



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

CARACTERIZACIÓN DEL POTENCIAL DE PRODUCCIÓN DE METANO
DE DIFERENTES INGREDIENTES UTILIZADOS EN LA ELABORACIÓN
DE DIETAS PARA RUMIANTES

MAYRA ILIANA RIVAS MARTÍNEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO.

2015

La presente tesis, titulada: **Caracterización del potencial de producción de metano de diferentes ingredientes utilizados en la elaboración de dietas para rumiantes**, realizada por la alumna: **Mayra Iliana Rivas Martínez**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA

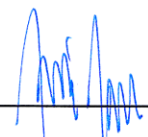
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



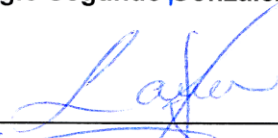
Dr. Mario Antonio Cobos Peralta

ASESOR:



Dr. Sergio Segundo González Muñoz

ASESOR:



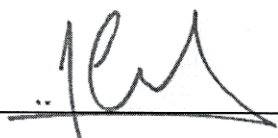
Dr. José Ricardo Bárcena Gama

ASESOR:



Dra. Irma Fabiola Ramírez Hernández

ASESOR:



Dr. Alejandro Ley De Coss

Montecillo, Texcoco, México, febrero de 2015

AGRADECIMIENTOS

A Dios: por haberme permitido llegar a este momento de mi vida. "Todo lo puedo en aquél que me fortalece".

Al CONACYT: Por haberme apoyado económicamente en los cuatro años de mis estudios de Doctorado

Al Dr. Mario Cobos Peralta: por el apoyo y confianza que me brindo durante mi estancia en el Colegio de Postgraduados.

A los integrantes del Consejo Particular: Dr. Sergio González Muñoz, Dr. Ricardo Bárcena Gama, Dra. Irma Fabiola Ramírez Hernández y al Dr. Alejandro Ley de Coss, por las aportaciones que cada uno hizo para la realización de la tesis y para mejorar el documento escrito.

A mis compañeros y Amigos del Laboratorio de Microbiología ruminal: Guadalupe, Felipe, Iván, Paulino, José Carlos y al Señor Agustín, por el apoyo que me brindaron durante mis experimentos.

Al Dr. Ezequías Castillo, por su apoyo en la revisión de los resúmenes en inglés.

DEDICATORIAS

Esta tesis está dedicada principalmente a mis Padres, Roberto y Febronia, por haberme dado la vida y por confiar en mí en cada momento, a mis hermanas Rosalina, Paola y Vero, por su amistad y apoyo incondicional, a mis sobrinos Cristian, Kevin Daniel, Dylan y Ximena por ser uno de mis motivos para salir adelante, y a Alberto por estar conmigo en los momentos difíciles de mi vida y apoyarme a superar cada una de mis metas.

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIAS	iv
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
2.1 Impacto ambiental de los sistemas de producción de rumiantes	5
2.1.1 Gases efecto invernadero provenientes de la ganadería en México	5
2.2 Microorganismos sintetizadores de CH ₄ en rumen	6
2.2.1 Características de las arqueobacterias metanogénicas del rumen	7
2.2.2 Importancia de las arqueas metanogénicas en la cadena trófica del rumen	7
2.3 Fermentación ruminal y producción de metano (bioquímica y metabolismo).....	8
2.3.1 Importancia de los AGV en la producción de CH ₄	9
2.3.2 Implicaciones de la fermentación ruminal y la síntesis de CH ₄	10
2.4 Importancia de la alimentación de rumiantes en la producción de CH ₄	11
2.4.1 Alimentación de rumiantes con forrajes.....	11
2.4.2 Alimentación de rumiantes con concentrados	12
2.5 Métodos de mitigación de las emisiones de CH ₄ en rumiantes.....	13
2.5.1 Inhibición directa de la producción de CH ₄ en el rumen	13
2.5.2 Uso del hidrógeno ruminal en productos alternativos	14
2.5.3 Disminución de la producción de hidrógeno en el rumen	15
2.6 Uso de estrategias nutricionales para reducir la producción de CH ₄	16
2.6.1 Selección de ingredientes.....	17
2.6.2 Incremento de la tasa de pasaje.....	17
2.6.3 Uso de dietas de mayor calidad nutricional	18
Literatura citada	20
3. EXPERIMENTO I. COMPARACIÓN <i>in vitro</i> DEL POTENCIAL DE BIOGÁS, CH ₄ , CO ₂ Y OTRAS VARIABLES QUÍMICO-FERMENTATIVAS DE SEIS PASTOS TEMPLADOS Y SEIS TROPICALES	28
3.1 RESUMEN	28

3.2	Introducción.....	30
3.3	Objetivo general	32
3.3.1	Objetivos particulares	32
3.4	Materiales y métodos	32
3.4.1	Establecimiento del experimento.....	32
3.4.2	Medición de variables fermentativas y microbiológicas	34
3.4.3	Diseño experimental y análisis estadístico	35
3.5	Resultados	36
3.5.1	Variables químico-fermentativas y microbiológicas	37
3.5.2	Producción de biogás acumulado por gramo de MS	40
3.5.3	Producción de CH ₄ acumulado por gramo de MS	41
3.5.4	Producción de CO ₂ acumulado por gramo de MS	42
3.6	Discusión	44
3.7	Conclusiones.....	46
	Literatura citada	46
4.	EXPERIMENTO II. COMPARACIÓN <i>in vitro</i> DEL POTENCIAL DE PRODUCCIÓN DE BIOGÁS, CH ₄ , CO ₂ Y OTRAS VARIABLES QUÍMICO- FERMENTATIVAS DE SEIS GRANOS.....	49
4.1	RESUMEN	49
4.2	Introducción.....	51
4.3	Objetivo general	52
4.4	Objetivos particulares.....	52
4.5	Hipótesis	52
4.6	Materiales y métodos	52
4.6.1	Material a evaluar y tratamientos.....	52
4.6.2	Análisis químico de los granos	52
4.6.3	Producción de biogás	53
4.6.4	Trampa de captura de biogás.....	53
4.6.5	Instalación de la técnica de producción de biogás <i>in vitro</i>	53
4.6.6	Medición de biogás y cuantificación de CH ₄ y CO ₂	54
4.6.7	Medición de pH.....	54

4.6.8	Evaluación de la degradación <i>in vitro</i> de la MS	55
4.6.9	Cuantificación de AGV.....	55
4.6.10	Conteo de bacterias totales y celulolíticas	55
4.7	Resultados	57
4.7.1	Análisis químico de los granos evaluados	57
4.7.2	Variables de producción de biogás	57
4.7.3	Variables químico-fermentativas	61
4.8	Discusión	63
4.9	Conclusiones.....	65
	Literatura citada	65
5.	EXPERIMENTO III. EVALUACIÓN <i>in vitro</i> DEL POTENCIAL DE PRODUCCIÓN DE CH ₄ Y OTRAS VARIABLES QUÍMICO-FERMENTATIVAS DE SEIS LEGUMINOSAS.....	67
5.1	RESUMEN	67
5.2	Introducción.....	69
5.3	Objetivo general	70
5.3.1	Objetivos particulares	70
5.4	Hipótesis	70
5.5	Materiales y métodos	70
5.5.1	Ubicación geográfica del estudio	70
5.5.2	Material evaluado	70
5.5.3	Medio de cultivo para bacterias totales.....	71
5.5.4	Preparación de la trampa de captura de biogás	71
5.5.5	Inoculación de los medios de cultivo y montaje del sistema de producción de biogás <i>in vitro</i>	72
5.5.6	Producción de biogás	72
5.5.7	pH.....	73
5.5.8	Degradación <i>in vitro</i> de la MS.....	73
5.5.9	Concentración molar de AGV	73
5.5.10	Concentración de bacterias totales y celulolíticas	74
5.5.11	Análisis estadístico.....	75
5.6	Resultados	75

5.6.1	Análisis químico.....	75
5.6.2	Variables químico-fermentativas	76
5.6.3	Producción de biogás	78
5.7	Discusión	81
5.8	Conclusiones.....	82
	Literatura citada	83
6	. EXPERIMENTO IV. EVALUACIÓN DEL POTENCIAL <i>in vitro</i> DE PRODUCCIÓN DE BIOGÁS TOTAL, CH ₄ , CO ₂ Y VARIABLES QUÍMICO-FERMENTATIVAS DE SEIS ESQUILMOS AGRÍCOLAS	86
6.1	Resumen.....	86
6.2	Introducción.....	88
6.3	Objetivo general	89
6.3.1	Objetivos particulares	89
6.4	Hipótesis	89
6.5	Materiales y métodos	89
6.5.1	Ubicación del experimento	89
6.5.2	Material evaluado y tratamientos.....	90
6.5.3	Análisis químico de los ingredientes.....	90
6.5.4	Medio de cultivo para bacterias totales.....	90
6.5.5	Preparación de la trampa de captura de biogás	91
6.5.6	Inoculación de los medios de cultivo y montaje del sistema de producción de biogás	91
6.5.7	Producción de biogás	91
6.5.8	pH.....	92
6.5.9	Degradación <i>in vitro</i> de la MS.....	92
6.5.10	Concentración molar de ácidos grasos volátiles	93
6.5.11	Concentración de bacterias totales y celulolíticas	93
6.5.12	Diseño experimental y análisis estadístico	94
6.6	Resultados	94
6.6.1	Análisis químico de los esquilmos agrícolas.....	94
6.6.2	Producción de biogás total <i>in vitro</i> por cada 100 g de MS.....	95
6.6.3	Producción de CH ₄ y CO ₂ por cada 100 g de MS.....	95

6.6.4	CH ₄ y CO ₂ por cada 100 M de biogás	96
6.6.5	Variables químico fermentativas.....	98
6.7	Discusión	100
6.8	Conclusiones.....	101
	Literatura citada	101
7.	EXPERIMENTO V. EVALUACIÓN DEL POTENCIAL <i>in vitro</i> DE PRODUCCIÓN DE BIOGÁS, CH ₄ , CO ₂ Y VARIABLES QUÍMICO-FERMENTATIVAS DE SIETE PASTAS DE OLEAGINOSAS	104
7.1	Resumen.....	104
7.2	Introducción.....	106
7.3	Objetivo general.....	107
7.3.1	Objetivos particulares.....	107
7.4	Hipótesis	107
7.5	Materiales y métodos	107
7.5.1	Ubicación del experimento	107
7.5.2	Material evaluado y tratamientos.....	107
7.5.3	Análisis químico de los ingredientes.....	108
7.5.4	Medio de cultivo para bacterias totales.....	108
7.5.5	Preparación de la trampa de captura de biogás	108
7.5.6	Inoculación de los medios de cultivo y montaje del sistema de producción de biogás	109
7.5.7	Producción de biogás	109
7.5.8	pH.....	110
7.5.9	Degradación <i>in vitro</i> de la Materia seca (MS).....	110
7.5.10	Concentración molar de AGV.....	110
7.5.11	Concentración de bacterias totales y celulolíticas	111
7.5.12	Diseño experimental y análisis estadístico	112
7.6	Resultados	112
7.6.1	Análisis químico.....	112
7.6.2	Producción de biogás total <i>in vitro</i> por cada 100 g de MS.....	113
7.6.3	Concentración molar de CH ₄ y CO ₂ por cada 100 g de MS	114

7.6.4	Concentración molar de CH ₄ y CO ₂ por cada 100 M de biogás de siete pastas de oleaginosas	115
7.6.5	Variables químico fermentativas.....	116
7.6.6	Variables microbiológicas	117
7.7	Discusión	118
7.8	Conclusiones.....	119
	Literatura citada	119
8.	EXPERIMENTO VI. EVALUACIÓN <i>in vitro</i> DE CUATRO DIETAS CON ALTO Y BAJO POTENCIAL DE PRODUCCIÓN DE CH ₄ PARA CORDEROS EN FINALIZACIÓN	122
8.1	RESUMEN	122
8.2	Introducción.....	124
8.3	Materiales y métodos	125
8.3.1	Diseño experimental y tratamientos	125
8.3.2	Selección de ingredientes.....	125
8.3.3	Análisis químico de ingredientes y formulación de dietas.....	125
8.3.4	Producción de biogás	126
8.3.5	Determinación de CH ₄ y CO ₂	128
8.3.6	Cuantificación de AGV.....	129
8.3.7	Determinación de variables microbiológicas.....	129
8.3.8	Medición de pH.....	130
8.3.9	Degradación <i>in vitro</i> de la MS.....	130
8.3.10	Análisis y modelo estadístico	130
8.4	Resultados	131
8.4.1	Variables químico fermentativas.....	131
8.4.2	Variables microbiológicas	132
8.4.3	Concentración molar de biogás, CH ₄ y CO ₂	133
8.5	Discusión	138
8.6	Conclusiones.....	139
	Literatura citada	139
9.	CONCLUSIONES GENERALES.....	142
	ANEXO 1	143

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Emisiones de GEI para 2010 en México	6
Cuadro 2. Ácidos grasos volátiles producidos por la fermentación ruminal	9
Cuadro 3. Componentes del medio de cultivo fluido ruminal-sustrato	33
Cuadro 4. Análisis químico de pastos templados y tropicales.....	37
Cuadro 5. pH y DIVMS a las 72 h de fermentación de seis pastos templados y seis tropicales	38
Cuadro 6. Ácidos grasos volátiles producidos por pastos a 72 h de fermentación	39
Cuadro 7. Concentración de bacterias totales y celulolíticas de pastos templados y tropicales	40
Cuadro 8. Producción de biogás acumulado (mL) de pastos	41
Cuadro 9. Producción de CH ₄ acumulado de pastos a 72 h de fermentación	42
Cuadro 10. Producción de CO ₂ acumulado (mL) de pastos	43
Cuadro 11. Producción de CH ₄ y CO ₂ por cada 100 M de biogás producidos de pastos	44
Cuadro 12. Análisis químico de seis granos	58
Cuadro 13. Concentración molar de biogás acumulado por 100 g de MS en seis granos	59
Cuadro 14. Concentración molar de CH ₄ y CO ₂ acumulados por 100 g de MS en seis granos	60
Cuadro 15. Concentración molar de CH ₄ y CO ₂ por cada 100 M de biogás producidos, de seis granos.....	61
Cuadro 16. pH y Degradación <i>in vitro</i> de la materia seca de seis granos	62
Cuadro 17. Concentración molar de ácidos grasos volátiles en seis granos	62
Cuadro 18. Concentración de bacterias totales y celulolíticas a las 72 h de fermentación de seis granos	63
Cuadro 19. Análisis químico de seis leguminosas (tratamientos)	76
Cuadro 20. pH y degradación <i>in vitro</i> de la MS de seis leguminosas (tratamientos)	76
Cuadro 21. Concentración de bacterias totales y celulolíticas en seis leguminosas (tratamientos)	77

Cuadro 22. Producción de ácidos grasos volátiles de leguminosas.....	78
Cuadro 23. Concentración molar de biogás, CH ₄ y CO ₂ acumulados, por cada 100 g de MS.....	79
Cuadro 24. Producción de CH ₄ y CO ₂ por cada 100 g de biogás producido.....	80
Cuadro 25. Composición química de seis esquilmos agrícolas	95
Cuadro 26. Concentración molar de biogás acumulado por 100 g de MS de esquilmos agrícolas.....	96
Cuadro 27. Concentración molar de CH ₄ y CO ₂ acumulados por 100 g de MS en seis esquilmos agrícolas.....	97
Cuadro 28. Concentración molar de CH ₄ y CO ₂ por cada 100 M de biogás producido en esquilmos agrícolas.....	98
Cuadro 29. Variables químico fermentativas de esquilmos agrícolas	99
Cuadro 30. Población de bacterias totales y celulolíticas de seis esquilmos agrícolas.	99
Cuadro 31. Análisis químico de siete pastas de oleaginosas.....	113
Cuadro 32. Concentración molar de biogás acumulado de siete pastas de oleaginosas a 72 h de fermentación.....	113
Cuadro 33. Concentración molar de CH ₄ y CO ₂ acumulados por 100 g de MS en siete pastas de oleaginosas.....	114
Cuadro 34. Concentración molar de CH ₄ y CO ₂ por cada 100 M de biogás producido de siete pastas de oleaginosas	116
Cuadro 35. Variables químico fermentativas de siete pastas de oleaginosas.....	117
Cuadro 36. Población de bacterias totales y celulolíticas en siete pastas.....	118
Cuadro 37. Dietas evaluadas <i>in vitro</i> para corderos en crecimiento	127
Cuadro 38. Variables químico-fermentativas de cuatro dietas con alto y bajo potencial de producción de CH ₄	132
Cuadro 39. Concentración de bacterias totales y celulolíticas en cuatro dietas.....	133
Cuadro 40. Concentración molar de biogás acumulado de cuatro dietas con alto y bajo potencial de producción de CH ₄	135
Cuadro 41. Concentración molar de CH ₄ en cuatro dietas con alto y bajo potencial de producción de CH ₄	136

Cuadro 42. Concentración molar de CO ₂ en cuatro dietas con alto y bajo potencial de producción de CH ₄	137
---	-----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cadena trófica del rumen.....	8
Figura 2. Producción de biogás <i>in vitro</i> de granos	58
Figura 3. Comportamiento de producción de biogás <i>in vitro</i> de cuatro dietas.....	134
Figura 4. Biogás <i>in vitro</i> a 24, 48 y 72 h de cuatro dietas	143
Figura 5. CH ₄ <i>in vitro</i> a 24, 48 y 72 h de cuatro dietas.....	144
Figura 6. CO ₂ <i>in vitro</i> a 24,48 y 72 h de cuatro dietas.....	145

CARACTERIZACIÓN DEL POTENCIAL DE METANO DE DIFERENTES INGREDIENTES UTILIZADOS EN LA ELABORACIÓN DE DIETAS PARA RUMIANTES

Mayra Iliana Rivas Martínez, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2015

RESUMEN

El potencial de producción de metano (CH_4) *in vitro* fue evaluado en seis grupos de ingredientes usados en la alimentación de rumiantes. Los grupos fueron: pastos templados y tropicales, granos, leguminosas, esquilmos agrícolas y pastas de oleaginosas. Después, los ingredientes identificados con bajo y alto potencial de producción de CH_4 fueron usados para formular cuatro dietas para borregos en crecimiento. La evaluación del potencial de CH_4 de los ingredientes y de las dietas se realizó utilizando la técnica de producción de biogás *in vitro* con un medio de cultivo para bacterias ruminales. La proporción de CH_4 y CO_2 fue analizada por cromatografía de gases. Los ingredientes con mayor ($P < 0.05$) potencial de CH_4 fueron: maíz amarillo Ixcamilpa, alfalfa var. *Atlixco*, pasto King grass, pasto festuca y pasta de soya, y los que tuvieron menor ($P < 0.05$) potencial de producción de CH_4 fueron: maíz amarillo Cordillera Tres Encinos, alfalfa var. *Oaxaca*, pasto ovillo, y pasta de ajonjolí tostado. El análisis de los resultados indica que la metodología usada para evaluar el potencial de CH_4 , es adecuada para ingredientes comúnmente usados en la alimentación de rumiantes. Sin embargo, la formulación de dietas para borregos con base a la selección de ingredientes con bajo potencial de emisiones de CH_4 *in vitro*, no disminuyó ($P > 0.05$) la producción de este gas en pastos templados, pero sí redujo ($P < 0.05$) la producción de biogás, en comparación con la dietas formuladas con ingredientes con alto potencial de CH_4 . Por lo tanto, se concluye que la metodología usada para determinar la producción de biogás y de CH_4 *in vitro* puede ser útil como parte de las estrategias alimenticias para reducir las emisiones de gases efecto invernadero generados por la fermentación entérica de los rumiantes.

Palabras clave: CH_4 , ácidos grasos volátiles, gases efecto invernadero, rumen, *in vitro*.

CHARACTERIZATION OF METHANE POTENTIAL OF DIFFERENT INGREDIENTS USED IN DIETS FOR RUMINANTS

Mayra Iliana Rivas Martínez, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2015

ABSTRACT

The methane (CH₄) potential of six groups of feedstuffs for feeding ruminants was evaluated *in vitro*. These groups were: temperate grasses, tropical grasses, grains, legumes, agricultural byproducts and oilseed meals. The feedstuffs were classified according to its low or high CH₄ potential and used to formulate four diets for growing lambs. The CH₄ potential of all the feedstuffs and diets was evaluated by means of an *in vitro* technique for biogas measurement in a culture medium for rumen bacteria. The CH₄ and CO₂ rate was analyzed by gas chromatography. The feedstuffs with higher (P<0.05) CH₄ potential were: yellow corn Ixcamilpa, alfalfa var. Atlixco, King grass, fescue grass, and soybean meal, and those with the lower (P<0.05) CH₄ potential were: yellow corn Cordillera Tres Encinos, alfalfa var. Oaxaca, Orchard grass and toasted sesame meal. The analysis of the results indicate that the methodology used to estimate the potential of CH₄, is suitable for assessing ingredients commonly used for feeding ruminants. However, formulating diets for lambs, based on the selection of feedstuffs with low potential for methane emissions, did not decrease (P>0.05) this gas in temperate grasses, but the production of biogas was reduced, as compared to the diets formulated with feedstuffs high in CH₄ potential. Therefore, it is concluded that the *in vitro* methodology used for biogas and methane estimation may be useful as part of the nutritional strategies to reduce greenhouse gas emissions generated by enteric fermentation

Key words: CH₄, volatile fatty acids, greenhouse gases, rumen, *in vitro*

1. INTRODUCCIÓN

El sistema microbiano del rumen es complejo e involucra bacterias, arqueobacterias, hongos, y protozoarios que interactúan entre sí y con el alimento consumido por el animal hospedero (Wright y Klieve, 2011). Los microorganismos capaces de producir CH₄ pertenecen al Dominio Archaea, son microorganismos anaerobios estrictos, que requieren un ambiente libre de oxígeno y potencial óxido reducción menor que -330 mV (Kamra, 2005). Las Arqueas sólo constituyen una parte pequeña de la biomasa microbiana del rumen, cerca del 8 %, pero son importantes en el funcionamiento del rumen y en la nutrición del animal porque eliminan el exceso de H₂, reduciendo el CO₂ a CH₄ y así mantienen un pH cercano a la neutralidad (Janssen y Kirs, 2008).

La metanogénesis en el rumen puede causar una productividad baja por el gasto de energía que lleva ese proceso y un impacto negativo en la sustentabilidad en la producción de carne y leche (Kumar *et al.*, 2009). Además, contribuye al calentamiento global (Khiaosa-ard, 2014) por las emisiones principalmente de CH₄, por lo cual se buscan estrategias para reducir las. Las estrategias relacionadas con la alimentación están dentro de las más eficientes ya que se modifican las poblaciones microbianas del rumen y, por lo tanto, los productos de la fermentación como ácidos grasos volátiles, CH₄ y CO₂ (Knapp *et al.*, 2014).

La evaluación de ingredientes de las dietas de los rumiantes para determinar la capacidad para producir CH₄ sería una acción de mitigación al cambio climático (Lee *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2012), lo cual se debe a que ingredientes con bajo potencial de producción de CH₄ se pueden utilizar en la formulación de dietas para rumiantes, y así elevar la eficiencia productiva de carne y leche.

El objetivo de estudio presentado en esta tesis fue investigar la producción de CH₄ *in vitro* de grupos de ingredientes usados en la alimentación de rumiantes y la posible aplicación de este potencial para formular dietas con baja producción de CH₄. El primer capítulo es una revisión de literatura que describe la importancia, impacto y metabolismo de la síntesis de CH₄ por los rumiantes, así como los principales métodos

de mitigación, la importancia de las estrategias de alimentación para disminuir las emisiones de CH₄ y aumentar la productividad, y se concluye con la revisión de la importancia de las técnicas de producción de biogás *in vitro* como parte de la evaluación de los ingredientes utilizados en la presente investigación.

En los experimentos del 1 al 5, presentados en los capítulos 3, 4, 5, 6, y 7, se presentan las evaluaciones del potencial de biogás, CH₄, CO₂ y características de fermentación *in vitro* de cinco tipos de ingredientes: pastos, granos, leguminosas, esquilmos agrícolas y pastas de oleaginosas. En el experimento 6 capítulo 8, se presentan los resultados de la evaluación *in vitro* de cuatro dietas para borregos en crecimiento, utilizando los ingredientes con mayor y menor producción de CH₄ usados en los experimentos anteriores.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Impacto ambiental de los sistemas de producción de rumiantes

Las emisiones de CH₄ por los rumiantes son 61 Tg año⁻¹ y derivan principalmente de la fermentación ruminal (Wright y Klieve, 2011), y en menor cantidad por almacenamiento y manejo del estiércol (Van Middelaar *et al.*, 2013). Un bovino adulto produce de 400 a 500 L día⁻¹ de CH₄, lo que varía por el tipo de carbohidratos en la dieta, consumo, tasa de pasaje, presencia de ionóforos o lípidos en la dieta, niveles de concentrado más la influencia de la temperatura ambiental (McAllister *et al.*, 1996; Karakurt *et al.*, 2012). La producción diaria de CH₄ es de 278 a 456 g de CH₄ en vacas estabuladas durante la lactancia (Garnsworthy *et al.*, 2012), 89 a 180 g en vaquillas en crecimiento y 165 a 295 g en vacas adultas en pastoreo (DeRamus *et al.*, 2003), mientras que búfalos, ovinos y cabras producen 137, 219 y 13.7 g por animal, respectivamente (Sejian *et al.*, 2011).

La contribución de CH₄ por los rumiantes procede de Asia, Latinoamérica y África y corresponden a 34, 24 y 15 % de las emisiones globales por año, respectivamente. Los diez países que producen más CH₄ son: China (13.9 Tg), Brasil (11.7 Tg), India (11.2 Tg), Estados Unidos (5.5 Tg), Australia (3.1 Tg), Pakistán (3.0 Tg), Argentina (2.9 Tg), Rusia (2.5 Tg), México (2.3 Tg) y Etiopía (1.9 Tg). El 63 % de las emisiones globales derivan de la alimentación en pastizales: 35 Tg de éstas son de bovinos productores de carne, y 9 Tg son de ovejas, cabras, búfalos y camélidos (US EPA, 2006).

