, S. M. Little, T. A. McAllister, and S. M. McGinn. 2010. Life cycle assessment of greenhouse gas emissions from beef production in western Canada: a case study. *Agric. System.* 103: 371-379.
- Benchaar, C., C. Pomar, and J. Chiquette. 2001. Evaluation of dietary strategies to reduce methane production in ruminants: a modeling approach. *Can. J. Anim. Sci.* 81: 563-574.
- Boniface, A. N., R. M. Murray, J. P. Hogan. 1986. Optimum level of ammonia in the rumen liquor of cattle fed tropical pasture hay. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.* 16: 151-154.
- Bonilla J., A., C., y F. Lemus C. 2012. Emisión de metano entérico por rumiantes y su contribución al calentamiento global y al cambio climático. *Rev. Mex. Cienc. Pecu.* 3 (2): 215-246.
- Buddle, B. M., M. Denis, G. T. Attwood, E. Altermann, P. H. Janssen, R. S. Ronimus, C. S. Pinares-Patiño, S. Muetzel, and D. N. Wedlock. 2011. Strategies to reduce methane emissions from farmed ruminants grazing on pasture. *J. Vet.* 188: 11-17.
- Calsamiglia S. y A. Ferret. 2002. Fisiología ruminal relacionada con la patología digestiva: acidosis y meteorismo. *Memorias del XVIII curso de especialización FEDNA, 4 y 5 de Noviembre.* Barcelona, España.
- Cantalapiedra-Hijar, G., D. Yáñez-Ruiz R., y E. Molina-Alcaide. 2009. Estudio comparativo de los efectos del tipo de forraje-concentrado sobre la fermentación ruminal en cabras y en fermentadores de flujo simple continuo. *AIDA, XIII Jornadas sobre producción animal, tomo 1 pp: 316-318.*
- Cantalapiedra- Hijar, G., D. Yáñez-Ruiz R., A. Martín- García I., and E. Molina-Alcaide. 2014. Effects of forage: concentrate ratio and forage type on apparent digestibility, ruminal fermentation and microbial growth in goats. *J. Anim. Sci.* 87: 622-631.
- Capper, J. L., and D. E. Bauman. 2013. The role of productivity in improving the environmental sustainability of ruminant production systems. *Ann. Rev. Anim. Biosci.* 1: 9.1-9.21.
- Ceballos, A., R. R. Noguera, D. M. Bolívar y S. L. Posada. 2008. Comparison of the nylon bag *in situ* technique and *in vitro* (Daisy^{II}) to estimate the kinetics of degradation of feeds for ruminants. *Liv. Res. Rural Dev.* 20: 7.

- Chen, G. J., S. D. Song, B. X. Wang, Z. F. Zhang, Z. L. Peng, C. H. Guo, J. C. Zhong and Y. Wang. 2015. Effects of forage: concentrate ratio on growth performance, ruminal fermentation and blood metabolites in housing- feeding yaks. *Asian Aust. J. Anim. Sci.* 28 (12): 1736-1741.
- Chuntrakort, P., M. Otsuka, K. Hayashi, A. Takenaka, S. Udchachon, and K. Sommart. 2014. The effect of dietary coconut kernels, whole cottonseeds and sunflower seeds on the intake, digestibility and enteric methane emissions of Zebu beef cattle fed rice straw based diets. *Livest. Sci.* 161: 80-89.
- Colocolino S., C. 2015. Análisis de líquido ruminal y diagnóstico de trastornos ruminales. Disponible en: <http://myslide.es/documentos/análisis-de-liquido-ruminal.html>. Visitado 03-20-2016.
- Counotte, G. H. M., R. A. Prins, and R. H. A. Janssen. 1981. Role of *Megasphaera elsdenii* in the fermentation of DL-[2-¹³C] lactate in the rumen of dairy cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* 42: 649-655.
- Dehority, B. and A. Orpin. 1988. Development of and natural fluctuations in, ruminal microbial populations. In: *The rumen microbial ecosystem*, Hobson, P. N. Ed. Elsevier: New York. Applied Sciences, London, UK. pp: 151-183.