2.1.1 Gases efecto invernadero provenientes de la ganadería en México

México está entre los primeros 15 países emisores de gases efecto invernadero (GEI) con 748 Gg CO₂e en el año 2010 y esto es 1.5 % de las emisiones totales anuales. La agricultura contribuyó con 12.3 % (92,184.4 Gg de CO₂e) (Cuadro1), después del sector energético con 67.3 % (503,817.6 Gg CO₂e). El sector ganadero emitió 37, 961.5 Gg CO₂e, debido a la fermentación en los rumiantes y 7,553.5 Gg CO₂e por el manejo del estiércol (INE-SEMARNAT, 2012).

Cuadro 1. Emisiones de GEI para 2010 en México

Sector	Gg CO ₂ equivalente	%
Energía	503,817.6	67.3
Agricultura	46,669.40	6.23
Procesos Industriales	61,226.9	8.2
Cambio de uso de suelo y silvicultura	46,892.4	6.3
Desechos	44,130.8	5.9
Ganadería	45,515.00	6.1
Total	748,252.2	100

Fuente: INE-SEMARNAT, 2012

2.2 Microorganismos sintetizadores de CH₄ en rumen

El sistema microbiano del rumen involucra diferentes especies que interactúan entre sí y con el alimento ingerido por el animal hospedero. En el rumen hay bacterias (10^{10} - 10^{11} mL⁻¹), arqueobacterias (10^7 - 10^9 mL⁻¹), protozoarios (10^4 - 10^6 mL⁻¹), hongos (10^3 - 10^6 mL⁻¹) y virus (10^9 - 10^{10} mL⁻¹) (Wright y Klieve, 2011).

Los arqueobacterias que sintetizan CH₄ (metanógenos) están en el dominio Archaea y se clasifican en los órdenes Metanopyrales, Methanococcales, Methanomicrobiales, Methanosarcinales y Methanobacteriales (Shima *et al.*, 2002). En los hábitats anaerobios, se han identificado alrededor de 70 especies de microorganismos metanogénicos pertenecientes a 21 géneros (Jarvis *et al.*, 2000). Por medio de métodos de biología molecular y gradientes de electroforesis se estudiaron 66 secuencias de metanógenos ruminales y las especies analizadas pertenecen a los órdenes de Methanobacteriales, Methanosarcinales y especies no cultivadas Nicholson *et al.*, 2007). En el rumen sólo siete especies se han cultivado *Methanobrevibacter ruminantium* (Skillman *et al.*, 2006; Janssen y Kirs, 2008), *Methanobrevibacter millerae*, *Methanobrevibacter olleyae* (Rea *et al.*, 2007), *Methanomicrobium mobile*, *Methanoculleus olentangyi*, *Methanosarcina spp* y *Methanobrevibacter smithii* (Janssen y Kirs, 2008).

2.2.1 Características de las arqueobacterias metanogénicas del rumen

Las arqueobacterias metanogénicas forman parte del dominio Archaea que se diferencian del dominio Bacteria por las características únicas en su pared celular la cual está constituida, dependiendo del género, por pseudomureína, proteína, glicoproteína o heteropolisacáridos, que las hacen más resistentes a ambientes extremos como el rumen (McAllister *et al.*, 1996).

Las arqueas metanogénicas del rumen son organismos anaerobios estrictos, y requieren condiciones libres de oxígeno y potencial óxido reducción menor que -330 mV (Kamra, 2005). La mayoría tiene tiempos de duplicación desde horas hasta varios días y sus formas son cocos y bacilos (Sosa *et al.*, 2007). Algunas arqueas del rumen necesitan la coenzima M que interviene en el paso final de la metanogénesis para la transformación del grupo metilo (CH₃) a CH₄, pero otras no la requieren porque pueden sintetizarla, como *Methanobrevibacter* spp (Shima *et al.*, 2002).

Los metanógenos del rumen se encuentran en mayor proporción en la fase líquida, comparada con la fracción sólida del contenido ruminal (Morgavi *et al.*, 2011). La familia *Methanobacteriaceae* son los metanógenos más importantes en el rumen, representan el 89.3 % de las arqueas en el fluido ruminal, de la cual el 99.2 % se encuentra en la fracción del líquido ruminal. Los *Methanomicrobiales*, que abarca a las familias *Methanomicrobiaceae*, *Methanocorpusculaceae* y *Methanospirillaceae*, son la segunda población más importante 10.3 % del total; este grupo es de vida libre (Sharp *et al.*, 1998).

2.2.2 Importancia de las arqueas metanogénicas en la cadena trófica del rumen

Las arqueas metanogénicas son importantes en el funcionamiento del rumen y en la nutrición del rumiante. Estos microorganismos eliminan el exceso de H₂, reduciendo el CO₂ a CH₄, lo que conduce a un patrón nutricionalmente favorable de la formación de AGV y una tasa de fermentación mayor por la eliminación del efecto inhibitor de hidrógeno sobre la fermentación microbiana (Weimer, 1998; Janssen y Kirs, 2008).

2.3 Fermentación ruminal y producción de metano (bioquímica y metabolismo)

La fermentación realizada por bacterias, protozoarios y hongos del rumen, tiene como sustrato principal carbohidratos estructurales (celulosa y hemicelulosa), almidón y proteínas, que son fermentados por microorganismos primarios de la cadena trófica en glucosa y azúcares de cinco carbonos. Estos compuestos son transformados a ácidos grasos volátiles (AGV), principalmente, acético, propiónico, butírico, proteína microbiana, hidrógeno y CO₂ (Figura 1), que constituyen la materia prima para la producción de CH₄ (Weimer, 1998; Madigan *et al.*, 2008).

La fermentación de carbohidratos en el rumen se describe con la siguiente ecuación: 57.5 moles de glucosa = 65 acetato + 20 propionato + 15 butirato + 60 CO₂ + 35 CH₄ + 25 H₂O (Madigan, 2008).

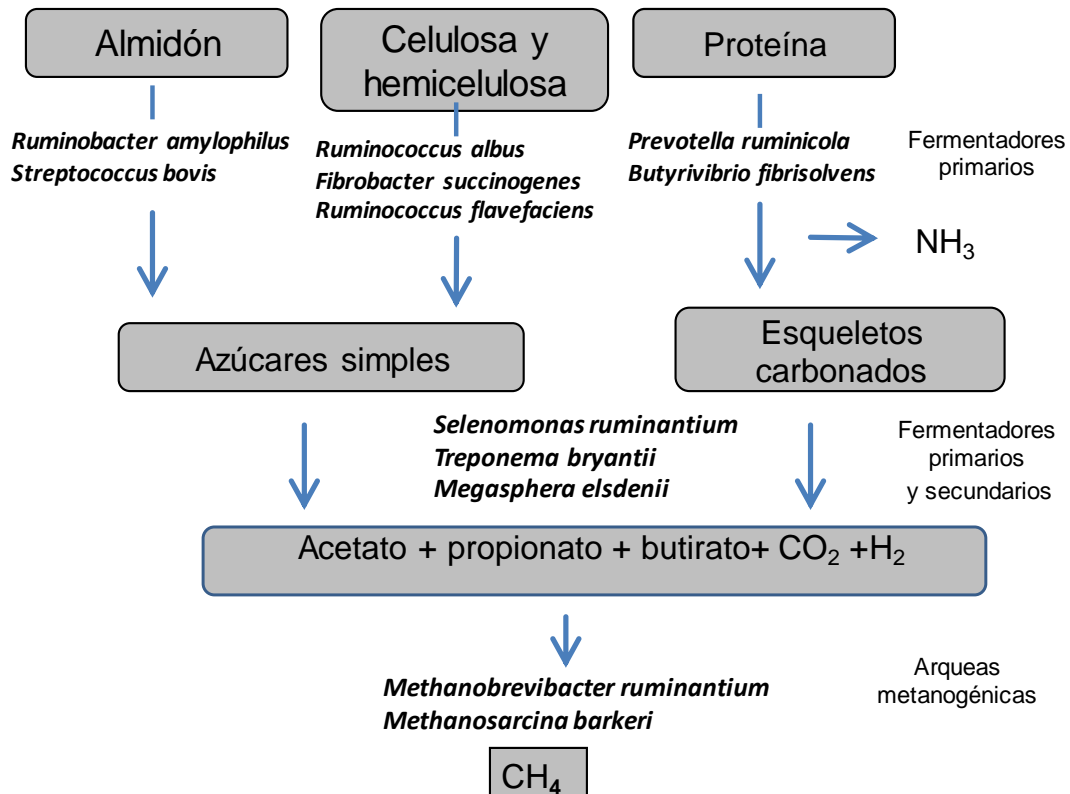


Figura 1. Cadena trófica del rumen (Madigan *et al.*, 2008).

En el rumen las arqueas metanogénicas, las bacterias acetogénicas y las bacterias sulfato reductoras son los tres últimos grupos de microorganismos dentro de la cadena de degradación de los sustratos; la manipulación del tamaño de éstas

poblaciones es benéfica para maximizar el uso de la energía en el rumiante, la eliminación o inhibición de algunas de estas poblaciones requiere mayor participación de las otras dos, por lo cual si se reduce la cantidad de arqueas metanogénicas, se incrementan los otros dos grupos (Miramontes *et al.*, 2010).

En el rumen hay una concentración promedio de 65 % de CO₂ y 35 % de CH₄, pero éstas cantidades varían según la dieta consumida por el animal (Beauchemin *et al.*, 2008). El CH₄ es un producto final de la fermentación de los alimentos, el 15 % de la energía consumida se utiliza para éste proceso y no es aprovechada por el rumiante para la producción (Jonhson y Jonhson, 1995; DeRamus *et al.*, 2003).

2.3.1 Importancia de los AGV en la producción de CH₄

La cantidad de AGV producidos en el rumen depende del tipo y concentración de carbohidratos en la dieta fermentada y del consumo (Calsamiglia y Ferret, 2002). Los AGV (Cuadro 2) son absorbidos por las paredes del rumen y representan la mayor fuente de energía para el rumiante (Janssen y Kirst, 2008).

Cuadro 2. Ácidos grasos volátiles producidos por la fermentación ruminal

Nombre	Estructura
Acético	CH ₃ -COOH
Propiónico	CH ₃ -CH ₂ -COOH
Butírico	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -COOH

El biogás producido en el rumen (CO₂ y CH₄) es derivado directamente de la fermentación microbiana, y es afectado por la composición química de la dieta y la producción de biomasa bacteriana (Lovett *et al.*, 2006).

Las proporciones individuales de AGV están influenciadas por la composición de materia orgánica de la dieta, principalmente por la naturaleza y la tasa de fermentación de carbohidratos, que pueden tener grandes efectos en la producción de CH₄ (Moss *et al.*, 2000). Dietas ricas en almidón favorecen la producción de propionato por unidad de materia orgánica (MO) fermentable en el rumen; de manera contraria, dietas basadas

en forrajes favorecen la producción de acetato e incrementan la producción de CH₄ por unidad de MO fermentable (Johnson y Johnson 1995).

La fermentación del sustrato hasta ácido propiónico produce una menor producción de gas (Blümmel y Ørskov, 1993; Getachew *et al.*, 1998). Al respecto, Martin *et al.* (2010) explican que la producción de ácido acético y butírico en el rumen resulta en una liberación neta de hidrógeno y favorece la producción de CH₄, mientras que la ruta de formación de propionato compite directamente por el uso de hidrógeno en el rumen. Wolin (1960) destaca estas características y calcula por estequiometría la síntesis de CH₄ a partir de la producción de AGV.

2.3.2 Implicaciones de la fermentación ruminal y la síntesis de CH₄

La síntesis de CH₄ por los microorganismos ruminales utiliza energía que el rumiante puede usar durante procesos anabólicos como el crecimiento y desarrollo, así como síntesis de carne y leche (Moss *et al.*, 2000; Beauchemin *et al.*, 2008). Las consecuencias son baja productividad e impacto negativo en la sustentabilidad de la producción de rumiantes (Kumar *et al.*, 2009); además, la producción de CH₄ es un problema de contaminación del ambiente (Khiaosa-ard, 2014).

La relación entre la dieta que consume el animal y la producción de CH₄ implica factores como la fisiología y la microbiota del hospedero, por lo cual comprender la eficiencia y utilización de alimentos asociados a CH₄ es esencial para reducir la incertidumbre en los inventarios de emisiones de gases efecto invernadero (Khiaosa-ard, 2014) y disminuir la energía destinada a la metanogénesis (Sejian *et al.*, 2011). La alimentación para especies de rumiantes produce diferencias en las emisiones de CH₄ y cambian por los ingredientes. Por ejemplo, un torete productor de carne alimentado en praderas produce 0.23 kg CH₄ animal día⁻¹ lo cual corresponde, a una conversión de 7.7 a 8.4 % de la energía total a la producción de este metabolito, y los mismos bovinos alimentados con dietas altamente digestibles (> 40 % carbohidratos de rápida fermentación) producen 0.07 kg CH₄ animal día⁻¹, correspondiente a una conversión de solo 1.9 a 2.2 % de la energía total (Harper *et al.*, 1999).

2.4 Importancia de la alimentación de rumiantes en la producción de CH₄

Cada grupo de alimentos proporciona nutrientes según sus características; la proporción de los productos finales de la fermentación (H₂ y CH₄), también depende del tipo de alimentación (Ramin y Huhtanen, 2013). Y la energía utilizada para producir CH₄ está relacionada negativamente con la calidad de la alimentación, la concentración de grasa en la dieta y cantidad de carbohidratos no fibrosos como almidón y azúcares (Ramin y Huhtanen, 2013), y positivamente con la cantidad de fibra detergente neutro (FDN) (Jentsch *et al.*, 2007).

Los alimentos para rumiantes se dividen en dos grupos: los forrajes y los concentrados; estos últimos se pueden subclasificar en concentrados energéticos y proteínicos. Cada grupo presenta características muy particulares para la alimentación de los rumiantes.

2.4.1 Alimentación de rumiantes con forrajes

Los forrajes se caracterizan por su contenido de fibra alto y se clasifican en pastos de clima templado, tropical, leguminosas y esquilmos agrícolas. Los compuestos más comunes en los forrajes son celulosa, hemicelulosa, lignina, sílice, nitrógeno ligado a la lignina y pectinas (NRC, 2001), y la proporción de ellos cambia su digestibilidad (Kellems y Church, 2002). Forrajes con 20 a 35 % de FDN son más digestibles y aquellos con más FDA y lignina tienen menor digestibilidad, lo cual también se relaciona con la producción de CH₄ (Singh *et al.*, 2012).

Los forrajes se clasifican en plantas C3 y C4 (Archimède *et al.*, 2011). Las plantas adaptadas a los climas templados (C3) almacenan más carbohidratos como almidones que las C4 (de clima tropical) y, además, pueden usar sus carbohidratos de reserva cuando ellas empiezan a crecer después de un corte (Kellems y Church, 2002). Las plantas C4 tienen una tasa y grado mayor de depósito de lignina en los tejidos vegetales, factor que altera el consumo voluntario, la digestión y la producción de CH₄ (Singh *et al.*, 2012). Los pastos C4 tienen mayor potencial de producción de CH₄ que los pastos C3 (Kurihara *et al.*, 1999; McCrabb y Hunter, 1999; Ulyatt *et al.*, 2002).

Según Archimède *et al.* (2011), animales alimentados con plantas C3 producen menos CH₄ que las C4, 30.0 vs 33.7 L por kg de MS consumida, respectivamente.

Las leguminosas son un grupo de forrajes utilizado en la alimentación de rumiantes, evaluadas para reducir la producción de CH₄, en mezclas con gramíneas y de manera individual, porque éstos forrajes tienen taninos condensados o saponinas que inhiben la producción de biogás y de CH₄ (Chanthakhoun *et al.*, 2011; Williams *et al.*, 2011); otra ventaja es la respuesta eficiente del rumiante a la combinación de estos forrajes. Las leguminosas aportan mayor contenido de proteína cruda (PC) y mejoran la relación energía: proteína que incrementa el metabolismo de los nutrientes en el rumen (Niderkorn *et al.*, 2011). Sin embargo, los resultados de experimentos para evaluar las emisiones de CH₄ en leguminosas y gramíneas son inconsistentes, con forrajes individuales o mezclas de ambos tipos, lo cual varía por la concentración de taninos en las leguminosas, a bajas concentraciones no tienen efecto. En un estudio con cabras las emisiones de CH₄ fueron similares entre leguminosas con baja concentración de taninos y pastos (Puchala *et al.*, 2012). Hess *et al.* (2006) reportaron que la alimentación con leguminosas ricas en taninos (25 g de taninos por kg de MS) disminuye las emisiones de CH₄ en 13 % sin afectar la retención de la energía. La mezcla de *Onobrychis viciifolia* con gramíneas reduce la producción *in vitro* de CH₄ y degradación de proteínas, pero tiene un efecto negativo en la digestión de la fibra (Niderkorn *et al.*, 2011).

Otro grupo de forrajes utilizados en la alimentación de rumiantes son los esquilmos agrícolas como pajas y rastrojos, los cuales se utilizan por su bajo costo y su disponibilidad, sin embargo, estos ingredientes se caracterizan por su bajo contenido nutricional y su contenido de lignocelulosa, lo cual está relacionado con un incremento en la producción de CH₄ (Hu y Yu, 2004).

2.4.2 Alimentación de rumiantes con concentrados

Los concentrados son alimentos que contienen energía y nutrientes, se pueden clasificar en los que proporcionan energía, como los granos de cereales, algunos de sus subproductos, raíces, tubérculos, ingredientes líquidos como la melaza, grasas y

aceites y los que proporcionan proteína y contienen más de 20 % de proteína cruda (NRC, 2001). Los ingredientes proteínicos que se utilizan en la alimentación de rumiantes son las semillas de algunas leguminosas y las pastas de oleaginosas; estas últimas son productos de varios cultivos cuyas semillas tienen un alto contenido de aceite (Kellems y Church, 2002), hasta 40 % de PC, con frecuencia componen 20 a 30 % de las dietas para rumiantes y contribuyen a más de la mitad del total de la proteína (Dale, 1996). La pasta de soya es el ingrediente proteínico más utilizado, pero también se usan harinolina, harina de pescado, copra, cacahuates, canola y semillas de girasol.

El aumento en el uso de concentrados en la dieta reduce la proporción de energía que se transforma en CH₄, principalmente por el cambio de los sustratos fermentados de fibra a almidón y la disminución de pH (Beauchemin *et al.*, 2008b) que afecta la concentración de protozoarios, hospederos de las arqueas metanogénicas (Kumar *et al.*, 2013). Sin embargo, estas dietas no son recomendables, porque, para que haya una reducción importante de emisiones de CH₄, las dietas necesitan contener 90 % de concentrado, y estos niveles ponen en riesgo la salud del animal (Kumar *et al.*, 2014).

2.5 Métodos de mitigación de las emisiones de CH₄ en rumiantes

El conocimiento de la ruta que siguen los metanógenos para la reducción de CO₂ a CH₄ permite diseñar estrategias que bloqueen la producción de éste metabolito a diferentes niveles de ésta. Algunas de las estrategias se pueden plantear bajo diferentes escenarios.

2.5.1 Inhibición directa de la producción de CH₄ en el rumen

- Empleo de vacunas: un estudio en Australia sugiere que se puede reducir la metanogénesis en 7.7 % con el uso de vacunas (Wright *et al.*, 2004), pero el impacto solo fue local, debido a la diversidad de comunidades metanogénicas que son influenciadas por la dieta y la localización geográfica (Wright *et al.*, 2007). En Australia y Nueva Zelanda se hicieron investigaciones de la secuencia genómica de las arqueas metanogénicas del rumen, las cuales incluyeron los géneros *Methanobrevibacter*, *Methanobacterium*, *Methanosphaera*, *Methanosarcina* y un grupo del Clúster C de

arqueas no cultivadas (Attwood *et al.*, 2011), lo cual permite la identificación de proteínas que comparten entre si y ser usadas como antígenos en una vacuna anti metanógenos (Buddle *et al.*, 2011).

- Uso de control biológico mediante el uso de bacteriófagos y bacteriocinas, las cuales actúan inhibiendo directa o indirectamente a los metanógenos dejando hidrógeno disponible en el rumen para otros grupos bacterianos que producen ácido acético o propiónico (McAllister y Newbold 2008). Una bacteriocina investigada es la nisina, que tiene aminoácidos residuales, es producida por ciertas cepas de *Lactococcus lacti*. sub especie *lactis*, y su espectro de acción es contra las bacterias Gram positivas, las cuales son las principales bacterias liberadoras de hidrógeno al rumen (Kišidayova *et al.*, 2003).

- Inhibidores de arqueas metanogénicas como el cloroformo y el 2-bromoetanosulfonato (Xu *et al.*, 2010), causan una inmediata reducción de las poblaciones de arqueas metanogénicas; el efecto con el cloroformo dura largos periodos, pero es un compuesto cancerígeno que causa problemas al hígado por lo cual solo se utiliza de manera experimental y es difícil llevarlo a la práctica; el segundo compuesto no tiene efecto a largo plazo porque las poblaciones de arqueas metanogénicas se incrementan paulatinamente (Knight *et al.*, 2011).

2.5.2 Uso del hidrógeno ruminal en productos alternativos

- Acetogénesis: la reducción del CO₂ para síntesis de acetato tiene dos ventajas: abundancia del aceptor de electrones disponibles y la producción de acetato como una fuente de energía utilizable por el rumiante (Weimer 1998; Boadi *et al.*, 2004). Esta alternativa se investigó en borregos inoculados con bacterias acetogénicas con resultados favorables, sustituyendo a las bacterias metanogénicas por acetogénicas (Fonty *et al.*, 2007). Sin embargo, en el rumen las bacterias acetogénicas son poco eficientes porque necesitan mayor concentración de hidrógeno en el rumen (comparado con las arqueas metanogénicas) para reducir el CO₂ (Boadi *et al.*, 2004).

- Uso de ácidos dicarboxílicos: El malato es un ácido dicarboxílico que al ingresar al rumen, se hidrata y se sintetiza fumarato; este último es un aceptor de electrones que puede actuar como un reductor equivalente al CO₂, mientras es transformado a propionato, la principal fuente de energía de los rumiantes y por consiguiente disminuye la producción de CH₄ (Ungerfeld y Forster, 2011).

2.5.3 Disminución de la producción de hidrógeno en el rumen

- Uso de ionóforos: La monensina y la lasalocida son ionóforos que reducen la síntesis de CH₄, permiten el transporte de iones a través de la membrana celular (Chow *et al.*, 1994), y producen un desbalance de energía en las células de bacterias Gram positivas que producen la mayor cantidad de hidrógeno en el rumen (Eckard *et al.*, 2010), y también disminuyen a los protozoarios ciliados que representan el hábitat de 20 % de las arqueas metanogénicas. Pero la reducción de CH₄ por los ionóforos es variable ya que las poblaciones de protozoarios ciliados pueden adaptarse a la presencia de ionóforos presentes en las dietas (Guan *et al.*, 2006). Otro inconveniente del uso de ionóforos es que la dosis empleada, de 10 a 15 ppm, no reduce la síntesis de CH₄ (Grainger *et al.*, 2008), pero a una dosis mayor (25 a 35 ppm), la metanogénesis disminuye hasta 10 % a corto plazo (McGinn *et al.*, 2004) y 7 % a largo plazo (Odongo *et al.*, 2007).

- Desfaunación: La eliminación total o parcial de los protozoarios disminuye la producción de H₂ disponible para los metanógenos, ya que los protozoarios actúan como potentes productores de hidrógeno (Ushida, 2010), y al mismo tiempo, esta alternativa influye en el nicho ecológico de algunos metanógenos haciéndolo poco propicio para su desarrollo (Beauchemin *et al.*, 2008). La Desfaunación reduce la producción de CH₄ en 13 % y se puede llevar a cabo incrementando los niveles de grano en la dieta, con aceites o con extractos de plantas que contienen taninos y saponinas (Machmüller, 2006), que afectan de manera directa a los metanógenos, sin poner en riesgo la vida del animal.

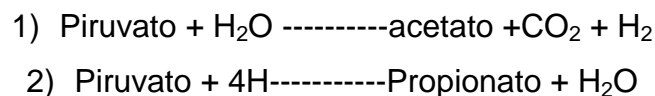
- Uso de ácidos grasos de cadena larga (oleico, linolénico, palmítico y etil-linolenato) que son aceptores de hidrógeno y disminuyen su disponibilidad para las

arqueobacterias metanogénicas. Las fuentes ya evaluadas de estos ácidos son la canola, aceite de coco, aceite de linaza, semilla de girasol y aceite de pescado, y la reducción de la síntesis de CH₄ es de hasta 33 % (Beauchemin *et al.*, 2007; Beauchemin *et al.*, 2009; Mohammed *et al.*, 2011).

- Estrategias nutricionales permiten manipular las comunidades microbianas, estimulando la proliferación de unas y reduciendo otras, a través dietas que cambian el tipo de sustratos disponibles en el rumen, como consecuencia los productos finales del metabolismo como la síntesis de AGV, CH₄ y CO₂ son diferentes (Bonilla y Lemus, 2012).

2.6 Uso de estrategias nutricionales para reducir la producción de CH₄

La manipulación de la nutrición y alimentación del animal hospedero incide en las etapas de la síntesis de CH₄, con reducciones de 2.5 a 15 %, alimentos como los granos o forrajes de buena calidad incrementan la cantidad de propionato y disminuyen el acetato, así reducen el H₂ que puede ser convertido a CH₄, como se muestra en las siguientes ecuaciones (Knapp *et al.*, 2014).



Otras de las ventajas de la manipulación de la alimentación son su simplicidad y factibilidad para llevarla a cabo, porque no se requiere una inversión económica extra para comprar otros productos, y porque se pueden utilizar ingredientes disponibles en cada región lo cual reduciría los costos por la disminución de síntesis de CH₄. La manipulación se puede hacer modificando la nutrición del animal con la composición de la dieta, cantidad de concentrado (Sejian *et al.*, 2011), digestibilidad del alimento (Kulrihara *et al.*, 1997), procesamiento previo del alimento y frecuencia de alimentación (Bonilla y Lemus, 2012). También, las estrategias de alimentación abarcan características que dependen de condiciones como la alimentación en pastoreo o en confinamiento, consumo de alimento, métodos de conservación de forrajes, tipo de forrajes y proporción gramíneas o leguminosas (McCaughy *et al.*, 1999).