- DeRamus, H. A., T. C. Clement, D. D. Giampaola, and P. C. Dickinson. 2003. Methane emission of beef cattle on forage: efficiency of grazing management system. *J. Env. Qual.* 32: 269-277.
- Doreau, M., V. D. Werf, H. M. G. Micol, D. Dubroeuq, H. Agabriel, J. Rochette, and C. Martin. 2011. Enteric methane production and greenhouse gases balance of diets differing in concentrate in the fattening phase of a beef production system. *J. Anim. Sci.* 89: 2518– 2528.
- Driedger, L. J., and S. C. Loerch. 1999. Effect of protein concentration and source on nutrient digestibility by mature steer limit-fed high-concentrate diet. *J. Anim. Sci.* 77: 960-966.
- Eckard, R. J. and C. A. M. de Klein. 2010. Options for the abatement of methane and nitrous oxide from ruminant production: a review. *Liv. Sci.* 130: 47-56.
- Erwin, E. S., G. J. Marco, and E. M. Emery. 1961. Volatile fatty acid analysis of blood and rumen fluid by gas chromatography. *J. Dairy Sci.* 44: 1768-1776.
- Eugéne, M., C. Martin, M. M. Mialon, D. Krauss, G. Renand, and M. Doreau. 2011. Dietary linseed and starch supplementation decreases methane production of fattening bulls. *Anim. Feed Sci. Tech.* 166-167: 330-337.

- Fimbres, H., J. R. Kawas, G. Hernández-Vidal, J. F. Picón-Rubio, and C. D. Lu. 2002. Nutrient intake, digestibility, mastication and ruminal fermentation of lambs feed finishing ration with various forage levels. *Small Rum.* 43: 275-281.
- Finlayson, H. J. 1986. The effect of pH on the growth and metabolism of *Streptococcus bovis* in continuous culture. *J. Appl. Bacteriol.* 61: 201-208.
- Firkins, J. L. 2010. Reconsidering rumen microbial consortia to enhance feed efficiency and reduce environmental impact of ruminant livestock production systems. *Rev. Bras. Zootec.* 39: 445-457.
- Fischer, J. M., J. G. Buchanan-Smith, C. Campbell, D. G. Grieve, and O. B. Allen .1994. Effects of forage particle size and long ha for cows fed total mixed rations based on alfalfa and corn. *J. Dairy Sci.* 77: 217-229.
- Fluck, A. C., G. V. Kozloski, A. A. Martins, M. P. Mezzomo, F. Zanferari, and S. Stefanello. 2013. Relationship between chemical components, bacterial adherence and in vitro fermentation of tropical forage legumes. *Sci Agrotec.* 37: 457-464.
- Foley, P. A., D. A. Kenny, J. J. Callan, T. M. Boland, and F. P. O'Mara. 2009. Effect of dl-malic acid supplementation on feed intake, methane emission, and rumen fermentation in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 87: 1048-1057.
- Fonty, G., K. Joblin, M. Chavarot, R. Roux, G. Naylor, and F. Michallon. 2007. Establishment and development of ruminal hydrogenotrops in methanogen-free lamps. *Appl. Env. Microbiol.* 73: 6391-6403.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2006. Las repercusiones del ganado en el medio ambiente. En: <http://www.fao.org/ag/esp/revista/0612sp1.htm>.; Visitado: Noviembre, 2015.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2011. World livestock. Livestock in Food Security. Rome, FAO
- France, J., and R. C. Siddons. 1993. Volatile fatty acid production. pp. 107-121 en: Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism. CAB international, Wallingford, Oxon, UK.
- Garnsworthy, P. C., J. Craigon., J. H. Hernandez-Medrano and N. Saunders. 2012. Variation among individual dairy cows in methane measurements made on farm during milking. *J. Dairy Sci.* 95 (6): 3181-3189.
- Gatechew, G., M. Blümmel, H. P. Makkar, and K. Becker. 1998. *In vitro* measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 72: 261-281.

- Gill, H., S.Q. Shu, and R. A. Leng. 2000. Immunization with *Streptococcus bovis* protects against lactic acidosis in sheep. *Vaccine*. 18: 2541-2548.
- Goering, H. K., and P. J. Van Soest. 1970. Forage fiber analysis (Apparatus, reagents, procedures and some applications). *Agriculture Handbook No. 379*, Agricultural Research Service-USDA, Washington, D.C. 20 p.
- González G., H., R. Martínez de la R., A. Orozco E., H. Perea N., B. López M., C. Holguín L., y H. E. Hernández C. 2010. Efecto del tipo de dieta y el grupo racial sobre el comportamiento digestivo en borregos: efecto del nivel de consumo y de la relación forraje, concentrado sobre el comportamiento digestivo en borregos. 1^{era} ed. Subdirección de publicaciones, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Cd. Juárez, Chihuahua, México. Colección Textos Universitarios, serie Investigación 40 p.
- González G., H., S. González R., L. G. Escalante C., A. Orozco E. y C. Holguín L. 2015. Digestibilidad *in vivo* en borregos. Efecto de la relación forraje- concentrado en la dieta y el grupo racial. Subdirección de Publicaciones, 1^{er} edición, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Cd. Juárez, Chihuahua, México, 33 p.
- Hall, M. B., and P. J. Weimer. 2007. Sucrose concentration alters fermentation kinetics, products, and carbon fates during *in vitro* fermentation with mixed ruminal microbes. *J. Anim. Sci.* 85: 1467-1478.
- Hatew, B., S. C. Podesta, H. Van Laar, W. F. Pellikaan, J. L. Ellis, J. Dijkstra, and A. Bannink. 2015. Effects of dietary starch content and rate of fermentation on methane production in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98 (1): 486-499.
- Hess H., D., H. Florez, E. González y M. Ávila. 1999. Efecto del nivel de nitrógeno amoniacal en el rumen sobre el consumo voluntario y la digestibilidad *in situ* de forrajes tropicales. *Pastos Tropicales*. 21 (1): 73-49.
- Hook, S. E., A. Wright and B. W. McBride. 2010. Review article methanogens: Methane producers of rumen and mitigation strategies. *Archaea*. pp: 1-10.
- Hover, W. H. 1986. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. *J. Dairy Sci.* 69: 2755-2766.
- Huber, T. L., J. H. Cooley, and D. D. Goetsch. 1976. Lactic acid-utilizing bacteria in ruminal fluid of a steer adapted from hay feeding to a high-grain ration. *Am. J. Vet. Res.* 37: 611-613.

- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate change) 2007. Climate Change 2007: The Physical Science Basis, Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. World Meteorological Organization. Geneva, Switzerland. 939 p.
- Jaakola, S., and P. Huhtanen. 1993. The effects of forage preservation method and proportion of concentrate on nitrogen digestion and rumen fermentation in cattle. *Grass Forage Sci.*, 48: 146-154.
- Janssen, P., and H. Kirst. 2008. Structure of the archaeal community of the rumen. *Appl. Env. Microbiol.* 74 (12): 36.
- Jordan, E., D. K. Lovett, F. J. Monahan., J. Callan, B. Flynn, and F. P. O'Mara. 2006. Effects of refined coconut oil or copra meal on methane output and on intake and performance of beef heifers. *J. Anim. Sci.* 84: 162-170.
- Julier, B., M. Lila, V. Furstoss, V. Travers, and C. Huyghe. 1999. Measurement of cell-wall digestibility in lucerne using the filter bag technique. *Anim. Feed Sci. Technol.* 79: 239-245.
- Karakurt, I., G. Aydin, and K. Aydiner. 2012. Source and mitigation methane emissions by sectors: a Critical Review. *Ren. Energy.* 39: 40-48.