Para manipular las comunidades microbianas a través de la dieta se emplean: el uso de ionóforos (McAllister y Newbold, 2008), prebióticos, grasas insaturadas (Machmüller, 2006), granos como cebada (Boadi *et al.*, 2004), uso de forrajes con calidad nutricional, cambio de las proporciones forraje: concentrado (Benchaar *et al.*, 2001), lo cual incide dentro del proceso de síntesis de CH₄ en el rumen.

La mitigación de síntesis CH₄ a través de estrategias nutricionales está fundamentada en tres principios básicos, según Knapp *et al.* (2014), descritos a continuación.

2.6.1 Selección de ingredientes

La finalidad es alterar los patrones de producción de AGV derivados de la fermentación microbiana de carbohidratos (Hook *et al.*, 2010), y cuyas proporciones individuales están influenciadas por la composición de materia orgánica de la dieta, y además la naturaleza y la tasa de fermentación de carbohidratos, lo cual está relacionado con la síntesis de CH₄ (Moss *et al.*, 2000). Otra finalidad de caracterizar ingredientes es identificar aquellos con bajo potencial de síntesis de CH₄, lo cual puede ayudar en la formulación de dietas para rumiantes con este tipo de ingredientes. Al evaluar por incubación *in vitro* a 6 y 24 h 26 ingredientes como granos, salvados y cascarillas, semillas de oleaginosas, forrajes y subproductos de animales, los granos sintetizaron mayor cantidad de CH₄, seguido por salvados y cascarillas, lo cual puede ser causado por la degradabilidad de la fibra y un tiempo limitado de incubación comparada con el extracto libre de nitrógeno el cual se degrada rápido y produce cantidades de gas en un corto tiempo (Lee *et al.*, 2003). En la literatura consultada no se encontraron reportes de este tipo de estudios para México.

2.6.2 Incremento de la tasa de pasaje

Esta estrategia altera las poblaciones microbianas y la producción de AGV. Las propiedades de los forrajes disminuyen la tasa de digestión o prolongan la residencia de las partículas del alimento con el incremento de la síntesis de CH₄ por unidad de forraje digerido (McAllister *et al.*, 1996). Singh *et al.* (2012), evaluaron forrajes utilizados

en India y reportaron que las leguminosas fueron degradadas más lentamente que las gramíneas y los cereales, lo cual puede contribuir a una mayor síntesis de CH₄ después de 48 h de incubación.

2.6.3 Uso de dietas de mayor calidad nutricional

La cantidad de CH₄ emitido por los rumiantes para la producción de carne y leche, es menor cuando se mejora la calidad nutritiva de la dieta, se requiere un número menor de animales para producir la misma cantidad de producto y las emisiones por unidad de carne y leche disminuyen.

Cantidades de granos altas en las dietas (> 90 % de concentrado) reducen la energía utilizada en la síntesis de CH₄ en 21 % de la energía total (Johnson y Johnson 1995), también se pueden reducir las emisiones de CH₄ de 7 a 40 % incrementando el consumo de MS y la proporción de concentrado en la dieta, en 22 % reemplazando el material fibroso con almidón y en 17 % con la utilización de menos almidón degradable en rumen (Benchaar *et al.*, 2001).

Vacas lecheras alimentadas con dietas altas en concentrado reducen tanto la producción de CH₄ por unidad de consumo de MS, como la tasa de síntesis de CH₄, en comparación con dietas bajas en concentrado (Kl'rihara *et al.*, 1997). El tipo de forraje también influye en la síntesis de CH₄; es menor en rumiantes alimentados con leguminosas comparado con gramíneas (-28 %), y ensilado respecto a heno (-20 %) (Benchaar *et al.*, 2001). Vacas alimentadas en praderas de alfalfa y pasto disminuyeron la energía utilizada para la síntesis de CH₄ comparadas con vacas en pastoreo sólo con gramíneas, 7.1 vs. 9.5 % de la energía total consumida (McCaughey *et al.*, 1999).

2.7 Técnicas de medición de biogás y CH₄

La importancia de estimar las emisiones de CH₄ en rumiantes, su importancia en el calentamiento global, y la evaluación de métodos para disminuir estas emisiones de gases efecto invernadero, son un incentivo para el desarrollo de estudios científicos con la finalidad de identificar dietas a base de forraje con bajo potencial de CH₄ (Tavendale *et al.*, 2005).

Las emisiones de CH₄ pueden ser medidas usando técnicas *in vitro* e *in vivo*. En las técnicas *in vivo* la utilización de animales y el mantenimiento de ellos para experimentos es caro y los alimentos sólo pueden ser evaluados en dietas balanceadas. Las técnicas *in vitro* son la opción inicial para la investigación (Posada y Noguera, 2005; López y Newbold, 2007), son más baratas, se pueden evaluar diferentes ingredientes individuales, así como dietas balanceadas. Los estudios *in vitro* se usan más, debido a las ventajas en análisis cortos de cinética de fermentación y cinética de digestión de las fracciones soluble e insoluble de los alimentos (Getachew, 1998), además permiten evaluar inhibidores potenciales, así como los efectos de aditivos en los metanógenos, de manera rápida y simultánea (López y Newbold, 2007).

Posada y Noguera (2005) describen tres formas de medir el gas producido durante la fermentación: 1) Medir el volumen de gas a presión atmosférica constante, 2) medir la presión de gas a un volumen fijo, y 3) medir el número de incrementos de volumen requeridos para causar un pequeño cambio definido en la presión cuando se mide el volumen de gas a presión constante. Estas mediciones se llevan a cabo con transductores de presión, o sensores y estos pueden ser manuales, semiautomáticos, o automáticos (Rymer *et al.*, 2005). Sin embargo, con estas técnicas solo se puede medir el biogás total, sin importar la composición del mismo, por lo que es necesario el uso de técnicas más completas que den información de la proporción y caracterización de los principales gases (CH₄ y CO₂) que forman el biogás producido, para estimar el efecto de diferentes alimentos ingeridos por el rumiante en las emisiones de CH₄ al ambiente.

Aunque se conocen técnicas para medir las emisiones de CH₄ *in vivo* (por ejemplo, jaulas metabólicas), el método de cromatografía de gases es muy útil para ensayos *in vitro*. Mediante cromatografía de gases y un detector de conductividad térmica, se identifican las proporciones individuales de CH₄ y CO₂ de una muestra de biogás producido en un biofermentador o en un tubo de cultivo. Los componentes de la mezcla gaseosa son separados y cada componente es identificado por su tiempo de retención en la columna. La desventaja principal es el costo del gas helio usado como fase móvil (López y Newbold, 2007). Por lo tanto, la técnica de producción de biogás *in vitro* mide el volumen de biogás total y la de cromatografía de gases la proporción de

CH₄ y CO₂; al complementar ambas se puede dar información detallada del potencial de producción de CH₄ y CO₂ de ingredientes o de dietas completas utilizadas en la alimentación de rumiantes.

Literatura citada

- Archimède, H., M. Eugène, C. M. Magdeleine, M. Boval, C. Martin, D. P. Morgavi, P. Lecomte and M. Doreau. 2011. Comparison of methane production between C3 and C4 grasses and legumes. *Animal Feed Science and Technology*. 166–167: 59– 64.
- Attwood, G. T., E. Altermanna, W. J. Kellya, S. C. Leahyab, L. Zhangcd, M. Morrison. 2011. Exploring rumen methanogen genomes to identify targets for methane mitigation strategies. *Animal Feed Science and Technology*. 166–167: 65–75.
- Beauchemin, K. A., D. M. Kreuzer, F. O'MaraC, T. A. McAllister. 2008a. Nutritional management for enteric methane abatement: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 48: 21-27.
- Beauchemin, K. A., S. M. McGinn, C. Grainger. 2008b. Reducing methane emissions from dairy cows. *WCDS Advances in Dairy Technology*. 20:79-93.
- Beauchemin, K. A., S. M. McGinn, H. V. Petit. 2007. Methane abatement strategies for cattle: lipid supplementation of diets. *Canadian Journal of Animal Science*. 87: 431-440.
- Beauchemin, K. A., S. M. McGinn, C. Benchaar, L. Holtshausen. 2009. Crushed sunflower, flax, or canola seeds in lactating dairy cow diets: effects on methane production, rumen fermentation, and milk production. *Journal of Dairy Science*. 92: 2118-2127.
- Benchaar, C., C. Pomar, J. Chiquette. 2001. Evaluation of dietary strategies to reduce methane production in ruminants: a modelling approach. *Canadian Journal Animal Science*. 81: 563-574.
- Blümmel, M., Ørskov, E. 1993. Comparison of gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. *Animal Feed Science and Technology*. 40: 109-119.
- Boadi, D., C. Benchaar, J. Chiquette, D. Masse. 2004. Mitigation strategies to reduce enteric methane emissions from dairy cows: Update review. *Canadian Journal of Animal Science*. 84: 319-335.

- Bonilla J. A. C y F. C Lemus. 2012. Emisión de metano entérico por rumiantes y su contribución al calentamiento global y al cambio climático. *Revista Mexicana de Ciencia Pecuaria*. 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, D. N. Wedlock. 2011. Strategies to reduce methane emissions from farmed ruminants grazing on pasture. *The Veterinary Journal*. 188: 11–17.
- Calsamiglia S., 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.
- Chanthakhoun V., M. Wanapat, C. Wachirapakorn, S. Wanapat. 2011. Effect of legume (*Phaseolus calcaratus*) hay supplementation on rumen microorganisms, fermentation and nutrient digestibility in swamp buffalo. *Livestock Science*. 140: 17–23.
- Dale N. 1996. Variation in feed ingredient quality: oilseed meals. *Animal Feed Science and Technology*. 59: 129-135.
- Eckard R. J., C. Grainger, C. A. M. de Klein. 2010. Options for the abatement of methane and nitrous oxide from ruminant production: A review. *Livestock Science*. 130: 47–56.
- Fonty, G., K. Joblin, M. Chavarot, R. Roux, G. Naylor, F. Michallon. 2007. Establishment and development of ruminal hydrogenotrophs in methanogen-free lambs. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(20): 6391-6403.
- Garnsworthy, P. C., J. Craigon, J. H. Hernandez-Medrano, N. Saunders. 2012. Variation among individual dairy cows in methane measurements made on farm during milking. *Journal of Dairy Science*. 95(6):3181-3189.
- Getachew, G., M. Blümmel, H. P. Makkar, K. Becker. 1998. *In vitro* measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Animal Feed Science and Technology*. 72: 261-281.
- Grainger, C., M. J. Auldist, T. Clarke, K. A. Beauchemin, S. M. McGinn, M. C Hannah, R. J Eckard, L. B Lowe. 2008. Use of monensin controlled-release capsules to reduce methane emissions and improve milk production of dairy cows offered pasture supplemented with grain. *Journal of Dairy Science*. 91: 1159–1165.

- Guan, H., K. M Wittenberg, K. H. Ominski, D. O Krause. 2006. Efficacy of ionophores in cattle diets for mitigation of enteric methane. *Journal of Animal Science*. 84(7):1896-1906.
- Harper, L. A., O. T. Denmead, J. R. Freney, F. M. Byers. 1999. Direct Measurements of methane emissions from grazing and feedlot Cattle. *Journal of Animal Science*. 77: 1392–1401.
- Hess, H. D., T. T. Tiemann, F. Noto, J. E. Carulla, M. Kruezer. 2006. Strategic use of tannins as means to limit methane emission from ruminant livestock. *In Greenhouse gases and animal agriculture: an update*. Soliva, C. R., Takahashi, J. Kreuzer, M. (Eds.). International Congress Series No. 1293. Elsevier, the Netherlands. Pp. 164-167.
- Hook, S. E., A. Wright, and B. W. McBride. 2010. Review article methanogens: methane producers of the rumen and mitigation strategies. *Archaea*. 1-10.
- Hu, Z.H., Wang, G., Yu, H. Q., 2004. Anaerobic degradation of cellulose by rumen microorganisms at various pH values. *Biochemical Engineering Journal*. 21: 59–62.
- Instituto Nacional de Ecología-Secretaría del medio ambiente y Recursos naturales (INE-SEMARNAT). 2012. México. Quinta Comunicación Nacional ante la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático. México D.F. Pp. 399.
- Janssen, P., H. Kirst. 2008. Structure of the archaeal community of the rumen. *Applied and Environmental Microbiology*. 74(12): 3619-3625.
- Jarvis, G. N., C. Strompl, D. M. Burgess, L. C. Skillman, E. R. Moore, K. N. Joblin. 2000. Isolation and identification of ruminal methanogens from grazing cattle. *Current Microbiology*. 40:327-332.
- Jentsch, W., M. Schweigel, F. Weissbach, H. Scholze, W. Pitroff, M. Derno. 2007. Methane production in cattle calculated by the nutrient composition of the diet. *Archives of Animal Nutrition* 61:10-19.
- Johnson, K. A. and D.E Johnson. 1995. Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*. 73: 2483-2492.
- Kamra, D. N. 2005. Rumen microbial ecosystem. *Current Science*. 89(1): 124-135.

- Karakurt, I., G. Aydin, K. Aydiner. 2012. Sources and mitigation of methane emissions by sectors: A critical review. *Renewable Energy*. 39: 40-48.
- Kellems, R.O., D. C. Church. 2002. Roughages. *In: Livestock feeds and feeding*. Kellems R.O., D.C. Church (Eds). 5^a ed. ED. Prentice Hall. New Jersey. Pp: 86-116.
- Kišidayova, S., P. Siroka, A. Laukova. 2003. Effect of nisin on two cultures of rumen Ciliates. *Folia Microbiology*. 48 (3): 408-412.
- Khiaosa-ard, R., Q. Zebeli. 2014. Cattle's variation in rumen ecology and metabolism and its contributions to feed efficiency. *Livestock Science*: 162: 66-75.
- Knapp, J. R., G. L. Laur, P. A. Vadas, W. P. Weiss, J. M. Tricarico. 2014. Enteric methane in dairy cattle production. Quantifying the opportunities and impact of reducing emissions: Invited review: *Journal Dairy Science*. 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-Patiño, H. Clark. 2011. Chloroform decreases rumen methanogenesis and methanogen populations without altering rumen function in cattle. *Animal Feed Science and Technology*. 166–167: 101– 112.
- Kulrihara, M., T. Magner, R. A. Hunter, G. J. McCrabb. 1999. Methane production and energy partition of cattle in the tropics. *British Journal Nutrition*. 81: 227–234.
- Kumar, S., P. Kumar, M. D. Carro, G. Wyn, S. Singh, M. Puniya, S. Calabro, S. Rao, T. Dhewa, C. Upadhyay, S. Kumar, S. Singh, M. Wanapat, A. Kumar. 2014. New aspects and strategies for methane mitigation from ruminants. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98: 31-44.
- Kumar, S., S. Singh, A. Kumar, R. C. Upadhyay. 2013. Changes in methane emission, rumen fermentation in response to diet and microbial interactions. *Research in Veterinary Science*. 94: 263–268.
- Lovett, D. K., D. McGilloway, A. Bortolozzo, M. Hawkins, J. Callan, B. Flynn, F. P. O'Mara. 2006. *In vitro* fermentation patterns and methane production as influenced by cultivar and season of harvest of *Lolium perenne* L. *Grass and Forage Science*. 61: 9-21.
- Lee, H., S. C. Lee, J. D. Kim, Y. G. Oh, B. K. Kim, C. W. Kim, K. J. Kim. 2003. Methane production potential of feed ingredients as measured by *in vitro* gas test Asian-Australian. *Journal of Animal Science*. 16 (8): 1143-1150.

- López, S., and C.J. Newbold. 2007. Analysis of methane. *In*: Makkar H.P.S., y P.E. Vercoe (EDS). Measuring methane production from ruminants. IAEA, FAO, Springer, Dordrecht, The Netherlands. Pp 1-13.
- Machmüller, A. 2006. Medium-chain fatty acids and their potential to reduce methanogenesis in domestic ruminants. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 112: 107–114.
- Madigan, M. T., J. M. Martiniko., J. Parker. 2008. *Biología de los microorganismos*. 8ª ed. Pearson-Prentice Hall. Madrid España.
- Martin, C., D. P. Morgavi, M. Doreau. 2010. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal*. 4: 351–365.
- McAllister, T. A., E. K. Okine, G. W. Mathison, K. J. Cheng. 1996. Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. *Canadian Journal of Animal Science*. 76: 231-243.
- McAllister T. A. and C. J. Newbold. 2008. Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. *Australian Journal Experiment Agriculture*. 48: 7-13.
- McCaughey, W. P., K. Wittenberg, D. Corrigan. 1999. Impact of pasture type on methane production by lactating beef cows. *Canadian Journal of Animal Science*. 79: 221–226.
- McCraab, G. J., and R. A. Hunter. 1999. Prediction of methane emissions from beef cattle in tropical production systems. *Australian Journal Agricultural Research*. 50: 1335-1339.
- McGinn, S. M., K. A. Beauchemin, T. Coates, D. Colombatto. 2004. Methane emissions from beef cattle: effect of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast and fumaric acid. *Journal of Animal Science*. 82: 3346–3356.
- Mohammed, R., S. M. McGinn, K. A. Beauchemin. 2011. Prediction of enteric methane output from milk fatty acid concentrations and rumen fermentation parameters in dairy cows fed sunflower, flax, or canola seeds. *Journal of Dairy Science*. 94: 6057–6068.
- Morgavi, P., C. Martin, J. Jouany, M. Ranilla. 2011. Rumen protozoa and methanogenesis: not a simple cause-effect relationship. *British Journal of Nutrition*: 1-10.
- Moss, A. R., J. P. Jouany, J. Newbold. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Annales de Zootechnie*. 49: 231–253.

- National Research Country (NRC). 2001. Nutrient requirements of dairy cattle: Seventh Revised. The National Academies Press. Washington, DC.
- Nicholson M. J., P. N. Evans, and K. N Joblin. 2007. Analysis of methanogen diversity in the rumen using temporal temperature gradient gel electrophoresis: identification of uncultured methanogens. *Microbiology and Ecology*. 54: 141-150.
- Niderkorn, V., R. Baumont, A. Le Morvan, D. Macheboeuf. 2011. Occurrence of associative effects between grasses and legumes in binary mixtures on *in vitro* rumen fermentation characteristics. *Journal of Animal Science*. 89: 1138-1145.
- Odongo N. E., R. Bagg, G. Vessie, P. Dick, M. M. Or-Rashid, S. E Hook, J. T. Gray, E Kebrean, J. France, B. W. McBride. 2007. Long-term effects of feeding monesin on methane production in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 90:1781-1788.
- Posada y Noguera, 2005. Técnica *In vitro* de producción de gases: una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes: *Livestock Research For Rural Develop*: 17. Art. # 36. Disponible en: <http://www.lrrd.org/lrrd17/4/posa17036.htm>. Consultado el 17 de enero de 2014.
- Puchala R., G. Animut, A. K. Patra, G. D. Detweiler, J. E. Wells, V. H. Varel, T. Sahlu, A. L. Goetsch. 2012. Effects of different fresh-cut forages and their hays on feed intake, digestibility, heat production, and ruminal methane emission by Boer x Spanish goats. *Journal of Animal Science*. 90: 2754-2762.
- Ramin, M., and P. Huhtanen. 2013. Development of equations for predicting methane emissions from ruminants. *Journal of Dairy Science*. 96: 2476–2493.
- Rea, S., J. Bowman, S. Popovski, C. Pimm, A. Wright. 2007. *Methanobrevibacter millerae* sp. nov and *Methanobrevibacter olleyae* sp. nov., methanogens from the ovine and bovine rumen that can utilize formate for growth. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57: 450-456.
- Rymer, C., J. A. Huntington, B. A. Williams, D. I. Givens. 2005. *In vitro* cumulative gas production techniques: History, methodological considerations and challenges. *Animal Feed Science and Technology*. 123-124: 9-30.
- Sejian V., R. Lal, J. Lakritz, T. Ezeji. 2011. Measurement and prediction of enteric methane emission. *International Journal of Biometeorology*. 55:1-16.

- Sharp, R., J. Cherie, D. Marshall, D. Stahl. 1998. Taxon-specific associations between protozoal and methanogen populations in the rumen and a model rumen system. *FEMS Microbiology Ecology* 36: 71-78.
- Shima, S., E. Warkentin, R. Thauer, U. Ermler. 2002. Review. Structure and function of enzymes involved in the methanogenic pathway utilizing carbon dioxide and Molecular Hydrogen. *Journal Bioscience and Bioengineering*. 93(6): 519-530.
- Singh, S., B. P. Kushwaha, S. K. Nag, A. K. Mishra, A. Singh, U. Y. Anele. 2012. *In vitro* ruminal fermentation, protein and carbohydrate fractionation, methane production and prediction of twelve commonly used Indian green forages. *Animal Feed Science and Technology*. 178: 2-11.
- Skillman, L., P. Evans, C. Strömpl, K. Joblin. 2006. 16S rDNA directed PCR primers and detection of methanogens in the bovine rumen. *Letters in Applied Microbiology*. 42: 222–228.
- Sosa, A., J. Galindo, R. Bocourt. 2007. Metanogénesis ruminal: aspectos generales y manipulación para su control. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 41(2): 105-114.
- Tavendale, M. H., L. P. Meagher, Z. A. Park-ng, G.C. Waghorn, G. T. Attwood. 2005. Methane production from *in vitro* incubation of kikuyu grass, lucerne and forages containing condensed tannins. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association*. 67: 147–153.
- Ulyatt, M. J., K. R. Lassey, I. D. Shelton, C. F. Walker. 2002. Methane emission from dairy cows and wether sheep fed sub-tropical grass-dominant pastures in midsummer in New Zealand. *New Zealand Journal of Agricultural Research*: In press.
- Ungerfeld, E., and R. Forster. 2011. A meta-analysis of malate effects on methanogenesis in ruminal batch cultures. *Animal Feed Science and Technology*. 166-167: 282-290.
- United States Environmental Protection Agency (US EPA). 2006. Global anthropogenic non-CO₂ greenhouse gas emissions: 1990–2020, United States Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- Ushida, K. 2010. Symbiotic Methanogens and Rumen Ciliates. *In*: J.H.P. Hackstein (ed.), (Endo) symbiotic methanogenic archaea. *Microbiology Monographs* 19, disponible en: DOI 10.1007/978-3-642-13615-3_3.

- Van Middelaar C. E., J. Dijkstra, P. B. M. Berentsen, J. M. De Boe. 2013. Cost-effectiveness of feeding strategies to reduce greenhouse gas emissions from dairy farming. *Journal of Dairy Science*. 97: 2427–2439
- Waghorn G., R.S. Hegarty. 2011. Lowering ruminant methane emissions through improved feed conversion efficiency. *Animal Feed Science and Technology*. 166-167: 291-30.
- Weimer, P. J. 1998. Manipulating ruminal fermentation: A microbial ecological perspective. *Journal of Animal Science*. 76:3114–3122.
- Williams, C. M., J. S. Eun, J. W. MacAdam, A. J. Young, V. Fellner, B. R. Min. 2011. Effects of forage legumes containing condensed tannins on methane and ammonia production in continuous cultures of mixed ruminal microorganisms. *Animal Feed Science and Technology*. 166-167: 364-372.
- Wolin, M. J. 1960. A theoretical rumen fermentation balance. *Journal of Dairy Science* 43:1452-1459.
- Wright, A., P. Kennedy, C. O'Neill, A. Toovey, S. Popovski, S. Rea, C. Pimm, L. Klein. 2004. Reducing methane emissions in sheep by immunization against rumen methanogens. *Vaccine*. 3976-3985.
- Wright, A. D., C. H. Auckland, D. H. Lynn. 2007. Molecular diversity of methanogens in feedlot cattle from Ontario and Prince Edward Island, Canada. *Applied Environmental Microbiology*. 73: 4206-4210.
- Wright A., A. V. Klieve. 2011. Does the complexity of the rumen microbial ecology preclude methane mitigation?. *Animal Feed Science and Technology*. 166-167: 248-253.
- Xu K., H. Liu, J. Chen. 2010. Effect of classic methanogenic inhibitors on the quantity and diversity of archaeal community and the reductive homoacetogenic activity during the process of anaerobic sludge digestion. *Bioresource Technology* 101: 2600–2607.

3. EXPERIMENTO I. COMPARACIÓN *in vitro* DEL POTENCIAL DE BIOGÁS, CH₄, CO₂ Y OTRAS VARIABLES QUÍMICO-FERMENTATIVAS DE SEIS PASTOS TEMPLADOS Y SEIS TROPICALES

Mayra Iliana Rivas Martínez, Dra.
Colegio de Postgraduados, 2015

3.1 RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar la capacidad de producir metano (CH₄) *in vitro*, de 12 pastos utilizados en México. Los pastos fueron seis de clima templado: pasto ovillo (*Dactylis glomerata*), proveniente del estado de Puebla (Ovillo Puebla) y del Estado de México (Ovillo Chapingo), ballico perenne (*Lolium perenne*), Kikuyo (*Pennisetum clandestinum*), festuca (*Festuca spp*), y ballico anual (*Lolium anual*), y seis de clima tropical: Estrella (*Cynodon nlemfuensis*), Insurgente (*Brachiaria brizantha*), Bermuda (*Cynodon dactylon*), Guinea (*Panicum máximo cv Tanzania*), King grass (*Pennisetum purpureum*), y llanero (*Andropogon gayanus*). El diseño experimental fue de parcelas divididas con 12 tratamientos (12 pastos) donde la parcela grande fue el tipo de pasto (templado y tropical). Con los datos se realizó un ANDEVA y las medias de los tratamientos se compararon con la prueba de Tukey (P<0.05). Los pastos fueron fermentados 72 h, a 39 °C y se utilizó líquido ruminal fresco como inóculo. La producción de biogás total fue medida a las 24, 48 y 72 h de fermentación y la proporción de CH₄ y CO₂ se obtuvo por medio de cromatografía de gases. A 72 h de fermentación se midió pH, AGV, concentración de bacterias totales (BT), y celulolíticas (BC), y DIVMS. La producción de ácido acético, biogás total, CH₄ y CO₂ fue mayor (P<0.05) en pastos tropicales. Los pastos templados aumentaron (P<0.05) la concentración molar de AGV, la producción de ácido propiónico y butírico, y la DIVMS; además estos pastos redujeron (P<0.05) la producción de ácido acético, biogás total, CH₄ y CO₂. La concentración BT totales y BC fue similar (P>0.05) para ambos grupos. El pasto Ovillo Chapingo y Ovillo Puebla mostraron la menor producción de biogás, CH₄ y CO₂. Los pastos tropicales presentaron mayor potencial de producción de CH₄, que los pastos templados, por lo cual es prioritario evaluar métodos de mitigación en rumiantes alimentados con pastos tropicales.