- Karlssona, L. M., R. Hetta, P. Udén, and K. Martisson. 2009. New methodology for estimating rumen protein degradation using the *in vitro* gas production. *Anim. Feed Sci. Technol.* 153: 193-202.
- Kellems, R. O., D. C. Church. 2002. Supplemental protein source. In *livestock feeds and feeding*. Kellems, R. O., D. C. Church (Eds), 5^a edition. ED. Prentice Hall. New Jersey. pp: 86- 116.
- Knapp, J. R., G. L. Laur, P. A. Vadas, W. P. Weiss, and J. M. Tricarico. 2014. Invited review: Enteric methane in dairy cattle production: Quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. *J. Dairy Sci.* 97: 3231-3261.
- Knight, T., R. S. Ronimus, D. Dey, C. Tootill, G. Naylor, P. Evans, G. Molano, A. Smith, M. Tavendale, C. S. Pinares, and H. Clark. 2011. Chloroform decreases rumen methanogenesis and methanogen populations without altering rumen functions in the cattle. *Anim. Feed Sci. and Tech.* 166-167: 101-112.
- Krause, K. M., and G. R. Oetzel. 2006. Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 126: 215-236.
- Krebs, G., and R. A. Leng. 1984. The effect of supplementation whit molasses/urea blocks on ruminal digestion. *Proc Aust. Soc. Anim. Prod.* 15: 704.

- Kumar, S., S. Singh, A. Kumar, R. C. Upadhyay. 2013. Changes in methane emissions, rumen fermentation in response to diet and microbial interaction. *Res. Vet. Sci.* 94: 263-268.
- Liu, H., Vaddella, and D. Zhou. 2011. Effects of chestnut tannins and coconut oil on growth performance, methane emissions, ruminal fermentation, and microbial populations in sheep. *J. Dairy Sci.* 94: 6069-6077.
- Liu, J. X., A. Susenbeth, and K. H. Südekum. 2002. *In vitro* production measurement to evaluate interactions between untreated and chemically treated rice straws, grass hay, and mulberry leaves. *J. Anim. Sci.* 80: 517-524.
- Martin, C., D. P. Morgavi, and M. Doreau. 2010. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *J. Anim. Biosci.* 4: 351–365.
- Matejousky, K. M., and D. W. Sanson. 1995. Intake and digestion of low- medium and high quality grass hays by lambs receiving increasing levels of corn supplementation. *J. Anim. Sci.* 73: 2156-2163.
- McAllister, T. A., and C. J. Newbold. 2008. Redirecting rumen fermentation to reduce methanogens. *Aust. J. Exp. Agric.* 48: 7-13.
- McAllister, T. A., K. Cheng, and L. M. Rode. 1990. Digestion of barley, maize, and wheat by selected species of ruminal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3146-3153.
- McAllister, T. A., R. C. Phillippe, L. M. Rode, and K. J. Cheng. 1993. Effect of the protein matrix on the digestion of cereal grains by ruminal microorganisms. *J. Anim. Sci.* 71: 205-212.
- McCullough, H. 1967. The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. *Clinica Chimica Acta* 17: 297-304.
- McDonald, P., R. A. Edwards, J. F. D. Greenhalgh, and C. A. Morgan. 2002. *Animal nutrition*. Harlow Englewood Upper Saddle River. NJ. New York: Prentice Hall. 639 p.
- Meherez A. Z., Ørskov E. R., Y. McDonald. 1977 rates of rumen fermentation in relation to ammonia concentration. *British J. of Nutrition* 38: 437.
- Meng-Meng, L., Z. Gui-Guo, S. Xue-Zhao, D. Shu-ting, and S. O. Hosking. 2014. Studies of methane emissions from pastoral farming in New Zealand. *J. Int. Agric.* 13 (2): 365-377.
- Menke, K. H., and H. Steingass. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Dev.* 28: 7-55.
- Mohammed, R., S. M. McGinn, and K. A. Beauchemin. 2011. Prediction of enteric methane output from milk fatty acid concentration and rumen fermentation parameters in dairy cows fed sunflower, flax or canola seeds. *J. Dairy Sci.* 94: 6057-6068.