Palabras clave: forrajes, gases efecto invernadero, CH₄, CO₂, biofermentadores

COMPARISON OF THE POTENTIAL FOR PRODUCTION OF TOTAL BIOGAS, CH₄, CO₂ AND *IN VITRO* CHEMICAL- FERMENTATIVE VARIABLES OF SIX TEMPERATE AND SIX TROPICAL GRASSES

Mayra Iliana Rivas Martínez, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2015

ABSTRACT

The objective of this research was evaluated the ability to produce *in vitro* methane (CH₄) of 12 grasses used in Mexico. Temperate grasses were six: orchard grass (*Dactylis glomerata*) from Puebla (Puebla orchard grass) and Estado de México (Chapingo orchard grass), rye grass (*Lolium perenne*), Kikuyu (*Pennisetum clandestinum*), fescue (*Festuca spp*) and annual rye grass (*Lolium annual*); and six tropical grasses: African star grass (*Cynodon nlemfuensis*), Insurgente (*Brachiaria brizantha*), Bermuda grass (*Cynodon dactylon*), Guinea grass (*Panicum maximum cv Tanzania*), King grass (*Pennisetum purpureum*), and Gamba grass (*Andropogon gayanus*). Split plot design was used with 12 treatments (12 grasses); the large plot was grass type (temperate and tropical grass). Data were used to perform ANOVA and treatment means were compared using the Tukey test ($P < 0.05$). Grasses were fermented at 39 °C during 72 h and ruminal fluid was used as inoculum. The total biogas production was measured at 24, 48, and 72 h of fermentation. The CH₄ and CO₂ proportions were measured by gas chromatography. At 72 h fermentation pH, volatile fatty acid (VFA), total bacteria (TB) and cellulolytic (CB) population and *in vitro* dry matter degradation (IVDMD) were measured. Temperate grass produced higher ($P < 0.05$) AGV molar concentration, propionic and butyric acid and IVDMD; besides, these grasses reduced ($P < 0.05$) production of acetic acid, total biogas, CH₄ and CO₂. The total bacterial and cellulolytic populations were similar for both groups ($P > 0.05$). Orchard grass was identified as the lowest biogas CH₄ and CO₂ producer. Temperate grasses had lower methane production potential than tropical grasses (26.06 y 55.77 mL g MS⁻¹, respectively); besides, they had lower ($P < 0.05$) biogas and CO₂ production, and higher ($P < 0.05$) IVDMD, total VFA, propionic and butyric acid; and lower ($P < 0.05$) acetic acid production. The total bacterial and cellulolytic populations were similar for both groups ($P > 0.05$). The tropical grasses had higher CH₄ production potential than

temperate grasses; for this reason it is a priority to evaluate mitigation methods in ruminants fed with tropical grasses

Key words: Greenhouse gases, forages, CH₄, CO₂, Biofermentors

3.2 Introducción

Un recurso importante para la alimentación del ganado doméstico y fauna silvestre son las gramíneas forrajeras y su utilización como fuente de energía para estos animales las convierte en el grupo de plantas más importante para el hombre (Aguado-Santacruz *et al.*, 2004). México es uno de los centros de diversidad y endemismo más importantes de las gramíneas, porque 256 taxones (incluyendo 16 unidades taxonómicas subespecíficas), pertenecientes a 65 géneros son endémicas en el país (Dávila-Aranda *et al.*, 2004). Además se han introducido especies de pastos de otros lugares con características forrajeras deseables para la alimentación de los rumiantes y son cultivadas como praderas. Los pastos para praderas de clima templado más importantes son: *Andropyrion spp* (triguillos), *Dactylis glomerata* (pasto ovilla), *Festuca arundinacea* (festuca alta), *Lolium multiflorum* (ballico anual), *Lolium perenne* (ballico perenne), *Poa pratensis* (zacate azul de Kentucky) y *Phalaria arundinacea* (alpiste silvestre) (Améndola *et al.*, 2005). Estos pastos tienen excelente valor forrajero, se cultivan bajo riego y temporal, soportan el pisoteo de los animales, y su utilización es principalmente durante el invierno de lo que surge su mayor valor (SARH, 1991).

Las praderas de pastos templados se pueden cultivar en monocultivo o en asociaciones con leguminosas como se realiza en el centro del país, donde se ha asociado la alfalfa (*Medicago sativa*) y trébol blanco (*Trifolium repens*) con pasto ovilla, ballico perenne y festuca alta, para un máximo rendimiento de materia seca (MS) que permita una alimentación de mayor calidad para el ganado productor de carne y leche (Castro *et al.*, 2012).

Los pastos para praderas tropicales más importantes en México son el *Cynodon nlenfluensis* (pasto Bermuda), *Panicum maximum* (pasto Guinea), *Paspalum notatum* (zacate Bahía o remolino), *Pennisetum clandestinum* (pasto Kikuyo), *Pennisetum*

purpureum (zacate elefante) (Améndola *et al.*, 2005); En el noreste de México, pastos tropicales introducidos como Guinea, Pangola (*Digitaria decumbens*) y Bermuda elevan la producción de forraje y la carga animal durante la primavera y el otoño. Estos forrajes son una fuente importante de alimento para el ganado en ranchos de doble propósito en el trópico seco de México (Améndola *et al.*, 2005). Juárez *et al.* (2009) usaron métodos bromatológicos y técnicas de producción de biogás *in vitro* para evaluar pastos introducidos al norte del Estado de Veracruz, y con buena capacidad forrajera: Guinea, Pangola, Bermuda, pero en la literatura revisada no se encontraron reportes donde se haya evaluado su capacidad para producir CH₄.

Los forrajes fermentados por microorganismos ruminales producen AGV (Hook *et al.*, 2010), cuyas proporciones individuales están influenciadas por la composición de materia orgánica del forraje, y por la naturaleza y la tasa de fermentación de carbohidratos; mientras que el H₂ y CO₂ derivados de la fermentación son utilizados por las arqueas metanogénicas para producir CH₄ (Moss *et al.*, 2000). La cantidad de celulosa y FDN en los forrajes tiene una correlación positiva con la síntesis de CH₄ (Singh *et al.*, 2012); los pastos de clima tropical C4 poseen un alto contenido de carbohidratos en la pared celular, mayor cantidad de hemicelulosa (Fulkerson *et al.*, 2007) y lignina en los tejidos, y baja digestibilidad de la MS (Ulyatt *et al.*, 2002).

Los rumiantes alimentados con forrajes ricos en carbohidratos estructurales producen más CH₄ como sucede en los sistemas en pastoreo tropical, comparados con rumiantes alimentados con dietas con niveles altos de carbohidratos no estructurales (Sauvant y Giger-Reverdin, 2009). Por lo tanto, el CH₄ emitido por unidad de MS consumida es más alto para rumiantes alimentados con pastos tropicales que los alimentados en pastos de clima templado (Ulyatt *et al.*, 2002).

El efecto de las emisiones de CH₄ provenientes de rumiantes sobre el calentamiento global, la utilización de energía para el proceso de metanogénesis y el costo considerable de los experimentos con animales, provee un incentivo para el uso de técnicas alternas como la producción de biogás *in vitro*, para evaluar el potencial de producción de CH₄ y las variables fermentativas en forrajes (Tavendale *et al.*, 2005).

3.3 Objetivo general

Evaluar la capacidad metanogénica *in vitro* de 12 pastos utilizados comúnmente en la alimentación de rumiantes en México.

3.3.1 Objetivos particulares

Evaluar *in vitro* la producción de biogás, AGV y pH de seis pastos de clima templado y seis de clima tropical.

Evaluar *in vitro* la concentración de bacterias totales y celulolíticas de seis pastos de clima tropical y seis de clima templado.

3.4 Materiales y métodos

El experimento se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología Ruminal y Genética Microbiana del Colegio de Postgraduados del Campus Montecillo, ubicado en el km 36.5, carretera México-Texcoco, Montecillo, Estado de México.

Los seis pastos de clima templado fueron: ovilla, proveniente del Estado de Puebla y del Estado de México en época de corte, ballico perenne, Kikuyo, festuca y ballico anual y seis pastos tropicales: Estrella, Insurgente (*Brachiaria brizantha*), Bermuda, Guinea, King grass y llanero (*Andropogon gayanus*). Los pastos fueron fermentados a 39 °C por 72 h en viales serológicos de 120 mL, cada pasto fue considerado como tratamiento y evaluado en cinco repeticiones para todas las variables.

3.4.1 Establecimiento del experimento

La materia orgánica (MO), cenizas y proteína cruda (PC) de los pastos, fue determinada por los métodos de la AOAC, (2005). El contenido de fibra detergente neutro (FDN), ácido (FDA) y hemicelulosa se determinó de acuerdo con el método de Van Soest *et al.* (1991).

Las muestras de los pastos se secaron a 60 °C por 48 h y fueron molidas a 1 mm en un molino Willey (Arthur H. Thomas, Philadelphia, PA), del material molido se pesaron 0.5 g de MS, para guardar la relación 1:9 con medio de cultivo, las muestras

fueron colocadas en viales serológicos de 120 mL, se agregaron 45 mL de medio de cultivo para bacterias totales (Cuadro 3), con pH de 6.8 a 7.2, descrito por Cobos y Yokoyama (1995), y se mantuvo en condiciones anaerobias agregando CO₂ y tapando herméticamente. Después de 48 h se comprobó anaerobiosis y esterilidad, observando el color del medio que fuera ámbar y que no tuviera turbidez, respectivamente.

Cuadro 3. Componentes del medio de cultivo fluido ruminal-sustrato

Componente	Por cada 100 mL de medio
Agua destilada	52.6 mL
Líquido ruminal clarificado ¹	30.0 mL
Solución mineral I ²	5.0 mL
Solución mineral II ³	5.0 mL
Resazurina 0.1 % ⁴	0.1 mL
Carbonato de sodio 8 % ⁵	5.0 mL
Cisteína-sulfito de sodio ⁶	2.0 mL
Peptona de soya ⁷	0.2 g
Extracto de levadura	0.1 g
Sustrato (pasto)	0.5 g en cada vial

¹ Líquido ruminal clarificado, previamente filtrado en manta cielo, centrifugado dos veces a 12,857 g durante 10 min, y esterilizado dos veces a 15 psi y 121°C. alternando los procedimientos de centrifugado y esterilizado.

² Contiene (por cada 1000 mL) K₂ HPO₄, 6.0 g.

³ Contiene (por cada 1000 mL) KH₂ PO₄, 6.0 g; (NH₄)₂SO₄, 6.0 g; NaCl, 12 g; Mg SO₄, 2.5 g; CaCl₂H₂O, 1.6 g.

⁴ Contiene 0.1 mL (100 mL), en una solución al 1%

⁵ Contiene 8 g carbonato de sodio (100 mL de agua destilada)

⁶ 2.5 g de L-cisteína (disuelto en 15 mL de NaOH 2 N) más 2.5 g de Na₂S-9H₂O. La mezcla es aforada en 100 mL de agua destilada a 121°C por 20 minutos.

La captura de biogás se realizó en trampas de solución salina saturada a pH 2 en viales serológicos de 120 mL llenos en su totalidad, los cuales se sellaron herméticamente con un tapón de neopreno azul de 2 cm de diámetro y un casquillo de aluminio, el cual se colocó con una selladora Wheaton®, las trampas de captura se cambiaron a las 24, 48 y 72 h de fermentación.

Los viales con el pasto y el medio de cultivo fueron utilizados como biofermentadores, se incubaron en baño María a 39 °C, y se inocularon con líquido ruminal fresco centrifugado a 1, 257 x g por 3 min. Al finalizar la inoculación se tomó como la hora 0 de fermentación, después fueron conectados a las trampas de captura por medio de una manguera de Tygon® la cual fue adaptada con dos agujas amarillas Terumo® de calibre 20 G x 1" en cada extremo de la manguera, un extremo fue colocado en la trampa y el otro al biofermentador. Las mangueras fueron cerradas con una pinza y liberar el biogás a las 24, 48 y 72 h, y para evitar la entrada de solución salina saturada al biofermentador debido a la presión negativa que se puede generar cuando la temperatura ambiental desciende.

La producción de biogás total se cuantificó midiendo el desplazamiento del líquido de las trampas en una probeta graduada de 50 mL con un corte en V en el borde superior y para cuantificar la cantidad de CH₄ y CO₂ se tomó una muestra de 300 µL de biogás del espacio de cabeza de las trampas con una jeringa para insulina de 1 mL con una aguja hipodérmica 23 G Azul 0.6 x 30 mm, la proporción se midió en un cromatógrafo de gases de PerkinElmer®. Se utilizó una columna empacada Porapak y un detector de conductividad térmica; las condiciones de trabajo fueron: temperatura del horno, 80 °C, columna empacada (PKD), 170 °C y detector de Conductividad Térmica, 130 °C. Los tiempos de retención fueron: 0.71 min para CH₄ y 1.05 min para CO₂. El gas acarreador de la columna (PKD) fue helio a un flujo de 23 mL min⁻¹.

El volumen de CH₄ y CO₂ se calculó, utilizando el volumen de biogás total y la proporción obtenida por cromatografía de gases de CH₄ y CO₂.

3.4.2 Medición de variables fermentativas y microbiológicas

La producción de biogás total (CH₄ y CO₂) se analizó a las 72 h de fermentación, también se tomaron muestras de la fase líquida fermentada de cada vial y con el fin de conservar la muestra se fijaron con ácido metafosfórico al 25 % en una proporción 4:1, y se congelaron a -4°C, para medir la concentración de AGV (acético, propiónico y butírico) por cromatografía de gases (Erwin *et al.*, 1961), en un cromatógrafo de gases Clarus 500 PerkinElmer®, con un detector de ionización de flama, y columna capilar Elite FFAP PerkinElmer®. Las condiciones del análisis fueron las siguientes:

temperatura del horno; 115°C por 0.25 min, 125° por 0.5 min y 130°C por 3.25 min, la temperatura de la columna fue 250 °C, el gas acarreador fue nitrógeno a un flujo de 23.3 mL por min y aire e hidrógeno para combustión de la flama, la inyección se realizó de manera automática en un volumen de 1 µL. Los tiempos de aparición fueron de 1.3 min para el ácido acético, 1.6 min para el ácido propiónico y 2.15 min para el ácido butírico.

Para determinar la concentración de bacterias totales, se realizó el conteo directo en una cámara Petroff-Hausser® en un microscopio Olympus® a una magnificación de 1000 X.

El número de bacterias celulíticas fue calculado por la técnica del número más probable (NMP) usando diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-10} con tres repeticiones por dilución (Harrigan y McCance, 1979), los tubos de cultivos con medio e inóculo se incubaron a 39 °C por 10 d, para lo cual se empleó 4.5 mL un medio de cultivo anaerobio (Cobos y Yokoyama, 1995) similar al utilizado para bacterias totales, intercambiando la fuente de energía (glucosa, celobiosa y almidón) por una tira de papel Whatman® N° 541 por tubo como fuente de celulosa.

El pH fue medido directamente del fermentador a las 72 h con un potenciómetro marca ORION®, calibrado a pH 4 y 7.

Además el contenido del biofermentador fue filtrado en papel Whatman para recuperar la materia seca no degradada y con la diferencia se calculó la DIVMS.

3.4.3 Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue de parcelas divididas, la parcela grande fue el tipo de pasto (templado y tropical) y la parcela chica el tratamiento (Ovillo Puebla, ballico anual y perenne, Kikuyo, festuca, Ovillo Chapingo, Estrella, Insurgente, llanero, King grass, Guinea y Bermuda). La unidad experimental fue un biofermentador. Los datos fueron analizados con el procedimiento GLM de SAS (2002) y las medias de los tratamientos se compararon con la prueba de Tukey ($P < 0.05$). La variable concentración de bacterias totales se transformó con Log 10, con el fin de cumplir con la normalidad y

homogeneidad de los datos. Las medias se presentan en el valor original. Las variables de producción de biogás, CH₄ y CO₂ fueron analizadas a 24, 48 y 72 h.

El modelo estadístico fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + P_j + K_k + P^*R_{ik} + T^*P_{ij} + e_{ijk}.$$

Donde:

μ =media general

T_i =efecto fijo del i ésimo tratamiento

P_j =efecto fijo del j ésimo pasto

P^*R_{ik} =efecto aleatorio de la interacción del i ésimo pasto con la k ésima repetición.

$(T^*P)_{ij}$ =efecto fijo de la interacción de la i ésimo tratamiento con el j ésimo tipo de pasto.

E_{ijkl} =efecto aleatorio del término del error.

Para las variables de biogás total acumulado, CH₄ acumulado y CO₂ acumulado se utilizó un diseño anidado, el cual se ajustó al siguiente modelo: $Y_{ij} = \mu + T_{i(j)} + e_{ij}$

Donde:

μ =media general

T_i =efecto fijo del i ésimo tratamiento anidado al tipo de pasto.

3.5 Resultados

La composición química de los pastos evaluados se muestra en el Cuadro 4.

La MO fue 85.12-91.47 %, la proteína cruda 8.12-24.90 %, la FDN 50.72-76.25 %, la FDA 32.70-49.33 % y la hemicelulos de 17.78- 35.76 %.

Cuadro 4. Análisis químico de pastos templados y tropicales

Tratamiento	MO	Cenizas	PC	FDN	FDA	Hemicelulosa
Ovillo Puebla	91.47	8.53	10.18	70.26	37.48	32.78
Ballico perenne	88.06	11.94	11.15	67.87	44.59	23.28
Kikuyo	85.33	14.67	24.90	57.72	33.55	26.17
Festuca	85.29	14.71	22.86	50.72	32.70	17.78
Ballico anual	85.12	14.88	13.61	57.52	38.16	19.35
Ovillo Chapingo	86.29	13.65	24.83	56.27	35.00	21.27
Estrella	87.88	12.12	10.69	73.40	41.21	32.19
Insurgente	89.60	10.40	8.42	71.66	49.33	22.33
Llanero	90.99	9.01	15.01	69.84	34.08	35.76
King grass	89.47	10.53	8.12	76.25	46.14	30.11
Guinea	87.09	12.91	8.17	72.65	42.30	30.35
Bermuda	89.69	10.31	11.36	75.67	41.06	34.60

MO: Materia orgánica; PC: Proteína cruda; FDN: Fibra detergente neutro; FDA: fibra detergente ácido

3.5.1 Variables químico-fermentativas y microbiológicas

El pH de pastos templados (6.78) y tropicales (6.77) a las 72 h de fermentación fue similar ($P>0.05$), para ambos grupos (Cuadro 5). El pH de los pastos Kikuyo (6.97) y Estrella (6.9) fue más alto en comparación con el pasto ovilla Puebla (6.49). El pH de los demás pastos varió de 6.66 a 6.87, que son valores óptimos para el crecimiento de microorganismos ruminales.

La DIVMS a las 72 h de fermentación (Cuadro 5) fue mayor ($P<0.05$) en los pastos con menor pared celular (templados), comparado con los pastos tropicales (42.5 y 39 %, respectivamente). El pasto Bermuda con 46.1 % tuvo una degradación similar al Ovilla Puebla, Ovilla Chapingo y festuca, mientras que el pasto Estrella tuvo la menor degradación (30.22 %).

Cuadro 5. pH y DIVMS a las 72 h de fermentación de seis pastos templados y seis tropicales

Tratamiento	pH	DIVMS, %
Ballico perenne	6.69 ^{ab}	39.56 ^{bc}
Ovillo Puebla	6.49 ^b	42.00 ^{ab}
Ballico anual	6.79 ^{ab}	43.06 ^{ab}
Kikuyo	6.97 ^a	42.96 ^{ab}
Festuca	6.87 ^{ab}	43.97 ^{ab}
Ovillo Chapingo	6.86 ^{ab}	43.11 ^{ab}
Estrella	6.9 ^a	30.22 ^d
Insurgente	6.79 ^{ab}	34.9 ^{cd}
Llanero	6.8a ^b	41.21 ^b
King grass	6.75 ^{ab}	40.65 ^b
Guinea	6.71 ^{ab}	40.52 ^b
Bermuda	6.66 ^a	46.51 ^a
EEM	0.78	1.045

^{a, b, c} Valores con literales diferentes en una columna son diferentes estadísticamente (Tukey; $P < 0.05$); DIVMS: Degradación *in vitro* de la materia seca; EEM: Error estándar de la media.

La producción total de AGV (acético, propiónico y butírico) a las 72 h de fermentación (Cuadro 6), fue mayor en los pastos templados ($P < 0.05$), comparado con los tropicales los cuales produjeron en promedio poco menos de la mitad (45.69 %) de lo observado en pastos templados (86.27 mM pastos templados y 39.42 mM pastos tropicales).

La concentración molar de AGV presentó variaciones entre tipo de pastos: el ballico perenne, el ovillo Puebla, ballico anual y Kikuyo tuvieron mayor ($P < 0.05$) producción de AGV, y dentro del grupo de los pastos templados el ovillo Chapingo produjo menos AGV (72.66 mM).

Cuadro 6. Ácidos grasos volátiles producidos por pastos a 72 h de fermentación

Tratamiento	Acético	Propiónico	Butírico	A:P	Total, mM
	mM por 100 mM producidos				
Ballico perenne	61.14 ^{cb}	26.14 ^a	12.71 ^c	2.34	95.95 ^a
Ovillo Puebla	61.92 ^{cb}	26.37 ^a	12.70 ^c	2.35	91.49 ^{ab}
Ballico anual	58.61 ^c	28.75 ^a	12.63 ^c	2.04	89.178 ^{ab}
Kikuyo	63.89 ^b	22.20 ^b	13.91 ^b	2.88	85.19 ^{ab}
Festuca	63.81 ^b	21.87 ^b	14.31 ^{ab}	2.92	83.15 ^{bc}
Ovillo Chapingo	63.51 ^b	21.36 ^b	15.12 ^a	2.97	72.66 ^c
Estrella	70.38 ^a	21.43 ^b	8.190 ^e	3.28	34.96 ^d
Insurgente	70.04 ^a	21.45 ^b	8.50 ^{de}	3.27	36.46 ^d
Llanero	69.91 ^a	22.09 ^b	7.98 ^e	3.16	41.62 ^d
King grass	70.57 ^a	21.09 ^b	8.33 ^e	3.35	38.69 ^d
Guinea	69.07 ^a	23.01 ^b	7.90 ^e	3.00	39.85 ^d
Bermuda	62.91 ^b	27.57 ^a	9.31 ^d	2.28	44.9 ^d
EEM	0.71	0.56	0.18	N/A	2.28

^{a, b, c} Valores con literales diferentes en una columna son diferentes estadísticamente (Tukey; $P < 0.05$); mM: concentración milimolar; EEM: Error estándar de la media; A:P relación acético propiónico; N/A: No aplica.

La producción de ácido acético por cada 100 mM de AGV (Cuadro 6) fue mayor ($P < 0.05$) en pastos tropicales comparado con los pastos templados. La producción de ácido acético fue de 58.61 a 70.38 mM por cada 100 mM producidos; la menor producción ocurrió en el ballico anual ($P < 0.05$), el cual fue uno de los tres pastos que produjeron mayor cantidad de propiónico ($P < 0.05$), lo cual se reflejó en la relación acético: propiónico 2.04 unidades y es deseable en una fermentación con bacterias ruminales. Mientras que la producción de ácido propiónico fue mayor en pastos templados (24.45 mM) y menor en pastos tropicales (22.7 mM), característica que tiene un alto impacto en la síntesis de CH_4 . El ovillo Chapingo, festuca y Kikuyo produjeron mayor proporción de ácido propiónico, y los pastos con menor proporción fueron ballico perenne, ovillo Puebla, ballico anual, Bermuda, Insurgente, Llanero, King grass y

Guinea. La concentración de ácido butírico presentó diferencias ($P < 0.05$) entre los dos grupos de pastos; los pastos templados produjeron más ácido butírico (13.57 mM), comparado con los pastos tropicales (8.37 mM).

La concentración de bacterias totales y celulolíticas (Cuadro 7) a las 72 h de fermentación (Cuadro 7), fue similar ($P > 0.05$) para pastos templados y tropicales, 7.7×10^9 y 9.35×10^9 bacterias totales y 7.9×10^6 y 2.3×10^7 bacterias celulolíticas por mL, respectivamente.

Cuadro 7. Concentración de bacterias totales y celulolíticas de pastos templados y tropicales

Tratamiento	Bacterias totales	Bacterias Celulolíticas		
		Media	Límite inferior	Límite superior
Ovillo Puebla	7.2×10^9	15×10^6	3×10^6	9.4×10^7
Ballico perene	1.1×10^{10}	15×10^6	3×10^6	9.4×10^7
Kikuyo	4.6×10^9	2.1×10^6	4×10^5	4.7×10^6
Festuca	6.9×10^9	9×10^6	1×10^6	3.5×10^7
Ballico anual	7.4×10^9	4×10^6	5×10^5	2.0×10^7
Ovillo Chapingo	9.5×10^9	2.3×10^6	3×10^5	1.2×10^7
Estrella	6.2×10^9	11×10^7	1.5×10^7	4.8×10^8
Insurgente	7.8×10^9	11×10^6	1.5×10^6	4.8×10^7
Llanero	7.5×10^9	11×10^6	1.5×10^6	4.8×10^7
King grass	4.19×10^9	2.4×10^6	3.6×10^5	1.3×10^7
Guinea	4.38×10^9	11×10^7	1.5×10^6	4.81×10^8
Bermuda	7.3×10^9	4.6×10^6	7×10^5	2.4×10^7

No hubo diferencia significativa (Tukey; $P > 0.05$).

3.5.2 Producción de biogás acumulado por gramo de MS

La producción de biogás acumulado (Cuadro 8) fue diferente ($P < 0.05$) para los dos grupos de pastos a las 24, 48 y 72 h de fermentación. Los pastos tropicales produjeron más biogás ($199.2 \text{ mL g MS}^{-1}$), y los pastos templados menos (86.38 mL g

MS⁻¹). De ambos grupos de pastos el King grass, un pasto tropical, mostró mayor producción de biogás total y el ovillo Chapingo, pasto templado, produjo menos biogás durante el periodo de fermentación. El comportamiento de la producción de biogás total a través de la fermentación para pastos tropicales es de manera ascendente y a las 72 h de fermentación aún no se observa estabilidad, pero para los pastos templados a partir de la hora 48 la producción de biogás empieza a estabilizarse, sin un crecimiento considerable.

Cuadro 8. Producción de biogás acumulado (mL) de pastos

Tiempo de fermentación, h	24	48	72
Pasto			
Ballico perenne	48.64 ^c	62.51 ^d	71.18 ^d
Ovillo Puebla	49.27 ^c	63.51 ^d	70.56 ^d
Ballico anual	57.14 ^{cb}	63.51 ^d	69.09 ^d
Kikuyo	57.14 ^{bc}	73.72 ^d	79.44 ^d
Festuca	53.31 ^c	66.63 ^d	72.157 ^d
Ovillo Chapingo	36.44 ^{cd}	50.64 ^e	55.88 ^e
Estrella	74.91 ^b	119.35 ^b	194.24 ^b
Insurgente	75.19 ^b	125.32 ^b	200.51 ^b
Llanero	71.24 ^b	118.72 ^b	189.95 ^b
King grass	109.2 ^a	172.98 ^a	282.17 ^a
Guinea	62.43 ^{bc}	95.27 ^c	157.7 ^c
Bermuda	75.90 ^b	119.33 ^c	170.65 ^c
EEM	5.27	5.56	5.96

a, b, c Valores con literales diferentes en una columna son diferentes estadísticamente (Tukey; P<0.05), EEM: Error estándar de la media.

3.5.3 Producción de CH₄ acumulado por gramo de MS

La fermentación de pastos tropicales estimuló mayor (P<0.05) cantidad de CH₄ mL g MS⁻¹ (Cuadro 9) a las 72 h de fermentación, más del doble de CH₄ (55.77 mL g

MS⁻¹) que los pastos templados (26.06 mL g MS⁻¹). Esta diferencia (P<0.05) se observó desde 24 h y fue de 7.3 mL más para los pastos tropicales.

Cuadro 9. Producción de CH₄ acumulado de pastos a 72 h de fermentación

Tiempo de fermentación, h	24	48	72
Pasto			
Ballico perenne	9.89 ^c	19.72 ^d	24.00 ^e
Ovillo Puebla	9.35 ^c	18.71 ^d	22.72 ^e
Ballico anual	10.03 ^c	20.06 ^d	23.09 ^e
Kikuyo	16.02 ^{bc}	32.04 ^{bc}	34.85 ^d
Festuca	12.52 ^{bc}	25.04 ^{cd}	28.47 ^{de}
Ovillo Chapingo	10.05 ^c	20.09 ^d	23.28 ^e
Estrella	18.91 ^b	34.68 ^b	53.60 ^b
Insurgente	15.84 ^{bc}	37.24 ^{bc}	53.07 ^b
Llanero	17.36 ^b	40.41 ^b	57.77 ^b
King grass	27.58 ^a	55.32 ^a	82.90 ^a
Guinea	13.98 ^{bc}	29.25 ^c	43.23 ^{cd}
Bermuda	18.26 ^b	25.84 ^{cd}	44.10 ^c
EEM	2.43	3.06	3.03

^{a, b, c} Valores con literales diferentes en una columna son diferentes estadísticamente (Tukey; P<0.05); EEM: Error estándar de la media.

La producción de CH₄, un gas de efecto invernadero, fue mayor (P<0.05) en el pasto King grass, mientras que el ovillo Puebla, ballico anual y ovillo Chapingo tuvieron la menor producción de CH₄. Esta característica también fue observada en producción de biogás total, lo cual se puede asociar a su alta fermentación propiónica.

3.5.4 Producción de CO₂ acumulado por gramo de MS

Otro gas producto de la fermentación de microorganismos ruminales evaluado en esta investigación fue el CO₂ y los resultados se muestran en el Cuadro 10.

Cuadro 10. Producción de CO₂ acumulado (mL) de pastos

Tiempo de fermentación, h			
Pasto	24	48	72
Ballico perenne	38.75	46.61 ^c	51.05 ^d
Ovillo Puebla	39.92	48.27 ^{cd}	54.04 ^d
Ballico anual	47.12	52.8 ^{bc}	55.34 ^d
Kikuyo	41.11	51.13 ^{bc}	54.04 ^d
Festuca	40.78	48.2 ^{cd}	50.3 ^d
Ovillo Chapingo	26.38	34.81 ^{cd}	36.87 ^d
Estrella	47.92	76.58 ^b	124.5 ^b
Insurgente	45.89	74.61 ^b	120.5b ^c
Llanero	23.38	57.66 ^{bc}	111.18b ^c
King grass	69.31	105.35 ^a	174.66 ^a
Guinea	40.09	57.65 ^{bc}	97.75 ^c
Bermuda	44.82	56.09 ^{bc}	100.9 ^{bc}
EEM	7.96	8.36	8.44

^{a, b, c} Valores con literales diferentes en una columna son diferentes estadísticamente (Tukey; P<0.05), EEM: Error estándar de la media.

El CO₂ fue similar (P>0.05) en pastos tropicales y templados a las 24 h de fermentación, con un promedio de 42.12 mL, este volumen tiene una relación directamente proporcional con el tiempo de fermentación en pastos tropicales (P<0.05). A las 48 h el volumen fue 71.32 mL en pastos tropicales y 46.97 mL en pastos templados, y a las 72 h el volumen de CO₂ fue mayor (P<0.05) para pastos tropicales con 121.58 mL y en pastos templados fue 60 % menos (49.82 mL), mientras que King grass mostró la mayor producción (174.66 mL).

Al expresar la producción de CH₄ por cada 100 M de biogás (Cuadro 11), no hay diferencias entre pastos templados y tropicales a 24, 48 y 72 h; y la mayor parte del biogás es CO₂.

Cuadro 11. Producción de CH₄ y CO₂ por cada 100 M de biogás producidos de pastos

Hora/Tratamiento	Tiempo de fermentación, h					
	24	48	72	24	48	72
	CH ₄			CO ₂		
Ballico perenne	20.33	31.55	33.72	79.67	74.56	71.72
Ovillo Puebla	18.98	29.46	32.20	81.02	76.00	76.59
Ballico anual	17.55	31.59	33.42	82.46	83.14	80.10
Kikuyo	28.04	43.46	43.87	71.95	69.36	68.03
Festuca	23.49	37.58	39.46	76.50	72.34	69.71
Ovillo Chapingo	27.58	39.67	41.66	72.39	68.74	65.98
Estrella	25.24	29.06	27.59	63.97	64.16	64.10
Insurgente	21.07	29.72	26.47	61.03	59.54	60.10
Llanero	24.37	34.04	30.41	32.82	48.57	58.53
King grass	25.26	31.98	29.38	63.47	60.90	61.90
Guinea	22.39	30.70	27.41	64.21	60.51	61.98
Bermuda	24.06	21.65	25.84	59.05	47.00	59.13
EEM	2.43	3.06	3.03	7.96	8.36	8.44

No hubo diferencia significativa (Tukey; P<0.05); M: Concentración molar.

3.6 Discusión

El pH fue 6.0 a 6.9, en el cual se desarrollan las bacterias ruminales de manera óptima (Kamra, 2005), por lo cual el pH no afectó las condiciones de la fermentación para la producción de biogás. El pH cambia según el tipo de fermentación y afecta la producción de CH₄, sustratos altos en carbohidratos estructurales incrementan la producción de hidrógeno (disminuye el pH) y bióxido de carbono, sustratos disponibles para producir CH₄; en contraste, sustratos altos en carbohidratos solubles disminuyen el pH, pero reducen la producción de CH₄ (Poulsen *et al.*, 2012). En la presente investigación no hubo algún factor que afectará el pH, lo cual se puede atribuir a que en los biofermentadores se produjo un equilibrio entre la producción del ácido y la capacidad amortiguadora del ingrediente fermentado (Van Soest *et al.*, 1991).

Los pastos templados produjeron menos ($P < 0.05$) ácido acético y más propiónico, lo cual se reflejó en la baja producción de biogás, CH_4 y CO_2 . El pasto ovillo produjo una mayor cantidad de ácido propiónico y este mismo pasto tuvo una menor cantidad de biogás total; características asociadas y que influyen de manera inversa. La ruta de formación de propionato compite directamente por el uso de hidrógeno en el rumen (Lascano *et al.*, 2011), y así hay menor cantidad para la producción de CH_4 (Martin *et al.*, 2010). Por el contrario, la producción de ácido acético y butírico en el rumen resulta en una liberación neta de hidrógeno y favorece la producción de CH_4 (Lascano *et al.*, 2011).

La DIVMS fue afectada por el tipo de pasto y también por los tratamientos. Los pastos templados tuvieron mayor degradación porque tienen menor cantidad de paredes celulares y menos lignina, por lo cual presentan mayor degradación *in vitro* de la MS y menor producción de CH_4 (Archimède *et al.*, 2011), lo cual se observó en el ovillo Chapingo que mostró mejor DIVMS.

La producción de CH_4 en pastos tropicales fue mayor en comparación con pastos templados y se mantuvo hasta las 72 h, es decir desde las primeras 24 h de fermentación se puede detectar los pastos con mayor y menor producción de CH_4 . El King grass incrementó ($P < 0.05$) la producción de ácido acético y disminuyó la de ácido propiónico, características fermentativas que influyen en la producción de biogás total, CH_4 y CO_2 . El pasto ovillo Chapingo tuvo buenas características fermentativas, una de las más altas DIVMS, incremento en la producción de AGV y alta proporción de ácido propiónico vs acético. Algunas de estas características se reportaron en otras investigaciones con pastos similares de clima tropical los cuales tienen mayor potencial de CH_4 que los pastos de clima templado (Kurihara *et al.*, 1999; McCrabb y Hunter, 1999; Ulyatt *et al.*, 2002). Según Archimède *et al.* (2011), vacas alimentadas con plantas C3 (de clima templado) produjeron 30.0 L kg^{-1} MS consumida y las alimentadas con plantas C4 (de clima tropical) produjeron 33.7 L kg^{-1} MS consumida. La producción de biogás acumulado fue mayor para los pastos tropicales, pero, la mayor parte de este biogás fue CO_2 , para ambos grupos de pastos.

3.7 Conclusiones

Los pastos tropicales evaluados producen mayor cantidad de CH₄ y CO₂, comparados con los templados; también presentaron una menor proporción de ácido acético y una mayor de propiónico y butírico. El Ovillo Chapingo tuvo mejor comportamiento fermentativo, aunque produjo menor cantidad de AGV, biogás total de CH₄ y CO₂, mientras que el King grass mostró mayor potencial de producción de CH₄.

Las variables microbiológicas no cambiaron por el tipo de sustrato fermentado (pasto templado y tropical), por lo que se supone que la población de bacterias sería la misma, pero la proporción las comunidades fue diferente.

Literatura citada

- Aguado-Santacruz, G., Q. Rascón, J. L. Pons, O. Grageda, E. García-Moya. 2004. Manejo biotecnológico de gramíneas forrajeras. *Técnica Pecuaria*. 42(2): 261-276.
- Améndola R, E. Castillo, P. A. Martínez. 2005. Country pasture/forage resource profiles. Mexico. In: Country pasture profiles. On line: <http://www.fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/Counprof/Mexico/Mexico2.htm>. Consultado el 16-01-2015
- Archimède H., C. Eugène, M. Magdeleine, M. Boval, C. Martin, D. P. Morgavi, P. Lecomte, M. Doreau. 2011. Comparison of methane production between C3 and C4 grasses and Legumes. *Animal Feed Science and Technology*. 166-167: 59–64.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC) 2005. *Official Methods of Analysis*. Edition 18. Association of Official Analytical Chemists. Washington, 29 DC, EE.UU. Pp1928.
- Castro R., A. Hernández, H. Vaquera. J. Hernández, A. R. Quero, J. F. Enríquez y P. Martínez. 2012. Comportamiento productivo de asociaciones de gramíneas con leguminosas en pastoreo. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 35(1):87-95.
- Dávila-Aranda P., R. Lira-Saade, J. Valdés-Reyna. 2004. Endemic species of grasses in Mexico: a phytogeographic approach. *Biodiversity and Conservation* 13: 1101–1121.
- Cobos, M. A., M. T. Yokoyama. 1995. *Clostridium paraputrificum* var. ruminantium: colonization and degradation of shrimp carapaces *in vitro* observed by scanning

- electron microscopy. *In: Rumen Ecology Research Planning, Proceedings of Workshop.* Wallace, R. J., and A. Lahlou-Kassi (eds.). Addis Abeba, Ethiopia. Pp: 151-161.
- Fulkerson, W., J. Neal, C. Clark, A. Horadagoda, K. Nandra, I. Barchia. 2008. Nutritive value of forage species grown in the warm temperate climate of Australia for dairy cows: grasses and legumes. *Livestock Science.* 107: 253-264.
- Harrigan, W. F., M. E. McCance. 1979. *Métodos de Laboratorio en microbiología de alimentos y productos lácteos.* Editorial Academia. León, España. Pp. 419.
- Hook, S.E., A. Wright, B. W. McBride. 2010. Review Article Methanogens: Methane producers of the rumen and mitigation strategies. *Archaea.* 1-11.
- Juárez R., M. Cerrillo, E. Gutiérrez, E. M. Romero, J. Colín, H. B. Barragán. 2009. Estimación del valor nutricional de pastos tropicales a partir de análisis convencionales y de la producción de gas *in vitro*. *Técnica Pecuaria.* 47(1):55-67.
- Kurihara, M., T. Magner, R. A Hunter, G. J. McCrabb. 1999. Methane production and energy partition of cattle in the tropics. *British Journal of Nutrition.* 81: 227–234.
- Lascano, C., J. E. Carulla, J. Vargas. 2011. Strategies for Reducing Methane Emissions from Ruminants. *Revista Brasileira de Geografía Física.* 06: 1315-1335.
- Moss A.R., J. P. Jouany, J. Newbold. 2000. Methane production by ruminants: its contribute on to global warming. *Annales de Zootechnie.* 49: 231–253.
- Martin, C., Morgavi, D.P., Doreau, M. 2010. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal.* 4: 351–365.
- McCrabb, G.J., R.A. Hunter. 1999. Prediction of methane emissions from beef cattle in tropical production systems. *Australian Journal Agriculture Research.* 50: 1335-1339.
- Poulsen, M., B. B. Jensen, R. M. Engberg. The effect of pectin, corn and wheat starch, inulin and pH on *in vitro* production of methane, short chain fatty acids and on the microbial community composition in rumen fluid. *Anaerobe.* 18: 83-90.
- Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos (SARH). 1991. *Las gramíneas de México, Tomo III.* México D.F. Pp: 332. ISBN: 968-800-323-9
- Sauvant, D., and S. Giger-Reverdin. 2009. Modélisation des interactions digestives et de la production de méthane. *INRA Productions Animals.* 22: 375–384.

- Singh, S., B. P. Kushwahab, S. K. Naga, A.K. Mishraa, A. Singha, U. and Anele. 2012. *In vitro* ruminal fermentation, protein and carbohydrate fractionation, methane production and prediction of twelve commonly used Indian green forages. *Animal Feed Science and Technology*. 178: 2–11.
- Avondale, M. H., L. P. Meagher, Z.A. Park-nag, G.C. Wag horn, G.T. Attwood. 2005. Methane production from *in vitro* incubation of Kikuyu grass, lucerne and forages containing condensed tannins. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association*. 67: 147-153.
- Ulyatt M. J., K. R Lassey, I. D Shelton and C. F Walker. 2002. Methane emission from dairy cows and wether sheep fed sub-tropical grass-dominant pastures in mid-summer in New Zealand. *New Zealand Journal of Agricultural Research*. 45(4): 227-234.
- Van Soest, P.J., J. B. Robertson, B.A. Lewis.1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*. 74:3583-3579.

4. EXPERIMENTO II. COMPARACIÓN *in vitro* DEL POTENCIAL DE PRODUCCIÓN DE BIOGÁS, CH₄, CO₂ Y OTRAS VARIABLES QUÍMICO-FERMENTATIVAS DE SEIS GRANOS

Mayra Iliana Rivas Martínez, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2015

4.1 RESUMEN

En la presente investigación se evaluaron tres tipos de maíz (Cordillera Tres Encinos, Ixcamilpa y maíz blanco) y tres de sorgo (Chietla, Cohetzala y con panoja) utilizados en México en la alimentación de ganado lechero y de carne. La evaluación se realizó mediante técnicas de producción de biogás *in vitro*. La producción de biogás fue cuantificada a 24, 48 y 72 h de fermentación y las proporciones de CH₄ y CO₂ fueron obtenidas por cromatografía de gases. Las variables pH, degradación *in vitro* de la materia seca (DIVMS), producción molar de ácidos grasos volátiles (AGV), conteo de bacterias totales (BT) y celulolíticas (BC) fueron cuantificadas a las 72 h de fermentación. El diseño experimental fue completamente al azar y los tratamientos fueron maíz amarillo Cordillera Tres Encinos, maíz amarillo Ixcamilpa, maíz blanco, sorgo Chietla, sorgo Cohetzala y sorgo con panoja, la unidad experimental fue un biofermentador, los datos se analizaron con el procedimiento GLM de SAS y las medias de los tratamientos se compararon con la prueba de Tukey (P<0.05). El sorgo Chietla produjo 48.66 % más (P<0.05) biogás que el maíz amarillo Tres Encinos, y el sorgo Cohetzala produjo mayor (P<0.05) cantidad de CH₄ a 48 h, pero la producción acumulada de CH₄ y la acumulada expresada por 100 M de biogás fue similar entre tratamientos (P>0.05). La población de BT también fue similar (P>0.05), pero la población de BC se redujo en el sorgo Chietla y el sorgo con panoja. El tipo de fermentación que predominó (P<0.05) en el sorgo fue acética y en maíz propiónica. De acuerdo con los resultados se concluye que los granos de sorgo y de maíz tienen fermentaciones diferentes, pero el promedio de CH₄ acumulado fue similar a las 72 h de fermentación.

Palabras clave: CH₄, rumiantes, granos, CO₂, biogás *in vitro*

COMPARISON OF THE *in vitro* POTENTIAL FOR PRODUCTION OF TOTAL BIOGAS, CH₄, CO₂ AND OTHER CHEMICAL AND FERMENTATIVE VARIABLES OF SIX GRAINS

Mayra Iliana Rivas Martínez, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2015

ABSTRACT

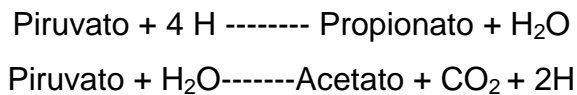
In this research tree corn types (Cordillera Tres Encinos, Ixcamilpa and white corn) and three of sorghum (Chietla, Cohetzala, and panicle), used as feedstuffs for dairy and beef cattle in Mexico, were evaluated. These grains were evaluated by *in vitro* biogas production technique. The biogas production was quantified at 24, 48 and 72 h of fermentation. The CH₄ and CO₂ proportion was obtained by gas chromatography. The pH, *in vitro* dry matter degradation (IVDMD), volatile fatty acids molar production (VFA), total and cellulolytic bacteria population variables were quantified after 72 h of fermentation. The experimental design was completely randomized, the treatments were the yellow corn Cordillera Tres Encinos and Ixcamilpa, white corn, Chietla, Cohetzala and panicle sorghum; the experimental unit was a biofermentor. The data were analyzed using the GLM procedure of SAS and the treatment means were compared with Tukey test ($P < 0.05$). The sorghum Chietla produced 48.66 % more ($P < 0.05$) biogas than the yellow corn Cordillera 3 Encinos, and the sorghum Cohetzala produced more ($P < 0.05$) CH₄ at 48 h. However, the total CH₄ production at 72 h per each 100 g of DM fermented was similar ($P > 0.05$) among treatments. The total bacteria population was similar ($P > 0.05$), but the population of cellulolytic bacteria was reduced ($P < 0.05$) in Chietla sorghum and panicle sorghum. The fermentation type predominant in sorghum was acetic ($P < 0.05$), and propionic in corn. According to the analysis of results it is concluded that both sorghum and corn have different fermentations, but they produce on average the same amount of CH₄ after 72 h of fermentation.

Key words: CH₄, ruminants, grains, CO₂, *in vitro*, biogas

4.2 Introducción

Los granos de cereales proporcionan la mayor cantidad de energía en dietas para vacas lecheras y ganado productor de carne, y se caracterizan por contener compuestos de fermentación rápida principalmente azúcares, almidones, ácidos orgánicos y fructanas (NRC, 2001). Los principales granos utilizados en la alimentación de especies pecuarias en el mundo son el maíz y el sorgo, y en menor proporción la avena y la cebada (Kellems y Church, 2002).

El incremento de granos en las dietas para rumiantes reduce la producción de CH₄ debido principalmente a los cambios en la fermentación ruminal hacia la producción de ácido propiónico (Martin *et al.*, 2010) lo cual disminuye la cantidad de hidrógeno metabólico disponible para la metanogénesis (Knapp *et al.*, 2014), comparado con el ácido acético (Moss *et al.*, 2010) como se muestra a continuación:



La fermentación de carbohidratos produce cantidades diferentes de metabolitos disponibles para la producción de CH₄. Por ejemplo, la fermentación de almidón, azúcar y sus productos finales presentes en mayor cantidad en granos estimulan menor producción de CH₄, comparado con carbohidratos como celulosa (Hindrichsen *et al.*, 2005). Sin embargo, Haque *et al.* (2014) reportan, que no hay diferencias significativas en la reducción de la producción de CH₄ (g día⁻¹), cuando el cambio es limitado en la composición de carbohidratos de la dieta de vacas alimentadas con concentrados ricos en almidón.

El intercambio de un grano por otro también ha causado diferencias en la producción de CH₄. Así, las dietas con maíz comparadas con las de cebada han producido menor cantidad de CH₄ en bovinos en finalización de 9.2 vs 13.1 g por kg de MS consumida y 2.81 vs 4.03 % de energía total consumida (Beauchemin y McGinn, 2005).

Por la importancia de los granos en la alimentación de rumiantes de alto rendimiento y su impacto en la producción de CH₄, se plantearon los siguientes objetivos.

4.3 Objetivo general

Comparar *in vitro* el potencial de producción de CH₄ de seis granos

4.4 Objetivos particulares

- Evaluar *in vitro* las variables: producción de biogás, CO₂, AGV y pH de seis granos.
- Evaluar *in vitro* las variables microbiológicas: concentración de bacterias totales y celulolíticas de seis granos.

4.5 Hipótesis

Los granos de maíz y sorgo proporcionan diferentes nutrientes a las bacterias del rumen, por lo tanto los productos de la fermentación como la síntesis de CH₄, son diferentes.

4.6 Materiales y métodos

4.6.1 Material a evaluar y tratamientos

Los granos evaluados fueron seis, dos muestras de maíz amarillo de las localidades de Ixcamilpa de Guerrero y Cordillera Tres Encinos, el maíz blanco de Ixcamilpa de Guerrero y los dos granos de sorgo de las localidades de Cohetzala y Chietla, y el sorgo con panoja de Cohetzala. Todas las localidades de procedencia se ubican en el estado de Puebla. Cada ingrediente fue considerado como un tratamiento (seis tratamientos) y se evaluaron cinco repeticiones por tratamiento.

4.6.2 Análisis químico de los granos

Las muestras de los granos fueron deshidratadas en una estufa de aire forzado RIOSA® a 60°C por 48 h y molidas a 1 mm en un molino Willey (Arthur H. Thomas, Philadelphia, PA) para los análisis posteriores.

La composición química de los granos fue analizada por los procedimientos de la AOAC (2005): materia seca (método 930.15), cenizas (método 942.05) y proteína cruda (PC) (método 984.13), y el contenido de fibra detergente neutro (FDN) y ácido (FDA) se determinó de acuerdo con el método propuesto por Van Soest *et al.* (1991).

4.6.3 Producción de biogás

Para el crecimiento de bacterias ruminales se preparó un medio de cultivo, como el propuesto por Cobos y Yokoyama, (1995), sin fuente de energía (glucosa, celobiosa y almidón), la cual se intercambiaba por el grano a evaluar. Del material molido de cada tratamiento se pesaron 0.5 g y se colocaron en viales serológicos de 120 mL, a los cuales se le adicionaron 45 mL de medio de cultivo, previamente esterilizado y anaerobio; los viales fueron sellados, con tapones de neopreno azul y arillos de aluminio, con una engargoladora marca Weatton®, y se mantuvieron en condiciones de temperatura ambiente (25°C) hasta su análisis.

4.6.4 Trampa de captura de biogás

La trampa de captura fue un vial serológico de 60 mL completamente lleno (sin espacio de cabeza) de solución salina saturada acidificada a pH <2, la cual se preparó con 350 g de sal común (NaCl) disuelta en 1 L de agua y 5 mL de anaranjado de metilo al 0.1 %. El pH fue ajustado con HCl 1N.

4.6.5 Instalación de la técnica de producción de biogás *in vitro*

Los viales serológicos que contenían la muestra y el medio de cultivo, fueron incubados en baño María a 39 °C e inoculados con 5 mL de líquido ruminal fresco centrifugado a 1, 257 x g por 3 min. A los viales con medio de cultivo y el inóculo se le llamó biofermentador, los cuales fueron conectados a las trampas de captura por medio de una manguera Tygon® con un diámetro interior de 3/32", la cual fue adaptada con dos agujas amarillas Terumo® de calibre 20 G x 1" en cada extremo, la trampa de captura tenía una aguja Terumo® 20 G X 1" de color amarillo, que sirvió como válvula de escape para igualar el sistema a la presión atmosférica ambiental y a su vez como válvula de liberación de la solución salina saturada. La trampa fue colocada de cabeza

en una probeta de plástico con una hendidura en V, para obstruir el paso del biogás la manguera fue bloqueada con una pinza de plástico y liberarlo solo a 24, 48 y 72 h de fermentación. Se colocaron dos viales sin inocular por tratamiento para medir el desplazamiento solo por vapor de agua.

4.6.6 Medición de biogás y cuantificación de CH₄ y CO₂

La producción de biogás total se midió por el desplazamiento de la solución salina de las trampas por el biogás producido en los biofermentadores, a este volumen se le restó el vapor de agua producido. La proporción de CH₄ y CO₂ fue determinada tomando una muestra de 300 µL del biogás presente en el espacio de cabeza de las trampas, la cual fue inyectada a un cromatógrafo de gases marca PerkinElmer modelo Clarus 500. Las condiciones de trabajo fueron: temperatura del horno, 80 °C, columna empacada (PKD), 170 °C y detector de conductividad térmica, 130 °C. Los tiempos de retención fueron: 0.71 min para CH₄ y 1.05 min para CO₂. El gas acarreador fue helio a un flujo de 23 mL m⁻¹.