- Moss, A. R., J. P. Jouany, and J. Newbold. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Ann. Zootech.* 49: 231-253.
- Mould, F. L., and E. R. Ørskov. 1983. Manipulation of rumen fluid pH and its influence on cellulolysis *in sacco*, dry matter degradation and the rumen microflora of sheep offered either hay or concentrate. *Anim. Feed Sci. Technol.* 10: 1-14.
- Mould, F. L. 1988. Associative effects of feeds. In: Ørskov, E.R. (ed). *Feed Science*. pp. 279-292. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam
- Mould, F.L., and H. Nordheim. 1998. Dry matter and NDF degradation profiles of roughages obtained using the ANKOM *in vitro* system. *Brit. Soc. Anim. Sci.* 22: 329-331.
- Muñoz, C., T. Yan, D. A. Wills, S. Murray, and A. W. Gordon. 2012. Comparison of the sulphur hexafluoride tracer and respiration chamber techniques for estimating methane emissions and correction for rectum methane output from dairy cows. *J. Dairy Sci.* 95: 3139-3148.
- Na, R., H. Dong, Z. Zhu, Y. Chen, and H. Xin. 2013. Effects of forage type and dietary concentrate to forage ratio on methane emissions and rumen fermentation characteristics of dairy cows in china. *Agric. Biosyst. Eng.* 56 (3): 1115-1122.
- Nagaraja, T. G., and G. W. Miller. 1989. Rumen microbial changes in ionophore antibiotic-treated steers with experimentally induced acidosis. *Aust. J. Anim. Sci.* 2: 465-468.
- Nagaraja, T. G., and E. C. Titgemeyer. 2007. Acidosis in beef cattle. *J. Dairy Sci.* 90 (1): 17-38.
- NRC (National Research Council). 2001. *Nutrient requirements of dairy cattle: Seventh. Revised Edition*. The National Academies Press. Washington, DC. 408 p.
- Nsahlai, I. V., N. N. Umunna, and D. Negassa 1995. The effect of multi-purpose tree digests on *in vitro* gas production from napier grass for neutral-detergent fiber. *J. Sci. Food Agric.* 69: 519-528.
- Nuñez H., G., A. Díaz E., R. Ortega L., A. Hernández L., A. H. Vera R., P. Román H., C. Medina M., y L. Ruiz F. de J. 2009. Producción de leche de bovino en el sistema intensivo. Libro técnico No. 23, pp: 4.
- Okorie, A. U., P. J. Buttery, and D. Lewis. 1977. Ammonia concentration and protein Synthesis in the rumen. Abstracts of communication. *Proc. Nutr. Soc.* 38: 38.
- Ørskov, E. R., and McDonald. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *J. Agric. Sci., Camb.* 92: 499-503.

- Ørskov, E. R. 1992. Host animal protein requirements and protein utilization. In Protein Nutrition in ruminants, 2nd Edition, Harcourt Brace Jovanovich, San Diego, CA. 85-136.
- Owens F. N., D. S. Secrist, and W. J. Hill. 1998. Acidosis in cattle: a review. *J. Anim. Sci.* 76: 275-286.
- Palladino A., M. Wawrzekiewicz y F. Bargo. 2006. Fisiología digestiva. Manejo del alimento - La fibra. *Infortambo, Bs. As.*, 202: 82–84. En: www.prodccion-animal.com.ar sitio argentino de producción animal. Visitado el 23 de enero de 2015.
- Phillipson, A. T. 1970. *Physiology of digestion and metabolism in the rumen*. Oriel Press, Newcastle upon Tyne, England. 369 p.
- Posada S., L., y R. Noguera R. 2005. Técnica *in vitro* de producción de gases: una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. *Liv. Res. Rural Dev.* 17: 1-9.