La concentración molar de CH₄ y CO₂ fue calculada utilizando el volumen de biogás total y la proporción obtenida por cromatografía de gases de CH₄ y CO₂. Con esta información se utilizó la ecuación de los gases ideales y el volumen correspondiente a cada gas.

$$N = (PV) / (RT)$$

Donde:

N=concentración molar de CH₄ o CO₂

P=presión ejercida por CH₄ o CO₂ en atmosferas

V=volumen en litros

R=constante de los gases ideales 0.0821 L Atmosfera (K. M)⁻¹

T=temperatura en °K

4.6.7 Medición de pH

Una vez concluidas las 72 h de fermentación se abrieron los biofermentadores y se midió pH con un potenciómetro ORION® modelo 250A calibrado a pH 4 y 7.

4.6.8 Evaluación de la degradación *in vitro* de la MS

Después de 72 horas de fermentación el residuo de los biofermentadores se filtró en papel Whatman® 541 de 70 mm de diámetro, con una bomba de vacío. El residuo recuperado se secó a 60°C en una estufa Riossa® por 24 h, se pasó a un desecador y se pesó en una balanza analítica.

La degradación *in vitro* de la MS (DIVMS) se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ DIVMS} = ((\text{MS inicial} - \text{MS final}) / (\text{MS inicial})) * 100$$

4.6.9 Cuantificación de AGV

Al final de la fermentación se tomó una alícuota de 1 mL del sobrenadante de cada biofermentador, las muestras se mezclaron en 0.25 mL de ácido metafosfórico (Relación 4:1 v/v); y se centrifugaron a 20, 817 x g en una centrifuga Ilettich zentrifugen® Modelo EBA 21, el sobrenadante se transfirió a viales para cromatografía y se guardaron en congelación hasta su posterior análisis.

El análisis se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases Clarus 500 PerkinElmer®, con un detector de ionización de flama, y columna capilar Elite FFAP PerkinElmer®, las condiciones del análisis fueron temperatura del horno; 115 °C por 0.25 min, 125 °C por 0.5 min y 130 °C por 5.25 min, la temperatura de la columna fue 250 °C, el gas acarreador que se uso fue nitrógeno con un flujo de 23.3 mL min⁻¹ y aire e hidrógeno para combustión de la flama, la inyección se realizó con un automuestreador con un volumen de inyección de 1 µL. Los tiempos de retención fueron de 1.3, 1.6 y 2.15 min para el ácido acético, ácido propiónico y el ácido butírico, respectivamente.

4.6.10 Conteo de bacterias totales y celulolíticas

Una muestra de 1 mL de la parte líquida del biofermentador fue tomada a las 72 h de fermentación y fijada en 0.25 mL de formaldehído al 10 %. Las muestras se mantuvieron en refrigeración a 4 °C para conservarlas hasta el conteo. Para determinar

la concentración de bacterias totales, se realizó el conteo directo en una cámara Petroff Hausser® en un microscopio de contraste de fases Olympus® a una magnificación total de 1000 X.

La concentración de bacterias ruminales por mL se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Bacterias por mL} = \bar{X} (FD_1) (FD_2) (2 \times 10^7)$$

Dónde:

\bar{X} = Promedio de las bacterias observadas en los cuadros de la cámara Petroff-Housser®.

FD_1 = valor inverso de la dilución usada con formaldehído

FD_2 = valor inverso de dilución con agua

2×10^7 = valor obtenido por el volumen de la cámara

El medio de cultivo utilizado para el crecimiento de bacterias celulolíticas fue similar al utilizado para bacterias totales (Cobos y Yokoyama, 1995), la fuente de energía (glucosa, celobiosa y almidón) se intercambi6 por una tira de papel Whatman® N° 541 por tubo, se utilizaron tubos de 13x100 mm, los cuales se llenaron con 4.5 mL de medio de cultivo e inoculados con 0.5 mL de in6culo tomado de la parte l6quida de los biofermentadores a 72 h de fermentaci6n, los tubos de cultivo se incubaron a 39 °C por 10 d6as. El n6mero de bacterias celulol6ticas fue calculado por la t6cnica del n6mero m6s probable (NMP), usando diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-10} con tres repeticiones por diluci6n (Harrigan y McCance, 1979).

4.6.11 An6lisis estad6stico

El dise6o experimental fue completamente al azar, los tratamientos fueron ma6iz amarillo Ixcamilpa, ma6iz amarillo Cordillera Tres Encinos, sorgo Cohetzala, sorgo Chietla y sorgo con panoja, con cinco repeticiones cada uno, y la unidad experimental fue un biofermentador (un vial de 120 mL con 45 mL de medio de cultivo e inoculado con 5 mL de l6quido ruminal fresco). Los datos se analizaron con el procedimiento GLM de SAS 9.3. Los datos de la producci6n de biog6s se analizaron para 24, 48 y 72 h, mientras que para la variable concentraci6n de bacterias totales se hizo una transformaci6n logar6tmica para cumplir con la homogeneidad de varianzas para hacer

el análisis. Las medias de los tratamientos se compararon con la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

El modelo estadístico fue el siguiente:

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

Dónde:

Y_i = variable respuesta

μ = media general

T_j = efecto del j-ésimo tratamiento (granos)

e_{ij} = Efecto aleatorio del término del error, donde se asume que el error se distribuye: $e_{ij} \sim \text{NIID}(0, \sigma_e^2)$.

El nivel de alfa fue fijado en $\alpha = 0.05$ y se hizo notar una posible diferencia cuando el valor de P fuera < 0.10 .

4.7 Resultados

4.7.1 Análisis químico de los granos evaluados

Los ingredientes evaluados (Cuadro 12) contenían: 88.06 a 92.67 % de MS, 92.8 a 98.63 % de MO, 8.23 a 10.15 % de PC, 12.12 a 33.6 % de FDN y 3.75 a 17.41 % de FDA. El sorgo Cohetzala tuvo la mayor cantidad de FDN y FDA.

4.7.2 Variables de producción de biogás

La mayor concentración molar de biogás de los tratamientos fue en las primeras 24 h de fermentación, después hay una fase de menor producción de 24 a 48 h, y de 48 a 72 h la producción de biogás fue mínima y estable (Figura 2).

Cuadro 12. Análisis químico de seis granos

Granos	MS	MO	Cenizas	PC	FDN	FDA
Maíz amarillo Ixcamilpa	88.06	98.63	1.37	8.23	15.26	4.54
Maíz amarillo Cordillera 3 encinos	88.73	98.43	1.57	10.15	16.36	4.42
Maíz blanco	88.70	98.41	1.59	8.71	12.12	3.75
Sorgo Cohetzala	91.04	96.68	3.32	8.55	33.6	17.41
Sorgo Chietla	90.65	97.18	2.82	8.69	27.66	8.2
Sorgo con panoja	92.67	92.8	7.20	8.34	21.12	10.0

MS: Materia seca; MO: materia orgánica; PC: proteína cruda; FDN: fibra detergente neutro; FDA: fibra detergente ácido.

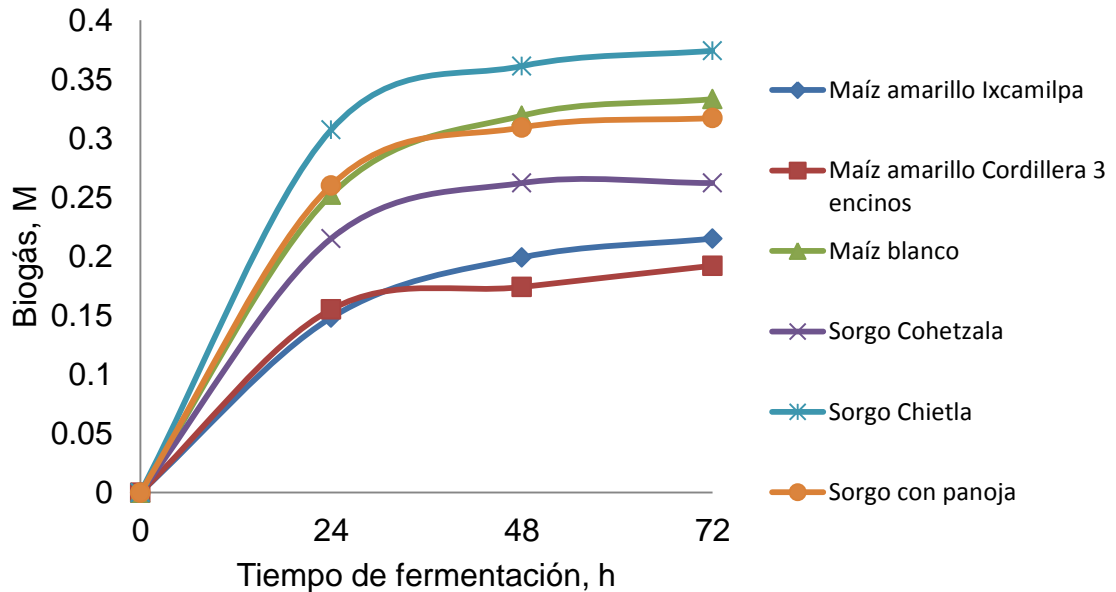


Figura 2 Concentración molar de biogás *in vitro* de granos

El sorgo Chietla produjo 48.66 % más concentración molar de biogás ($P < 0.05$) comparado con el maíz amarillo Cordillera tres encinos, pero sin diferencia con el resto de los ingredientes (Cuadro 13). Este comportamiento se observó desde las primeras 24 h de fermentación y hasta las 72 h.

Cuadro 13. Concentración molar de biogás acumulado por 100 g de MS en seis granos

Tiempo de fermentación, h	24	48	72
Tratamiento	biogás acumulado, M		
Maíz amarillo Ixcamilpa	0.148 ^b	0.199 ^{ab}	0.215 ^{ab}
Maíz amarillo Cordillera 3 encinos	0.155 ^b	0.174 ^b	0.192 ^b
Maíz blanco	0.252 ^{ab}	0.319 ^{ab}	0.333 ^{ab}
Sorgo Cohetzala	0.215 ^{ab}	0.262 ^{ab}	0.262 ^{ab}
Sorgo Chietla	0.307 ^a	0.361 ^a	0.374 ^a
Sorgo con panoja	0.260 ^{ab}	0.309 ^{ab}	0.317 ^{ab}
EEM	0.032	0.038	0.038
Valor de P	0.018	0.018	0.025

^{a, b, c} Valores con literales diferentes en una columna son diferentes estadísticamente (Tukey; $P < 0.05$); EEM: Error estándar de la media; M: Concentración molar.

La concentración molar de CH_4 acumulado (Cuadro 14) en las primeras 24 h de fermentación fue similar para todos los ingredientes, con tendencia ($P = 0.057$) de ser mayor en el sorgo Cohetzala, el cual produjo en promedio 34.89 % más CH_4 que los otros ingredientes. En el periodo de 24 a 48 h, el sorgo Cohetzala produjo mayor ($P < 0.05$) cantidad de CH_4 , comparado con el maíz Cordillera Tres Encinos ($P < 0.05$), y finalmente, a las 72 h no hubo diferencias entre los ingredientes ($P > 0.05$).

La concentración molar de CO_2 acumulado (Cuadro 14) en el primer periodo de fermentación de 0 a 24 h fue similar entre ingredientes ($P > 0.05$), en promedio 0.033 M por 100 g de MS. De 24 a 48 h la producción de CO_2 acumulado fue diferente ($P < 0.05$) entre ingredientes, porque el sorgo Cohetzala produjo 55.88 % más CO_2 que el maíz amarillo Cordillera tres encinos, y de 48 a 72 h la concentración molar de CO_2 no cambió ($P > 0.05$) entre tratamientos.

Cuadro 14. Concentración molar de CH₄ y CO₂ acumulados por 100 g de MS en seis granos

Tiempo de fermentación, h	24	48	72
Tratamiento	CH ₄ acumulado, M		
Maíz amarillo Ixcamilpa	0.024 ^a	0.043 ^{ab}	0.048 ^a
Maíz amarillo Cordillera 3 encinos	0.025 ^a	0.030 ^b	0.038 ^a
Maíz blanco	0.027 ^a	0.046 ^{ab}	0.051 ^a
Sorgo Cohetzala	0.047 ^a	0.068 ^a	0.068 ^a
Sorgo Chietla	0.041 ^a	0.050 ^{ab}	0.053 ^a
Sorgo con panoja	0.036 ^a	0.055 ^{ab}	0.061 ^a
EEM	0.004	0.005	0.007
Valor de P	0.057	0.043	0.200
	CO ₂ acumulado, M		
Maíz amarillo Ixcamilpa	0.124 ^a	0.156 ^{ab}	0.167 ^{ab}
Maíz amarillo Cordillera 3 encinos	0.130 ^a	0.143 ^b	0.153 ^b
Maíz blanco	0.225 ^a	0.274 ^{ab}	0.282 ^{ab}
Sorgo Cohetzala	0.168 ^a	0.194 ^{ab}	0.194 ^{ab}
Sorgo Chietla	0.266 ^a	0.311 ^a	0.321 ^a
Sorgo con panoja	0.223 ^a	0.253 ^{ab}	0.257 ^{ab}
EEM	0.032	0.025	0.036
Valor de P	0.031	0.019	0.1904

^{a, b, c} Valores con literales diferentes en una columna son diferentes estadísticamente (Tukey; P<0.05); EEM: Error estándar de la media; M: concentración molar.

La concentración molar de CH₄ y CO₂ (Cuadro 15) fue similar (P>0.05) entre tratamientos a 24, 48 y 72 h; por cada 100 M de biogás, en promedio se produjeron 18.89 M de CH₄ y 81.11 M de CO₂.

Cuadro 15. Concentración molar de CH₄ y CO₂ por cada 100 M de biogás producidos, de seis granos.

Hora/Tratamiento	Tiempo de fermentación, h					
	24	48	72	24	48	72
	CH ₄ , M			CO ₂ , M		
Maíz amarillo Ixcamilpa	20.68 ^a	24.38 ^a	24.73 ^a	79.31 ^a	75.62 ^a	75.26 ^a
Maíz amarillo Cordillera 3 encinos	16.68 ^a	17.77 ^a	19.87 ^a	83.31 ^a	82.22 ^a	80.13 ^a
Maíz blanco	10.89 ^a	14.57 ^a	15.36 ^a	89.11 ^a	85.42 ^a	84.64 ^a
Sorgo Cohetzala	22.08 ^a	25.67 ^a	25.67 ^a	77.92 ^a	74.33 ^a	74.33 ^a
Sorgo Chietla	14.81 ^a	14.26 ^a	14.56 ^a	85.82 ^a	85.74 ^a	85.83 ^a
Sorgo con panoja	16.90 ^a	20.01 ^a	21.21 ^a	83.09 ^a	79.98 ^a	78.79 ^a
EEM	4.350	3.60	3.56	4.35	3.60	3.56
Valor de P	0.506	0.165	0.194	0.506	0.165	0.190

^{a, b, c} Valores con literales diferentes en una columna son diferentes estadísticamente (Tukey; P<0.05); EEM: Error estándar de la media; M: concentración molar.

4.7.3 Variables químico-fermentativas

El pH (Cuadro 16) para los tratamientos tuvo un valor ligeramente ácido (6.28), que se considera un poco riesgoso para el crecimiento de bacterias celulolíticas, las cuales se desarrollan en un pH muy cercano a neutro (6.8 a 7.2). Hubo un pH similar (P>0.05) entre los granos, y únicamente el maíz blanco y el maíz Ixcamilpa (6.17 y 6.2) mostraron un pH ligeramente ácido después de 72 h de fermentación.

La DIVMS (Cuadro 16) fue diferente (P<0.05) entre ingredientes porque el maíz Ixcamilpa y sorgo con panoja fueron degradados en mayor proporción que el maíz amarillo Cordillera tres encinos, maíz blanco y sorgo Cohetzala (77.22 vs 59.18 %).

Cuadro 16. pH y Degradación *in vitro* de la materia seca de seis granos

Tratamiento	pH	DIVMS, %
Maíz amarillo Ixcamilpa	6.2 ^b	76.21 ^a
Maíz amarillo Cordillera tres encinos	6.31 ^a	59.39 ^{bc}
Maíz blanco	6.17 ^b	63.90 ^{bc}
Sorgo Cohetzala	6.38 ^a	54.25 ^c
Sorgo Chietla	6.26 ^{ab}	69.21 ^{ab}
Sorgo con panoja	6.38 ^a	78.24 ^a
EEM	0.36	2.61
Valor de P	0.0005	<0.0001

^{a, b, c} Valores con literales diferentes en una columna son diferentes estadísticamente (Tukey; P<0.05); EEM: Error estándar de la media; DIVMS: Degradación *in vitro* de la materia seca.

La producción molar de AGV (Cuadro 17) tuvo diferencias (P<0.05), y fue mayor con 13.26 mM para el maíz comparado con el sorgo (151.67 vs 131.5 mM), mientras que la proporción molar de ácido acético fue mayor para el sorgo comparado con el maíz (+7.7 %).

Cuadro 17. Concentración molar de ácidos grasos volátiles en seis granos

Tratamiento	Acético	Propiónico	Butírico	Total mM
	mM por 100 mM producidos			
Maíz amarillo Ixcamilpa	39.17 ^b	41.48 ^a	19.35 ^{ab}	156.62 ^a
Maíz amarillo Cordillera 3 encinos	40.41 ^b	41.32 ^{ab}	18.26 ^b	148.84 ^a
Maíz blanco	38.62 ^b	41.30 ^{ab}	20.09 ^a	149.56 ^a
Sorgo Cohetzala	47.11 ^a	37.64 ^c	15.24 ^c	129.63 ^b
Sorgo Chietla	47.14 ^a	38.88 ^b	13.97 ^c	133.60 ^b
Sorgo con panoja	47.07 ^a	38.05 ^c	14.87 ^c	131.44 ^b
Error estándar de la media	0.67	0.60	0.34	2.75
Valor de P	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

^{a, b, c} Valores con literales diferentes en una columna son diferentes estadísticamente (Tukey; P<0.05); EEM: Error estándar de la media; mM: concentración milimolar.

La producción de los ácidos propiónico y butírico fue mayor para el maíz comparado con el sorgo (+3.17 y +4.53 mM, respectivamente). Por lo que se infiere que el tipo de fermentación que se desarrolló con maíz fue propiónica, mientras que en el sorgo fue acética.

La concentración de bacterias totales fue similar ($P < 0.05$) entre tratamientos en promedio 1.67×10^{10} ; sin embargo, la concentración de bacterias celulolíticas (Cuadro 18) fue afectada por el tipo de sustrato fermentado y su población se redujo en la fermentación de sorgo con panoja y sorgo Chietla.

Cuadro 18. Concentración de bacterias totales y celulolíticas a las 72 h de fermentación de seis granos

Tratamiento	Bacterias totales	Bacterias celulolíticas	Límite inferior	Límite superior
Maíz amarillo	1.54E+10	4.00E+08	1.50E+07	4.80E+08
Ixcamilpa				
Maíz amarillo cordillera	1.42E+10	2.30E+06	4.00E+05	1.20E+07
Maíz blanco	1.97E+10	1.50E+07	3.00E+06	4.40E+07
Sorgo Cohetzala	1.82E+10	2.40E+07	3.60E+06	1.30E+08
Sorgo Chietla	1.48E+10	1.40E+05	3.00E+03	9.70E+05
Sorgo con panoja	1.82E+10	3.00E+06	5.00E+05	2.70E+07
EEM	0.090			
Valor de P	0.453			

No hubo diferencias significativas en la población de bacterias totales ($P > 0.05$; Tukey); EEM: Error estándar de la media.

4.8 Discusión

La fermentación de los granos de sorgo y de maíz fue diferente. El hecho de que la fermentación haya sido principalmente acética con el sorgo y propiónico-butírica con el maíz, indicaría que la producción de biogás y CH_4 es mayor con el sorgo, dado que en una fermentación acética se libera más H_2 y se favorece la producción de CH_4 . Sin

embargo, en esta investigación no fue constante porque el maíz proveniente de Cordillera tres encinos redujo la producción de biogás y de CH₄, comparado con el sorgo Chietla a 48 h, aunque al final de la incubación fueron similares entre ingredientes. Esto puede atribuirse al menor contenido de fibra FDN del maíz comparado con el sorgo.

El tipo de ácidos grasos producido en la fermentación tiene un efecto directo sobre la cantidad de H⁺ y CH₄ liberados. Así, la formación de ácido acético es paralela a la del H⁺ (4 M de hidrógeno por 1 M de acético), mientras que la del ácido propiónico implica captura de H⁺ (2 M de hidrógeno por 1 M de propiónico), por lo que las emisiones de CH₄, aumentan en paralelo a la relación acético/ propiónico (Moss *et al.*, 2000; Knapp, 2014). Esto no sucedió en el presente experimento porque las diferencias en la fermentación no se reflejaron en la producción de CH₄ y biogás. Los resultados en otras investigaciones han sido inconsistentes. Según Haque *et al.* (2014), las dietas para rumiantes con carbohidratos de fermentación rápida como almidón y azúcar no incrementaron la producción de biogás. En contraste, Hindrichsen (2004) señala la importancia de tomar en cuenta el tipo de carbohidratos de la dieta para poder definir su potencial de CH₄. En los modelos estequiométricos para predecir la producción de CH₄ se toma en cuenta la producción y el tipo de ácidos grasos predominante en la fermentación como parte de la predicción de la producción de CH₄ (Ghimire *et al.*, 2014).

La reducción de bacterias celulolíticas en el sorgo con panoja y sorgo Chietla puede atribuirse a la reducción en pH por la acumulación de AGV, ya que pH menores de 6.8 reducen la cantidad de bacterias celulolíticas lo cual es mencionado con Mouriño *et al.* (2001), quienes reportaron que las bacterias celulolíticas reducen su población a pH de 6.3; las bacterias celulolíticas también pudieron ser afectadas por la cantidad de taninos que contienen algunos tipos de sorgos. En el presente estudio no se cuantificó la cantidad de taninos presentes en el sorgo, los cuales pueden blindar a los carbohidratos estructurales disminuyendo su digestibilidad y las poblaciones microbianas (Silanikove *et al.*, 2001); además, la digestibilidad de la MS es reducida

por el contenido de taninos (Oliveira *et al.*, 2007). En el presente estudio no se redujo la degradación de la MS, pero sí disminuyó la cantidad de bacterias celulolíticas.

4.9 Conclusiones

La mayor concentración molar de biogás de los granos ocurre en las primeras 24 h de fermentación; el maíz amarillo proveniente de la Cordillera Tres Encinos disminuyó la producción de biogás, pero no de CH₄ a las 72 h de fermentación.

El tipo de ingrediente influyó en las variables fermentativas, pero no en la producción de CH₄, por lo cual un grano de maíz puede ser sustituido por sorgo sin que se afecte de manera significativa la producción *in vitro* de CH₄.

Literatura citada

- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 2005. Official Methods of Analysis. Edition 18. Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC, EE.UU. Pp 1928.
- Beauchemin, K. A., S. M. McGinn. 2005. Methane emissions from feedlot cattle fed barley or corn diets. *Journal of Animal Science*. 83:653-661.
- Cobos, M. A., and M. T. Yokoyama. 1995. *Clostridium paraputrificum* var *ruminantium*: colonization and degradation of shrimp carapaces *in vitro* observed by scanning electron microscopy. *In: Rumen Ecology Research Planning, Proceedings of Workshop*. Wallace, R. J., and A. Lahlou-Kassi (eds.). Addis Abeba, Ethiopia, Pp: 151-161.
- Ghimire, S., P. Gregorini and M. D. Hanigan. 2014. Evaluation of predictions of volatile fatty acid production rates by the Molly cow model. *Journal of Dairy Science*. 97:354–362.
- Haque, M. N., C. Cornou, J. Madsen. 2014. Estimation of methane emission using the CO₂ method from dairy cows fed concentrate with different carbohydrate compositions in automatic milking system. *Livestock Science*. 164: 57–66.
- Harrigan W. F., M. E. McCance. 1979. Métodos de laboratorio en microbiología de alimentos y productos lácteos. ED. Academia. León España. Pp 419.
- Hindrichsen, I. K., H. R. Wettstein, M. Kreuzer, A. Machmüller. 2005. Effect of the carbohydrate composition of feed concentrates on methane emission from dairy cows and their slurry. *Environmental Monitoring and Assessment*. 107 (1-3): 329-350.

- Kellems R. O., D. C. Church. 2002. High-energy feedstuffs. *In: Livestock feeds and feeding*. Kellems R. O., D.C. Church (Eds). 5^a ed. ED. Prentice Hall. New Jersey. Pp: 86-116.
- Knapp, J. R., G. L. Laur, P. A. Vadas, W. P. Weiss, J. M. Tricarico. 2014. Enteric methane in dairy cattle production. Quantifying the opportunities and impact of reducing emissions: Invited review: *Journal of Dairy Science*. 97:3231–3261.
- Martin, C., D. P. Morgavi, M. Doreau. 2010. Methane mitigation in ruminants: From microbe to the farm scale. *Animal*. 4:351-365.
- Moss, A. R., J. P. Jouany, J. Newbold. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Annales de Zootechnie*. 49: 231–253.
- Mourino, F., R. Akkarawongsa, P. J. Weimer. 2001. Initial pH as a determinant of cellulose digestion rate by mixed ruminal microorganisms *in vitro*. *Journal of Dairy Science*. 84:848-859.
- Oliveira, S. G., T. T. Berchielli, M.S. Pedreira, O. Primavesi, R. Frighetto, M. A. Lim. 2007. Effect of tannin levels in sorghum silage and concentrate supplementation on apparent digestibility and methane emission in beef cattle. *Animal Feed Science and Technology*. 135:236–248.
- Silanikove, N., A. Perevolotsky, F. D Provenza. 2001. Use of tannin-binding chemicals to assay for tannins and their negative postingestive effects in ruminants. *Animal Feed Science and Technology*. 91: 69–81.
- Van Soest, P.J., J. B. Robertson, B.A. Lewis.1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*. 74: 3583-3579.

5. EXPERIMENTO III. EVALUACIÓN *in vitro* DEL POTENCIAL DE PRODUCCIÓN DE CH₄ Y OTRAS VARIABLES QUÍMICO-FERMENTATIVAS DE SEIS LEGUMINOSAS

Mayra Iliana Rivas Martínez, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2015

5.1 RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue caracterizar seis leguminosas usadas para alimentar rumiantes en México, según su potencial para producir biogás y metano (CH₄). Las leguminosas (tratamientos) fueron: alfalfa (*Medicago sativa* var. *Oaxaca* y *Atlixco*), leucaena (*Leucaena leucocephala*), huizache (*Acacia farnesiana*), trébol blanco (*trifolium repens*) y cacahuate forrajero (*Arachis pinto*); y fueron fermentadas 72 h a 39°C, usando fluido ruminal fresco como inóculo. La producción de biogás fue medida a 24, 48 y 72 h de fermentación y la proporción de CH₄ y CO₂ se cuantificó por cromatografía de gases; A 72 h se midió pH, AGV, concentración de bacterias totales, y celulolíticas, y se calculó la degradación *in vitro* de la materia seca (DIVMS). La producción de biogás total (CH₄ y CO₂) fue mayor (P<0.05) para las dos variedades de alfalfa y produjeron 75 % más CH₄ a las 24 h de fermentación, respecto al huizache. A las 48 h las dos variedades de alfalfa, trébol, y cacahuate forrajero produjeron 50 % más (P<0.05) CH₄ que la leucaena y el huizache, y a las 72 h tendió a disminuir (P=0.08) la producción de CH₄ en la leucaena. Las dos alfalfas, trébol y leucaena produjeron 31 % más AGV (P<0.001), comparados con huizache y cacahuate forrajero. La alfalfa var. *Atlixco* y el trébol produjeron 10.81 % más propiónico. La producción de ácido butírico fue mayor (P<0.001) para cacahuate forrajero. La población de bacterias celulolíticas fue afectada por la leucaena y el huizache. Pero el pH, ácido acético y población de bacterias totales no tuvieron diferencias significativas (P>0.05). La DIVMS fue mayor para alfalfa var. *Atlixco*, en comparación con la leucaena y huizache. El análisis de los resultados muestra que la leucaena puede reducir la producción de CH₄ si se usa de manera moderada para no afectar la DIVMS y la población de bacterias celulolíticas.

Palabras clave: CH₄, CO₂, leguminosas, rumiantes.

EVALUATION OF THE *in vitro* CH₄ PRODUCTION POTENTIAL AND OTHER CHEMICAL-FERMENTATIVE OF SIX LEGUMES

Mayra Iliana Rivas Martínez, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2015

ABSTRACT

Six legumes utilized for feeding ruminants in Mexico were characterized in order to identify those with low potential for biogas and methane (CH₄) production. Legumes evaluated in this trial were: alfalfa (*Medicago sativa* varieties *Oaxaca* and *Atlixco*), leucaena (*Leucaena leucocephala*), huizache (*Acacia farnesiana*), white clover (*trifolium repens*) and forage peanut (*Arachis pinto*). Legumes were fermented for 72 h at 39°C using ruminal fluid as inoculum. Biogas production was measured at 24, 48 and 72 h of fermentation. The proportion of CH₄ and CO₂ was measured using gas chromatography. At 72 h, pH, VFA, concentration of total bacteria and cellulolytic bacteria were measured, and *in vitro* dry matter degradability (IVDMD) was also measured. At 24 h, total biogas production (CH₄ and CO₂) for both varieties of alfalfa was greater (P< 0.05) by 75 % compared to huizache. At 48 h, both varieties of alfalfa, clover, and Arachis yielded on average 50 % more CH₄ (P<0.05) compared to leucaena or huizache. At 72 h, CH₄ production for leucaena tended to decreased (P=0.08). Both varieties of alfalfa, clover, and leucaena yielded 31 % more VFA (P< 0.001) compared to huizache or forage peanut. Alfalfa variety Atlixco and clover yielded 10.81 % more propionic acid. Butyric acid production was greatest (P<0.001) for Arachis. Cellulolytic bacterial population was negatively affected by leucaena and by huizache. There were no differences (P>0.05) in pH, acetic acid and total bacterial population across legumes. IVDMD was greater for alfalfa variety Atlixco compared to leucaena or huizache. Analysis of the results show that leucaena may decrease the production of CH₄ if used in moderation so that dry matter degradation and the cellulolytic bacterial population are not negatively affected.

Key words: CH₄, CO₂, forages, ruminants, greenhouse gases

5.2 Introducción

Las leguminosas son el segundo grupo de especies forrajeras más importante, después de las gramíneas, en la alimentación de rumiantes. Las leguminosas forrajeras proveen al animal una fuente de proteína que incrementa el consumo de nitrógeno y la digestibilidad de la dieta, también contienen altas cantidades de carbohidratos altamente fermentables que producen gas en el rumen (Kellems y Church, 2002).

McCaughey *et al.* (1999) reportan que mejorando la calidad de la pradera a través de la adición de leguminosas, como alfalfa, puede reducir la producción de CH₄ en 10 % con praderas compuestas de gramíneas y alfalfa que con sólo gramíneas. La disminución en la producción de CH₄ en dietas que contienen leguminosas, también está asociada al menor contenido de fibra en estos forrajes, respecto a las gramíneas, lo cual reduce el pH, aumenta el amonio, AGV y relación acetato: propionato en el rumen, y tasa de pasaje (Coulman *et al.*, 2000).

El efecto de la inclusión de leguminosas sobre la producción de CH₄ es variable y está influenciado por la presencia de metabolitos secundarios como los taninos y saponinas, factores anti nutricionales que en grandes cantidades traen problemas al bienestar de los animales (Vargas *et al.*, 2012), pero en cantidades mínimas la utilización de éstas puede ser útil para reducir las emisiones de CH₄. Los compuestos presentes en algunas leguminosas actúan como agentes desfaunantes del rumen; lo que influye en la ecología ruminal debido a que los metanógenos se adhieren directamente a los protozoarios y cohabitan simbióticamente, lo que facilita la transferencia de H₂ entre especies (Galindo *et al.*, 2008; Patra y Sexena, 2010), pero de forma simultánea puede ocurrir una depresión en el valor nutricional de la dieta (Tavendale *et al.*, 2005). Esto afecta la digestibilidad del forraje y la utilización del nitrógeno por los rumiantes, lo que puede limitar el uso de algunas leguminosas que contienen cantidades mayores de dichos compuestos, pero, la utilización de leguminosas con una cantidad moderada de taninos puede ser factible (Hess *et al.*, 2006). En leguminosas de clima templado como trébol y alfalfa se reducen las emisiones de CH₄ por unidad de MS consumida debido a un mayor consumo de

alimento, aumento en la tasa de pasaje y al contenido de metabolitos secundarios como malato y saponinas que pueden reducir la producción de CH₄ (Doreau *et al.*, 2011; Vargas *et al.*, 2012).

5.3 Objetivo general

Evaluar la capacidad *in vitro* de producción de CH₄ de seis leguminosas de uso común en la alimentación de rumiantes en México

5.3.1 Objetivos particulares

- Evaluar *in vitro* la producción de biogás, CO₂, AGV y pH de seis leguminosas.
- Evaluar *in vitro* las variables microbiológicas, concentración de bacterias totales y celulolíticas de seis leguminosas.

5.4 Hipótesis

La producción de biogás total y CH₄, difiere según la especie de leguminosa, debido a las características fermentativas de cada una.

5.5 Materiales y métodos

5.5.1 Ubicación geográfica del estudio

La investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología Ruminal y Genética Microbiana del programa de IREGEP-Ganadería, Colegio de Postgraduados, Ubicado en km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo Texcoco, Estado de México.

5.5.2 Material evaluado

Las leguminosas evaluadas fueron: alfalfa (*Medicago sativa*) var. Oaxaca y Atlixco, cacahuate forrajero (*Arachis pinto*), huizache (*Acacia farnesiana*), Leucaena (*Leucaena leucocephala*) y Trébol blanco (*Trifolium repens*), las primeras cinco plantas se recolectaron en el Estado de Puebla y el trébol en la granja del Colegio de Postgraduados.

Las muestras fueron deshidratadas en una estufa de aire forzado a 60°C por 48 h, molidas a 1 mm en un molino Willey (Arthur H. Thomas, Philadelphia, PA), posteriormente se llevaron a peso constante y pesaron para los diferentes análisis.

La composición química de los ingredientes se obtuvo de lo reportado por Bárcena *et al.* (2010) para cinco de los ingredientes utilizados, mientras que el análisis químico del trébol blanco se realizó con los procedimientos de la AOAC (2005): materia seca (método 930.15), cenizas (método 942.05), y proteína cruda (PC) (método 984.13). Y el contenido de fibra detergente neutro (FDN) y ácido (FDA), se determinó de acuerdo con el método propuesto por Van Soest *et al.* (1991).

5.5.3 Medio de cultivo para bacterias totales

En viales serológicos de 120 mL se adicionó 0.5 g de las leguminosas (cinco repeticiones por tratamiento), se registró el peso del sustrato y se le añadió 1 mL de agua destilada, y se esterilizaron los viales con el sustrato a 121°C y 15 psi, durante 15 min. Después se adicionaron 45 mL de medio de cultivo para bacterias totales Cobos y Yokoyama, (1995), cambiando la fuente de energía por las leguminosas a evaluar. El medio de cultivo se mantuvo bajo condiciones de esterilidad y flujo de CO₂ para mantener la anaerobiosis. Los viales fueron sellados con tapones de neopreno azules y arillos de aluminio con una engargoladora marca Weatton®, y se mantuvieron en condiciones de temperatura ambiente hasta su uso posterior.

5.5.4 Preparación de la trampa de captura de biogás

La trampa de captura del biogás fue un vial serológico de 60 mL completamente lleno (sin espacio de cabeza) de solución salina saturada acidificada pH<2, la cual se preparó con 350 g de sal común (NaCl) disuelta en un litro agua y 5 mL de anaranjado de metilo al 0.1 %. El pH fue ajustado con HCl 1N. Las trampas de captura tenían una aguja Terumo® calibre 20 G X 1" que sirvió como válvula de escape para igualar la presión atmosférica.

5.5.5 Inoculación de los medios de cultivo y montaje del sistema de producción de biogás *in vitro*

Los medios de cultivo fueron colocados en un baño María a 39°C, e inoculados con 5 mL de líquido ruminal fresco extraído de una vaca Jersey después de la alimentación de la mañana. Para trasladar el inoculo se conservó a 39°C en un termo cerrado; el líquido ruminal fue filtrado y centrifugado a 1, 257 x *g* por 3 min, para eliminar protozoarios, partículas de alimento y concentrar la cantidad de bacterias, que fue de 10⁸ mL⁻¹. El término de la inoculación se consideró la hora cero para las mediciones de biogás. Cada vial fue conectado a una trampa de captura, por medio de una manguera de Tygon® 3/3210 x 1/32 de 40 cm adaptada a una aguja en cada extremo de la marca Terumo® de calibre 20 G X 1". La trampa de captura se colocó sobre una probeta modificada con una hendidura en V en la parte superior. El paso del biogás de la trampa se obstruyó con una pinza de plástico hasta su liberación a 24, 48 y 72 h de fermentación.

5.5.6 Producción de biogás

El volumen de biogás se midió por el volumen que desplazó la solución salina de la trampa de captura a 24, 48 y 72 h de fermentación, las trampas se retiraron después de tomar la lectura y se almacenaron de manera invertida a temperatura ambiente para evitar que el biogás atrapado se escapara, hasta su posterior análisis.

La proporción de CH₄ y CO₂ se determinó en un cromatógrafo de gases PerkinElmer® modelo Clarus 500, con un detector de conductividad térmica y una columna empacada Porapak, las temperaturas del horno, detector y columna empacada fueron de 80, 130 y 170 °C, respectivamente, el gas helio se usó como gas acarreador a 22.3 mL min⁻¹ y el volumen de inyección fue de 300 µL. Los tiempos de retención fueron 0.73 min para el CH₄ y 1.05 min para el CO₂.

La producción de biogás total, CH₄ y CO₂, se calculó con la ecuación general de los gases ideales (Posada y Noguera, 2005), con la información obtenida en el desplazamiento de biogás y las proporciones de CH₄ y CO₂.

$$\text{Concentración molar de biogás} = \frac{P * V}{R * T}$$

Donde:

P: presión atmosférica (Atm.)

V: volumen de biogás (L)

R: constante de los gases;

T: temperatura (°K)

5.5.7 pH

Una vez concluidas las 72 h de fermentación se abrieron los viales y se midió pH con un potenciómetro ORION® modelo 250A calibrado a pH 4 y 7.

5.5.8 Degradación *in vitro* de la MS

Concluidas las 72 h de fermentación se filtró la MS no degradada en un sistema de filtrado de bomba de vacío, en papel filtro Whatman® 514, previamente secado y pesado; el residuo recuperado se deshidrató a 60°C en una estufa Riossa®, por 24 h, posteriormente se pasó a un desecador PYREX®, para que se enfriara y se pesó en una balanza analítica.

La DIVMS se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{DIVMS} = \frac{(\text{Materia seca inicial} - \text{materia seca final})}{\text{materia seca inicial}} * 100$$

5.5.9 Concentración molar de AGV

Después de las 72 h de fermentación se tomó una muestra de 1 mL de la parte líquida del biofermentador, la cual se fijó en 0.25 mL de ácido metafosfórico al 25 % para guardar la relación 4:1. Las muestras se centrifugaron a 20,817 x g, en una centrifuga Ilettich zentrifugen® Modelo EBA 21, y el sobrenadante se transfirió a viales para cromatografía que se guardaron en congelación hasta su análisis.

El análisis se realizó en un cromatógrafo de gases Clarus 500 de la marca PerkinElmer, con un detector de ionización de flama, y columna capilar Elite FFAP

PerkinElmer®. Las condiciones del análisis fueron las siguientes: temperatura del horno; 115 °C por 0.25 min, 125 °C por 0.5 min y 130 °C por 5.25 min, la temperatura de la columna fue 250 °C, el gas acarreador fue nitrógeno a flujo de 23.3 mL min⁻¹ y aire e hidrógeno para combustión de la flama, y se usó un detector de ionización de flama; la inyección se realizó de manera automática con un volumen de inyección de 1 µL. Los tiempos de aparición fueron de 1.3 min para el ácido acético, 1.6 min para el ácido propiónico y 2.15 min para el ácido butírico.

5.5.10 Concentración de bacterias totales y celulolíticas

La población de bacterias totales por mL del medio de cultivo FR-L inoculado después de las 72 h de fermentación fue determinada con la técnica de conteo directo, en una cámara Petroff- Hausser® en un microscopio de contraste de fases Olympus® a 1000 X.

Una muestra de 1 mL se tomó de la parte líquida del biofermentador y se fijó en 0.25 mL de formaldehído al 10 %. Las muestras se refrigeraron a 4 °C hasta su uso. Debido a la alta concentración de bacterias de las muestras fijadas en formaldehído, estas se homogenizaron con un vortex Thermolyne® (Maxi mixII), se hicieron dos diluciones con agua destilada 1:10; se tomó una gota con ayuda de una pipeta Pasteur y un pipeteador de barril, la cual se colocó en la cámara Petroff Hausser®, se observó al microscopio y se procedió al conteo en cinco cuadros de la cámara.

La concentración de bacterias ruminales por mL se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Bacterias totales, mL: } \bar{X} (FD_1) (FD_2) (2 \times 10^7)$$

Donde:

\bar{X} : promedio de las bacterias observadas en los cuadros de la cámara

FD₁: valor inverso de la dilución usada con formaldehído

FD₂: valor inverso de dilución con agua

2X10⁷: valor obtenido por el volumen de la cámara

La concentración de bacterias celulolíticas se determinó con la técnica del número más probable (NMP) por medio de diluciones de 10⁻¹ a 10⁻¹⁰ con tres repeticiones por dilución (Harrigan y McCance, 1979), fueron incubadas a 39°C por 10

días, y se usó un medio de cultivo anaerobio (Cobos y Yokoyama, 1995) en tubos de cultivo de 13 x 100 mm, similar al utilizado para bacterias totales cambiando la fuente de energía (glucosa, celobiosa y almidón) por una tira de papel Whatman® N° 541 por tubo como fuente de celulosa.

5.5.11 Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar con seis tratamientos (seis leguminosas) y cinco repeticiones por tratamiento. La unidad experimental fue un biofermentador. Las variables fueron pH, DIVMS, concentración total de AGV, producción de acético, propiónico y butírico por cada 100 mM producidos, y población de bacterias totales; para las variables producción de biogás, CH₄ y CO₂ el análisis se hizo a 24, 48 y 72 h; para la variable población de bacterias totales, se hizo una transformación logarítmica previo al análisis. Con los datos se realizó un análisis de varianza usando el procedimiento GLM, las medias se compararon con la prueba de Tukey (P<0.05; y P<0.10 para tendencia). Estos análisis se realizaron con SAS (2010).

El modelo estadístico fue el siguiente:

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

Dónde:

Y_i= variable respuesta

μ= media general

T_j= efecto del j-ésimo tratamiento

e_{ij}= efecto aleatorio del término del error, donde se asume que el error se distribuye normalmente $e_{ij} \sim \text{NIID}(0, \sigma_e^2)$

5.6 Resultados

5.6.1 Análisis químico

En el Cuadro 19 se muestran los resultados del análisis químico de las leguminosas evaluadas en este estudio. El contenido de materia orgánica 88.51 a 94.10 %, cenizas: 6.69 a 11.49 %, proteína cruda: 14.43 a 26.35 %, FDN: 30.28 a 64.66 % y FDA: 29.44 a 46.5 %.

Cuadro 19. Análisis químico de seis leguminosas (tratamientos)

Leguminosa	MS	MO	Cenizas	PC	FDN	FDA
Alfalfa Atlixco	20.20	89.15	10.85	20.75	40.12	36.79
Alfalfa Oaxaca	21.54	89.24	10.76	19.84	37.71	34.18
Leucaena	18.41	91.97	8.03	20.75	52.61	33.07
Huizache	44.73	93.31	6.69	23.49	64.66	46.5
Trébol	20.74	90.71	9.29	26.35	30.28	26.52
Cacahuete forrajero	26.13	88.51	11.49	14.43	53.71	29.44

MS: Materia seca; MO: Materia orgánica; PC: Proteína cruda; FDN: Fibra detergente neutro; FDA: Fibra detergente ácido.

5.6.2 Variables químico-fermentativas

La variable pH a 72 h de fermentación (Cuadro 20) fue similar ($P>0.05$) para todas las leguminosas fermentadas, con un promedio de 6.55, valor que se encuentra dentro del rango óptimo para el crecimiento de bacterias totales y celulolíticas y, por lo tanto, no cambió la producción de CH_4 .

Cuadro 20. pH y degradación *in vitro* de la MS de seis leguminosas (tratamientos)

Tratamiento	pH	DIVMS, %
Alfalfa <i>var.</i> Atlixco	6.60 ^a	27.63 ^a
Alfalfa <i>var.</i> Oaxaca	6.47 ^a	25.22 ^{ab}
Leucaena	6.29 ^a	19.90 ^{bc}
Huizache	6.53 ^a	16.61 ^c
Trébol	6.68 ^a	26.28 ^{ab}
Cacahuete forrajero	6.7 ^a	21.64 ^{abc}
EEM	0.16	0.92
Valor de P	0.471	0.0006

^{a, b, c} Valores con literales diferentes en una columna son diferentes estadísticamente (Tukey; $P<0.05$); EEM: Error estándar de la media; DIVMS= Degradación *in vitro* de la materia seca.

Las leguminosas evaluadas presentaron diferencias ($P < 0.05$) en DIVMS (Cuadro 20). La alfalfa var. *Atlixco* presentó mayor DIVMS en comparación con la Leucaena y huizache, pero no con los otros tratamientos.

La población de bacterias totales (Cuadro 21) fue similar ($P > 0.05$) entre las leguminosas evaluadas con una concentración promedio de 8.96×10^9 . Pero, la población de bacterias celulolíticas disminuyó en el huizache.

Cuadro 21. Concentración de bacterias totales y celulolíticas en seis leguminosas (tratamientos)

Tratamiento	Bacterias totales* 10^9	Bacterias celulolíticas	Límite inferior 10^8	Límite superior 10^9
Alfalfa var. <i>Atlixco</i>	23.600	9.300	15.000	38.000
Alfalfa var. <i>Oaxaca</i>	7.800	2.800	10.000	15.000
Leucaena	10.800	0.023	0.040	0.012
Huizache	7.200	0.002	0.004	0.005
Trébol	15.200	0.070	0.100	0.360
Cacahuete forrajero	6.100	0.110	0.200	0.360
Error estándar	0.134			
Valor de P	0.384			

*No hay diferencia significativa ($P < 0.05$; Tukey)

Alfalfa var. *Atlixco* y *Oaxaca*, trébol y leucaena produjeron en promedio 31 % más AGV ($P < 0.001$), comparadas con huizache y cacahuete forrajero. La producción de ácido acético fue similar ($P > 0.05$) entre las leguminosas (67.68 mM), pero la producción de ácido propiónico fue diferente ($P < 0.05$). Así, la alfalfa var. *Atlixco* y el trébol produjeron 10.81 % más propiónico que los otros tratamientos, mientras que el cacahuete forrajero disminuyó ($P < 0.05$) la cantidad de propionato. La producción de ácido butírico fue mayor ($P < 0.001$) para cacahuete forrajero solo respecto al huizache, pero no con los demás tratamientos.

Cuadro 22. Producción de ácidos grasos volátiles de leguminosas

Tratamiento	Acético	Propiónico	Butírico	Total, mM
	mM por 100 mM producidos			
Alfalfa <i>var.</i> Atlixco	67.12 ^a	24.93 ^{ab}	7.95 ^b	70.47 ^a
Alfalfa <i>var.</i> Oaxaca	67.82 ^a	23.41 ^c	8.77 ^b	70.51 ^a
Leucaena	67.40 ^a	23.92 ^c	8.68 ^b	64.64 ^a
Huizache	66.44 ^a	24.09 ^{bc}	9.45 ^{ab}	46.08 ^b
Trébol	67.82 ^a	25.68 ^a	6.90 ^b	68.45 ^a
Cacahuete forrajero	69.51 ^a	18.84 ^d	11.63 ^a	48.24 ^b
EEM	0.73	0.23	0.59	2.88
Valor de P	0.114	<0.0001	<0.0003	<0.0001

^{a, b, c} Valores con literales diferentes en una columna son diferentes estadísticamente (Tukey; $P < 0.05$); EEM: Error estándar de la media; mM: concentración milimolar.

5.6.3 Producción de biogás

La producción de biogás total (CH_4 y CO_2) acumulado (Cuadro 23) fue mayor para ambas alfalfas (0.378 M), respecto al huizache (0.11 M) a 24 h, 48 y 72 horas de fermentación, lo cual representa una producción de 69.85 % más para la alfalfa. La concentración molar de CH_4 (Cuadro 23) presentó diferencias ($P < 0.05$) entre tratamientos: la alfalfa *var.* Oaxaca, el trébol, y el cacahuete forrajero produjeron 75 % más CH_4 comparados con el huizache a 24 h de fermentación, a las 48 h ambas alfalfas, trébol, y cacahuete forrajero produjeron 50 % más ($P < 0.05$) CH_4 que la leucaena y el huizache. Y a las 72, la producción de CH_4 fue similar ($P > 0.05$) entre tratamientos, pero la producción de CH_4 tendió a disminuir en Leucaena y huizache ($P = 0.08$).

La producción de CO_2 acumulada (Cuadro 23) a las 24 h fue mayor para la alfalfa *var.* Atlixco comparada con el huizache, mientras que a las 48 y 72 h solamente la alfalfa *var.* Atlixco mostró una producción superior a la del huizache ($P < 0.05$).

Cuadro 23. Concentración molar de biogás, CH₄ y CO₂ acumulados, por cada 100 g de MS

Biogás total acumulado, M			
Tratamiento	Tiempo de fermentación		
	24	48	72
Alfalfa <i>var.</i> Atlixco	0.179 ^a	0.244 ^a	0.385 ^a
Alfalfa <i>var.</i> Oaxaca	0.189 ^a	0.258 ^a	0.371 ^a
Leucaena	0.113 ^{ab}	0.128 ^{ab}	0.215 ^{ab}
Huizache	0.059 ^b	0.064 ^b	0.114 ^b
Trébol	0.139 ^{ab}	0.192 ^{ab}	0.303 ^{ab}
Cacahuete forrajero	0.149 ^{ab}	0.204 ^{ab}	0.335 ^{ab}
EEM	0.0237	0.0329	0.0541
Valor de P	0.0124	0.0048	0.0175
CH ₄ acumulado, M			
Alfalfa <i>var.</i> Atlixco	0.035 ^{ab}	0.069 ^a	0.089 ^a
Alfalfa <i>var.</i> Oaxaca	0.059 ^a	0.074 ^a	0.079 ^a
Leucaena	0.035 ^{ab}	0.036 ^b	0.040 ^a
Huizache	0.013 ^b	0.036 ^b	0.053 ^a
Trébol	0.045 ^a	0.078 ^a	0.086 ^a
Cacahuete forrajero	0.053 ^a	0.068 ^a	0.070 ^a
EEM	0.0068	0.0100	0.0128
Valor de P	0.0023	>0.020*	0.0848
CO ₂ acumulado, M			
Alfalfa <i>var.</i> Atlixco	0.144 ^a	0.175 ^a	0.184 ^a
Alfalfa <i>var.</i> Oaxaca	0.130 ^a	0.141 ^{ab}	0.143 ^{ab}
Leucaena	0.077 ^{ab}	0.078 ^b	0.079 ^b
Huizache	0.046 ^b	0.067 ^b	0.076 ^b
Trébol	0.094 ^{ab}	0.119 ^{ab}	0.121 ^{ab}
Cacahuete forrajero	0.096 ^{ab}	0.102 ^{ab}	0.109 ^{ab}
EEM	0.0185	0.0187	0.0189
Valor de P	0.0185	0.070	0.0061

^{a, b, c} Valores con literales diferentes en una columna son diferentes estadísticamente

(Tukey; P<0.05); EEM: Error estándar de la media; M: concentración molar.