- Ramos S., M. Ranilla J., M. Martínez E., C. Saro, M. Tejido L., M. Carro D. 2009. Efecto de la relación forraje: concentrado y el tipo de forraje de la dieta sobre las comunidades bacterianas del rumen de ovejas. *AIDA, XIII Jornadas sobre la producción animal.* 2: 760-762.
- Relling A., E., y G. Mattioli A. 2003. Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes. Facultad de ciencias veterinarias – UNPL. Actualización de Ed. EDULP. 2002-2003. 72 p.
- Rémond, D., F. Meschy, and R. Bolvin. 1996. Metabolites, water and mineral exchanges across the rumen wall: Mechanisms and regulation. *Ann. Zootech.* 45: 97-119.
- Ricke, S. C., S. A. Martin, and D. J. Nisbet. 1996. Ecology, metabolism, and genetics of ruminal selenomonads. *Crit. Rev. Microbiol.* 22: 27-65.
- Riquelme V., E. 1987. Suplementación energética para bovinos en pastoreo En: Memoria del seminario internacional, Suplementación para bovinos en pastoreo. Ed. Centro de Ganadería Colegio de Postgraduados. (Ed) González M. S. S. Chapingo. 65 pp.
- Russell, J. B., C. J. Sniffen, and P. J. Van Soest. 1983. Effect of carbohydrate limitation of degradation and utilization of casein by mixed rumen bacteria. *J. Dairy Sci.* 66: 763-775.
- Russell, J. B. 1991 Intracellular pH of acid-tolerant ruminal bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3383-3384.
- Russell, J. B., and D. B. Wilson. 1996. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? *J. Dairy Sci.* 79: 1503-1509.
- Schofield, P., and A. N. Pell. 1995. Measurement and kinetic analysis of neutral detergent-soluble carbohydrate fraction of legumes and grasses. *J. Anim. Sci.* 73: 3455-3463.

- Schofield, P. 2000. Gas production methods. In: Farm Animal Metabolism and Nutrition. Wallingford, U.K., CAB international. 450 p.
- Serment, A., P. Schmidely, S. Glger-Reverdin, P. Chapoutot, and D. Sauvant. 2011. Effects of percentage of concentrate on rumen fermentation, nutrient digestibility, plasma metabolites, and milk composition in mid-lactation goats. *J. Dairy Sci.* 94: 3960-3972.
- Shaefer, D. M., C. L. Davis, and M. P. Bryant. 1980. Ammonia saturation constants for predominant species of rumen bacteria. *J. Dairy Sci.* 63: 1248-1263.
- Sharpe, M. E., M. J. Latham, and E. I. Garvie. 1973. Two new species of *Lactobacillus* isolated from the rumen, *Lactobacillus ruminis* sp nov and *Lactobacillus vitulinus* sp nov. *J. Gen. Microbiol.* 77: 37-49.
- Shinkai, T., O. Enishi, M. Mitsumori, K. Higuchi, Y. Kobayashi, A. Takenaka, K. Nagashima, M. Mochizuki, and Y. Kobayashi. 2012. Mitigation of methane production from cattle by feeding cashew nut shell liquid. *J. Anim. Sci.* 95: 5308-5316.
- Shriver, B. J., W. H. Hoover, J. P. Sargent, R. J. Crawford, Jr., and W. V. Thayne. 1986. Fermentation of high concentrate diets as affected by ruminal pH and digesta flow. *J. Dairy Sci.* 69: 413-419.
- SIAP-SAGARPA. 2014. Sistema de información agroalimentaria de consulta. www.siap.gob.mx Visitado 15 de abril de 2016.
- Singh, S., B. P. Kushwaha, S.K. Nag, A. K. Mishara, A. Singh, and U. Y Anele. 2012. In vitro ruminal fermentation, protein and carbohydrate fractionation, methane production and prediction of twelve commonly used Indian green forages. *Anim. Feed Sci. Tech.* 178: 2-11.
- Steel R., G., D., y J. Torrie J. 1992. Bioestadística, principios y procedimientos. 2^{da} Edición. México. Editorial McGraw-Hill book Co. New York. 622 p.
- Stockes, S. R. 1997. Balancing carbohydrates for optimal rumen function and animal health. <http://www.wcds.ca/proc/1997/>. Visitado el 14 de noviembre de 2016.
- Storm, A. C., and N. B. Kristensen. 2010. Effects of particle size and dry matter content of a total mixed ratio on intraruminal equilibration and net portal flux of volatile fatty acid in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93: 4223-4238.
- Taylor, A., C., C., K. 1996. A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 56: 49-58.
- Tilley, J. M., and R. A. Terry. 1963. A two stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *J. Br. Grassl. Soc.* 18: 104-111.

- Valdiveloo, J., and W. Holmes. 1979. The effects of forage digestibility and concentrate supplementation on the nutritive value of the diet and performance of finishing cattle. *Anim. Prod.* 29: 121-129.
- Van Gastelen, S., E. C. Antunes-Fernandes, K. A. Hettinga, G. Klop, S. J. J. Alferink, W. H. Hendriks, and J. Dijkstra. 2015. Enteric methane production, rumen volatile fatty acid concentrations, and milk fatty acid composition in lactating Holstein-Friesian cows fed grass silage- or corn silage-based diets. *J. Dairy Sci.* 98 (3): 1915-1927.
- Van Middelaar, C. E., J. Dijkstra, P. B. M. Berentsen, and J. M. De Boe. 2013. Cost effectiveness of feeding strategies to reduce greenhouse gas emissions from dairy farming. *J. Dairy Sci.* 97: 2427-2439.
- Van Soest, P., J. 1994. *Nutritional ecology of the ruminant*. 2nd ed. Ithaca, Cornell University Press. 476 p.
- Villamar A. L., y C. Olivera E. 2005. Situación actual y perspectiva de la producción de leche de bovino en México. SAGARPA, 39 p.
- Vogel, K. P., J. F. Pedersen, S. D. Masterson, and J. J. Toy. 1999 Evaluation of a filter bag system for NDF, ADF, and IVDMD forage analysis. *Crop Sci.* 39: 276-279.
- Weimer, P., J. 1998. Manipulating ruminal fermentation: A microbial ecology perspective. *J. Anim. Sci.* 76: 3114-3122.
- Wells, J. E., D. O. Krause, and T. R. Callaway. 1997. Bacteriocin-mediated antagonism by ruminal lactobacilli against *Streptococcus bovis*. *Fed. European Microbiol. Soc.* 22: 237.
- Williams, B., A. 2000. Cumulative gas-production techniques for forage evaluation. In: D. I. Givens, E. Owen, R. F. E. Axford and H. M. Omed (eds). *Forage Evaluation in Ruminant Nutrition*. Wallingford, U. K., 189 p.
- Williams, C. M., J. S. Eun, J. W. MacAdam, A. J. Young, V. Felner, and B. R. Min. 2011. Effects of forage legumes containing condensed tannins of methane and ammonia production in continuous cultures of mixed ruminal microorganisms. *Anim. Feed Sci. Technol.* 167: 364-372.
- Xu, K., H. Lui, and J. Chen. 2010. Effect of classic methanogenic inhibitors on the quantity and diversity of archaea community and the reductive homoacetogenic activity during the process of anaerobic sludge digestion. *Biores. Tech.* 101: 2600-2607.
- Yan, T., M. G. Porter, and C. S. Mayne. 2009. Prediction of methane emission from beef cattle using data measure in indirect open-circuit respiration calorimeters. *J. Anim. Biosci.* 3: 1455-1462.

- Yokohama M. T. y K. Johnson A. 1988. Microbiología del rumen e intestino en el ruminante. Fisiología digestiva y nutrición. C. D. Church (Ed.) Editorial Acribial. Zaragoza, España. pp: 137-158.
- Zhou, M., E. Hernandez, and L. L. Guan. 2010. Characterization of variation in rumen methanogenic communities under different dietary and host feed efficiency conditions, as determined by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis analysis. *Appl. Env. Microbiol.* 76: 3776-3786.