La producción de CH₄ por 100 g de biogás acumulado (Cuadro 24) fue mayor en el cacahuate forrajero, en relación con alfalfa *var. Atlixco* a las 24 h de fermentación, pero a las 48 h no se detectaron diferencias (P>0.05), y a la hora 72 la leucaena y el trébol fueron diferentes al cacahuate forrajero.

Cuadro 24. Producción de CH₄ y CO₂ por cada 100 g de biogás producido

Producción de CH ₄ por 100 M de biogás producido, M			
Tratamiento	Hora		
	24	48	72
Alfalfa <i>var. Atlixco</i>	19.48 ^b	47.92 ^a	70.18 ^{ab}
Alfalfa <i>var. Oaxaca</i>	33.56 ^{ab}	64.77 ^a	61.28 ^{ab}
Leucaena	31.95 ^{ab}	58.57 ^a	73.64 ^a
Huizache	21.33 ^b	49.91 ^a	64.07 ^{ab}
Trébol	23.74 ^{ab}	59.14 ^a	75.81 ^a
Cacahuate forrajero	36.86 ^a	71.07 ^a	56.14 ^b
Error estándar	3.367	5.854	3.737
Valor de P	0.0079	0.0952	0.0108
Producción de CO ₂ por cada 100 M de biogás producido, M			
Alfalfa <i>var. Atlixco</i>	79.51 ^a	52.06 ^a	29.81 ^{ab}
Alfalfa <i>var. Oaxaca</i>	66.43 ^{ab}	35.23 ^a	38.71 ^{ab}
Leucaena	68.04 ^{ab}	41.42 ^a	26.35 ^b
Huizache	78.66 ^a	53.53 ^a	35.93 ^{ab}
Trébol	67.25 ^{ab}	40.86 ^a	24.18 ^b
Cacahuate forrajero	53.13 ^b	28.92 ^a	43.86 ^a
EEM	3.363	6.20	3.737
Valor de P	0.0110	0.0693	0.0108

^{a, b, c} Valores con literales diferentes en una columna son diferentes estadísticamente (Tukey; P<0.05); EEM: Error estándar del error; M: concentración molar.

La producción de CO₂ fue diferente entre tratamientos: a las 24 h de fermentación el cacahuate forrajero produjo menos CO₂ que huizache y la alfalfa, a las 48 h no hubo diferencias entre tratamientos, y a las 72 h la alfalfa *var Atlixco*, Leucaena y trébol produjeron más CO₂ que el cacahuate forrajero.

5.7 Discusión

La DIVMS de la alfalfa *var. Atlixco* fue mayor que la de Leucaena y huizache, los cuales son forrajes tropicales y contienen 12 y 24 % más FDN que la alfalfa, por lo cual su menor DIVMS se puede deber a su contenido de FDN. Las plantas que contienen mayor cantidad de fibra tienen más lignina, la cual actúa como una barrera estructural que evita el contacto de los microorganismos ruminales en la fibra; entonces, la utilización de los carbohidratos estructurales es escasa y se reduce la DIVMS (Buxton y Redfearn, 1997; Fondevila *et al.*, 2002). La leucaena y el huizache tuvieron una menor población de bacterias celulolíticas que pudieron ser afectadas por la presencia de compuestos antinutricionales, taninos y alcaloides como la mimosina.

En el presente estudio no se evaluó la presencia de metabolitos secundarios, pero hay mimosina Galindo *et al.* (2008) y taninos en leucaena (Tan *et al.*, 2011) y saponinas y taninos en el huizache (García-Winder, 2009), y estos compuestos disminuyen la síntesis de CH₄ debido a la reducción de la digestión de la fibra (Waghorn, 2008); como consecuencia también se redujo la DIVMS y la población de bacterias celulolíticas. Pero Galindo *et al.* (2008) reportan que la inclusión 25 % de leucaena en 25 % en la dieta bajo condiciones *in vitro* actúa como modulador de la producción de CH₄ sin comprometer la población de bacterias celulolíticas, pero si la de protozoarios.

Ambas alfalfas, el trébol y la Leucaena produjeron en promedio 31 % más AGV (P<0.001), comparado con Huizache y cacahuate forrajero, es decir, estas leguminosas son altamente fermentables y la alfalfa produjo 69.85 % más biogás que el huizache y cacahuate forrajero. Meale *et al.* (2012) reportaron que las leguminosas con mayor producción de ácidos grasos también aumentan las de biogás; además la producción de AGV también se ha relacionado con la de CH₄, Naumann *et al.* (2013), al evaluar leguminosas perennes muestran una relación positiva (R²= 0.68), entre la producción de AGV y la producción de CH₄, y en este estudio las leguminosas que produjeron más biogás y AGV también produjeron más CH₄ a la hora 24 y 48 h excepto la Leucaena que produjo una mayor cantidad de AGV y una cantidad intermedia de biogás, y menor cantidad de CH₄ a las 24, y 48, es decir puede tener un efecto modulador de la

producción de CH₄ debido a su contenido de taninos. Tan *et al.* (2011), usaron diferentes cantidades de taninos extraídos de *Leucaena* y reportan una disminución lineal en la cantidad de AGV y CH₄ al incrementar la cantidad de taninos condensados.

La producción de ácido acético fue similar para todas las leguminosas, la producción de ácido propiónico fue más alta para el trébol y la alfalfa *var.* Atlixco, por lo cual estos factores no afectaron de manera directa la producción de CH₄. Ramin y Huhtanen, (2013) reportaron una relación positiva entre la proporción de acetato y butirato con la producción de CH₄ y una relación negativa de la producción de propionato, Al evaluar los factores que afectan la producción de CH₄ en rumiantes.

El huizache tuvo un potencial bajo de producción de CH₄ y su comportamiento productivo fue limitado. Al respecto, la reducción de CH₄ en especies de *Acacia spp*; género al cual pertenece el huizache, presentan saponinas que disminuyen la metanogénesis al inhibir los protozoarios del rumen y así suprimen el número y actividad de los metanógenos (Patra y Saxena, 2010). En un estudio *in vitro* con extracto de *Acacia concinna* en la dieta, se redujo 4.4 % el CH₄ con respecto al testigo, no cambió la producción de AGV ni la digestibilidad, pero disminuyeron los protozoarios (Patra *et al.*, 2006).

La producción de CH₄ por cada 100 M de biogás producidos incrementa con el tiempo de fermentación y la máxima es a las 72 h, pero el CO₂ disminuye al aumentar el tiempo de fermentación. Posadas y Noguera (2005) explican que la fracción de FDN de la materia seca se degrada al final; así, Singh *et al.* (2012) al caracterizar 12 forrajes muestran una correlación positiva entre la cantidad de FDA en los forrajes y la producción de CH₄.

5.8 Conclusiones

La *Leucaena* se podría usar, en cantidades limitadas, para reducir las emisiones de CH₄ en rumiantes porque sus bajas producciones de biogás y CH₄ acumulado no afectan la producción de AGV ni la población de bacterias totales, pero si reducen la población de bacterias celulolíticas.

La mayor proporción de CH₄ se produce en el último periodo de fermentación que es cuando se lleva a cabo la fermentación de la fibra.

Literatura citada

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 2005. Official Methods of Analysis. Edition 18. Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC, EE.UU. Pp. 1928.

Buxton, D., D. D. Redfearn. 1997. Plant limitations to fiber digestion and utilization. *Journal of Nutrition*. 127: 814-818s.

Bárcena, G. R., P. A. Hernández, M.M. Crosby, A. Lee. 2010. Tablas: Composición nutrimental y valor nutritivo de los forrajes del Estado de Puebla. Fundación Produce Puebla A. C. Puebla, Puebla. Pp. 16.

Coulman, B., B. Goplen, W. Majak, T. McAllister, K. J. Cheng, B. Berg, J. Hall, D. McCartney, S. Acharya. 2000. A review of the development of a bloat-reduced alfalfa cultivar. *Canadian Journal of Plant Science*. 80: 487–49.

Cobos, M. A., M. T. Yokoyama. 1995. *Clostridium paraputrificum* var *ruminantium*: colonization and degradation of shrimp carapaces *in vitro* observed by scanning electron microscopy. *In: Rumen Ecology Research Planning, Proceedings of Workshop*. Wallace, R. J., and A. Lahlou-Kassi (eds.). Addis Abeba, Ethiopia. Pp: 151-161.

Doreau, M., C. Martin, M. Eugène, M. Popova, D. P. Morgavi. 2011. Leviers d'action pour réduire la production de méthane entérique par les ruminants. *In: Gaz à effet de serre en élevage bovin: le méthane*. Doreau M., R. Baumont, J. M. Perez (Eds). Dossier, INRA Productions Animales. 24: 461-474.

Harrigan, W. F., M. E. McCance. 1979. Métodos de laboratorio en microbiología de alimentos y productos lácteos. ED. Academia. León España. Pp 419.

Hess, H. D., L.M. Monsalve, C. E. Lascano, J.E. Carrulla, T. E. Díaz, M. Kreuzer. 2003. Supplementation of tropical grass diet with forage legume and *Sapindus saponaria*: effects on *in vitro* ruminal nitrogen turnover and metanogenesis. *Australian Journal of Agricultural Research* 54: 703-713.

- Galindo, J., N. González, D. Delgado, A. Sosa, Y. Marrero, R. González, A. I. Aldana O. Moreira. 2008. Efecto modulador de *Leucaena leucocephala* sobre la microbiota ruminal. *Zootecnia Tropical*. 26(3): 249-252.
- García-Winder, L. R., S Goñi-Cedeño, P. A, Olgúin-Lara, G. Díaz-Salgado, C. M. Arriaga-Jordán. 2009. Huizache (*Acacia farnesiana*) whole pods (flesh and seeds) as an alternative fed for sheep in México. *Tropical Animal Health Production*. 41: 1615-1621.
- Kellems, R. O., D. C. Church. 2002. Roughages. *In: Livestock feeds and feeding*. Kellems R. O., D.C. Church (Eds). 5ª ed. ED. Prentice Hall. New Jersey. Pág: 86-116.
- McCaughey, W. P., K. Wittenberg, D. Corrigan. 1999. Impact of pasture type on methane production by lactating beef cows. *Canadian Journal of Animal Science*. 79: 221-226.
- Meale S. J., A. V. Chaves, J. Baah, T. A. McAllister. 2012. Methane production of different forages *in vitro* ruminal fermentation. *Asian-Australian Journal of Animal Science*. 25(1): 86-91.
- Naumann H. D., L. O. Tedeschi, J. P. Muir, B. D. Lambert, M. M. Kothmann. 2013. Effect of molecular weight of condensed tannins from warm-season perennial legumes on ruminal methane production *in vitro*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 50: 154-162.
- Patra, A. K., D. N Kamra, N. Agarwal. 2006. Effect of plant extracts on *in vitro* methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feed in rumen liquor of buffalo. *Animal Feed Science and Technology*. 128: 276-29.
- Patra, A., J. Saxena. 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*. 71: 1198-1222.
- Posada, S. L., R. R. Noguera 2005. Técnica *in vitro* de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. *Livestock Research for Rural Development*. Vol. 17, Art. # 36. Disponible en: <http://www.lrrd.org/lrrd17/4/posa17036.htm>. Consultado el 30 de junio de 2014.
- Ramin, M., P. Huhtanen. 2013. Development of equations for predicting methane emissions from ruminants. *Journal of Dairy Science*. 96: 2476–2493.

- Singh, S., B. P. Kushwaha, S. K. Nag, A. K. Mishra, A. Singh, U. Y. Anele. 2012. *In vitro* ruminal fermentation, protein and carbohydrate fractionation, methane production and prediction of twelve commonly used Indian green forages. *Animal Feed Science and Technology*. 178: 2-11.
- Statistical Analysis System (SAS). 2010. SAS Proceeding Guide, Versión 9.0. SAS Institute. Cary NC. USA.
- Tan, H. Y., C. C. Sieo, N. Abdullaha, J. B. Lianga, X. D. Huanga, Y. W. Hoa. 2011. Effects of condensed tannins from *Leucaena* on methane production, rumen fermentation and populations of methanogens and protozoa *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology*. 169: 185-193.
- Vargas, J., E. Cárdenas, M. Pabón, J. Carulla. 2012. Emisión de metano entérico en rumiantes en pastoreo. *Archivos de Zootecnia*. 61: 51-66.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*. 74: 3583-3579.
- Waghorn, G. 2008. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production progress and challenges. *Animal Feed Science and Technology*. 147: 116-139.

6. EXPERIMENTO IV. EVALUACIÓN DEL POTENCIAL *in vitro* DE PRODUCCIÓN DE BIOGÁS TOTAL, CH₄, CO₂ Y VARIABLES QUÍMICO-FERMENTATIVAS DE SEIS ESQUILMOS AGRÍCOLAS

Mayra Iliana Rivas Martínez, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2015

6.1 Resumen

Los esquilmos agrícolas como pajas y rastrojos son usados en México para alimentar rumiantes, pero se desconoce su potencial para producir metano (CH₄). Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue determinar la producción *in vitro* de CH₄ de seis esquilmos agrícolas. Los esquilmos (tratamientos) fueron: paja de triticale, dos muestras de rastrojo de maíz, paja de avena, pata de sorgo y cebada vana. El diseño experimental fue completamente al azar y los datos fueron analizados con ANDEVA usando SAS. Los ingredientes fueron incubados 72 h a 39°C y el inóculo fue líquido ruminal fresco. La producción de biogás se cuantificó a 24, 48 y 72 h y las proporciones del biogás (CH₄ y CO₂) fueron analizadas por cromatografía de gases. A las 72 h de fermentación se evaluaron las variables: pH, ácidos grasos volátiles (AGV), población de bacterias totales y celulolíticas, y se calculó la degradación *in vitro* de la materia seca (DIVMS). La producción de biogás aumentó 34.6 % en la paja de triticale, rastrojo de maíz y pata de sorgo a las 24 h; a las 48 h la paja de triticale produjo 28.72 % más biogás que la cebada vana (P<0.05), y a las 72 h la producción de biogás fue similar (P>0.05) entre tratamientos. La producción de CH₄ fue mayor (P<0.05) en paja de triticale y pata de sorgo comparado con cebada vana a las 24 y 48 h, y a las 72 h no hubo diferencias (P>0.05). La producción total de AGV (163.6 mM), ácido acético (de 44.45 mM), propiónico (32.92 mM) y butírico (22.60 mM) así como la población de bacterias totales y celulolíticas fueron similares (P>0.05) entre tratamientos. La DIVMS aumentó 7 % (P<0.05) en rastrojo de maíz. De acuerdo a los resultados no hay diferencias fermentativas entre los esquilmos agrícolas, mientras que la cebada vana reduce la síntesis de CH₄ en las primeras 48 h de fermentación.

Palabras clave: rastrojos, pajas, CH₄, CO₂ biogás, rumiantes.

**EVALUATION OF THE *in vitro* POTENTIAL FOR TOTAL BIOGAS PRODUCTION,
CH₄, CO₂ AND *in vitro* CHEMICAL- FERMENTATION VARIABLES FROM SIX
AGRICULTURAL RESIDUES**

**Mayra Iliana Rivas Martínez, Dra.
Colegio de Postgraduados, 2015**

ABSTRACT

Crop residues such as straw and corn stover are used in Mexico for feeding ruminants, but their methane (CH₄) production potential is still unknown. Therefore the objective of this study was to quantify the *in vitro* production of biogas, including CH₄ and carbon dioxide (CO₂), and secondly to describe the chemical fermentative characteristics from six agricultural residues: triticale straw, two corn stover samples, oat straw, sorghum straw, and barley residues. Data were analyzed with ANOVA using SAS. The residues were incubated for 72 h at 39 °C and fresh ruminal fluid was used as the inoculum. The biogas production was measured at 24, 48 and 72 h and the biogas proportions (CH₄ and CO₂) were analyzed by gas chromatography. At 72 h, the variables pH, volatile fatty acids (VFA), total and cellulolytic bacteria populations were evaluated; besides, *in vitro* dry matter degradation (IVDMD) was calculated. At 24 h, the biogas production increased 34.6 % for triticale straw, corn stover and sorghum stover, at 48 h, triticale straw produced 28.72 % more biogas than barley straw (P<0.05), and 72 h biogas production was similar (P>0.05) across treatments. Methane production was higher for triticale straw and sorghum stover, as compared to barley straw at 24 and 48 h. Acetic acid (44.45 mM), propionic acid (32.92 mM) and butyric acid (22.60 mM), as well as total and cellulolytic bacteria were similar among treatments (P>0.05). IVDMD was higher by 7 % for corn stover compared to the rest of the treatments. According to analysis of the results there were no fermentative differences among crop residues, whereas barley straw reduced CH₄ synthesis during the first 48 h of fermentation.

Key words: *Stover, straw, CH₄, CO₂, biogas, ruminants*

6.2 Introducción

La energía utilizada en la síntesis de CH₄ en bovinos en finalización varía de 3 al 11 % de la consumida y depende de la proporción de forraje: concentrado en la dieta (Johnson *et al.*, 1995). Así, forrajes de baja calidad incrementan la producción de CH₄ en 25.3 % en un sistema de vaquillas con alimentación restringida y 26.6 % con alimentación *ad libitum* (Boadi y Wittenberg, 2001). Este intervalo muestra la importancia del tipo de alimentación en los rumiantes y la cantidad de energía utilizada en ese proceso, lo cual es un incentivo para entender la base de las diferencias entre alimentos, medir las emisiones de CH₄, y seleccionar los alimentos para la elaboración de dietas por baja producción de CH₄ (Waghorn *et al.*, 2002).

Los esquilmos agrícolas de cereales se utilizan con frecuencia para la alimentación de rumiantes en varias regiones de México y en otros países; la producción anual de esquilmos agrícolas en México fue de 90 millones t para el año 2008, de las cuales 32 millones t fueron de rastrojo de maíz, lo cual es un recurso importante para la alimentación de los rumiantes (Basurto *et al.*, 2012). Pero estos ingredientes tienen limitantes: bajo peso por unidad de volumen (lo cual restringe el consumo y el animal no puede consumir suficiente alimento para mantener su peso corporal) y su contenido de proteína es bajo lo cual disminuye la fermentación microbiana en el rumen (Kellems y Church, 2002). Los esquilmos agrícolas tienen un alto contenido de fibra, con tres polímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina; los dos últimos están ligados con enlaces covalentes (éteres o ésteres), y hay una baja degradación de la lignocelulosa en biogás porque la lignina no es degradable en medios anaerobios como el rumen (Triolo *et al.*, 2011). La cantidad de fibra detergente ácido y celulosa tienen una correlación positiva con el CH₄ producido, y la fermentación de ingredientes con más paredes celulares libera más acetato que propionato (Singh *et al.*, 2012); así, la cantidad de CH₄ proveniente de los esquilmos agrícolas depende de la proporción de celulosa, hemicelulosa y lignina.

El rastrojo de maíz contiene de 15 a 21 % de lignina según la región de la producción, la paja de trigo tiene menos lignina pero un nivel alto de celulosa y hemicelulosa comparada con el rastrojo de maíz, la paja de arroz tiene un contenido

bajo en lignina pero un nivel alto de celulosa y hemicelulosa comparada con el rastrojo de maíz, mientras que la paja de arroz muestra un contenido bajo de lignina pero alto de sílice (~10 %) y limita su utilización para la alimentación de rumiantes (Buranov *et al.*, 2008).

En una evaluación *in vivo* con ovinos en finalización alimentados con pajas de avena y cebada, Blummel *et al.* (2005) reportan diferencias en consumo de materia orgánica (MO) de 563 a 946 g d⁻¹, digestibilidad de la MO de 0.464 a 0.561 g kg⁻¹ MS, producción de CH₄ de 13.0 a 25.4 L d⁻¹, consumo de MO digestible de 229 a 473 g d⁻¹, y producción de CH₄ kg⁻¹ MO digestible de 47.1 a 61.8 L.

6.3 Objetivo general

Caracterizar y comparar el potencial de producción de biogás y CH₄ *in vitro* de seis esquilmos agrícolas usados comúnmente en México.

6.3.1 Objetivos particulares

- Evaluar pH, ácidos grasos volátiles y degradación *in vitro* de la MS de seis esquilmos agrícolas.
- Evaluar la población de bacterias totales y celulolíticas a las 72 h de fermentación de seis esquilmos agrícolas.

6.4 Hipótesis

Las pajas y rastrojos de cereales tienen características nutricionales diferentes y, por lo tanto, su capacidad para producir CH₄ *in vitro* también es diferente.

6.5 Materiales y métodos

6.5.1 Ubicación del experimento

El experimento se realizó en el Laboratorio de Microbiología Ruminal y Genética Microbiana, del programa IREGEP-Ganadería, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados, en el km 36.5 de la carretera México-Texcoco, Estado de México.

6.5.2 Material evaluado y tratamientos

Los esquilmos agrícolas caracterizados y evaluados fueron: paja de triticale, rastrojo de maíz, paja de avena, pata de sorgo, los cuales fueron recolectados en el Estado de Querétaro, rastrojo de maíz procedente de Texcoco, Estado de México y cebada vana proveniente de Tlaxcala. Cada esquilmo agrícola fue considerado como un tratamiento y se evaluaron en cinco repeticiones.

Aproximadamente 200 g de cada muestra fueron molidos a 1 mm en un molino Willey (Arthur H. Thomas, Philadelphia, PA), para sus análisis posteriores.

6.5.3 Análisis químico de los ingredientes

Este análisis se realizó por los procedimientos de la AOAC (2005): MS (método 930.15), cenizas (método 942.05), y proteína cruda (PC) (método 984.13). El contenido de fibra detergente neutro (FDN) y ácido (FDA) se determinó con el método propuesto por Van Soest *et al.* (1991).

6.5.4 Medio de cultivo para bacterias totales

Los esquilmos agrícolas se deshidrataron por 48 h a peso constante, se pesó 0.5 g de cada ingrediente, se colocaron en viales serológicos de 120 mL, se registró el peso del sustrato y se añadió 1 mL de agua destilada, los viales con el sustrato se esterilizaron 15 min a 121 °C y 15 PSI.

Después de esterilizar los viales con el sustrato, se adicionaron 45 mL del medio de cultivo para bacterias totales (Cobos y Yokoyama, 1995), intercambiando la fuente de energía por el sustrato a evaluar. El medio de cultivo se mantuvo bajo condiciones de esterilidad y flujo de CO₂ para mantener la anaerobiosis, los viales fueron sellados con tapones de neopreno azules y arillos de aluminio con una engargoladora marca Weatton® y se mantuvieron en condiciones de temperatura ambiente (25°C) hasta su uso posterior.

6.5.5 Preparación de la trampa de captura de biogás

El biogás fue capturado en una trampa de solución salina saturada acidificada $\text{pH} < 2$, la cual estaba en un vial serológico de 60 mL completamente lleno. La solución se preparó con 350 g de sal común (NaCl) disuelta en 1 L de agua y 5 mL de anaranjado de metilo al 0.1 %. El pH fue ajustado con HCl 1N.

6.5.6 Inoculación de los medios de cultivo y montaje del sistema de producción de biogás

Los medios de cultivo se colocaron en un baño María a 39 °C y se inocularon con 5 mL de líquido ruminal fresco extraído de una vaca Jersey 3 h después de la alimentación de la mañana y el inóculo se conservó a 39°C en un termo cerrado para su traslado. El líquido ruminal se filtró en una manta cielo y fue centrifugado 3 min a 1,257 x g para eliminar protozoarios y concentrar las bacterias. La concentración de bacterias del inóculo fue de 10^8 mL^{-1} . Al término de la inoculación se consideró la hora cero para las mediciones de biogás.

Los biofermentadores fueron conectados a una trampa de captura, por medio de una manguera de Tygon® 3/3210 x 1/32 de 40 cm que se adaptó a una aguja Terumo® de calibre 20 G X 1" en cada extremo. La trampa de captura tenía una aguja de las mismas especificaciones que la de la manguera, la cual fue utilizada como válvula de escape, y esta trampa de captura se colocó sobre una probeta modificada con una cortadura en V. El paso del biogás se obstruyó con una pinza de plástico hasta su liberación a las 24, 48 y 72 h de fermentación.

6.5.7 Producción de biogás

El volumen de biogás fue medido por el volumen desplazado de solución salina de la trampa a las 24, 48 y 72 h de fermentación, las trampas se retiraron después de tomar la lectura, y se almacenaron de manera invertida a temperatura ambiente (25 °C), hasta su análisis.

La proporción de CH_4 y CO_2 se determinó en un cromatógrafo de gases PerkinElmer® modelo Clarus 500, con un detector de conductividad térmica a 130 °C,

una columna empacada Porapak® a 170 °C, y horno a 80 °C, el gas acarreador fue el helio a 22.3 mL min⁻¹ y el volumen de inyección fue de 300 µL. Los tiempos de retención fueron 0.73 min para el CH₄ y 1.05 min para el CO₂.

La concentración molar de biogás total, CH₄ y CO₂ se calculó por medio de la ecuación general de los gases ideales (Posadas y Noguera, 2005) con la información obtenida en el desplazamiento de biogás y las proporciones de CH₄ y CO₂.

$$\text{Concentración molar de biogás} = \frac{P * V}{R * T}$$

Donde:

P: presión atmosférica (Atm.)

V: volumen de biogás (L)

R: constante de los gases

T: temperatura (°K)

6.5.8 pH

Una vez concluidas las 72 h de fermentación se abrieron los biofermentadores y se midió pH con un potenciómetro ORION® modelo 250A calibrado a pH 4 y 7.

6.5.9 Degradación *in vitro* de la MS

La MS no degradada de los biofermentadores se filtró con un sistema de filtrado de bomba de vacío en papel filtro Whatman® 514, el cual se secó a peso constante en una estufa Riossa® y se pesó previo al filtrado. El residuo recuperado se secó 24 h a 60°C en una estufa Riossa®, se pasó a un desecador (PYREX®) para que se enfriara y se pesó en una balanza analítica.

La degradación *in vitro* de la materia seca se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ MS degradada} = \left(\frac{\text{MS inicial} - \text{MS final}}{\text{MS inicial}} \right) * 100$$

6.5.10 Concentración molar de ácidos grasos volátiles

Al finalizar el periodo de fermentación (72 h) se tomó una muestra de 1 mL de la parte líquida del biofermentador, se fijó en 0.25 mL de ácido metafosfórico al 25 % para guardar la relación 4:1, las muestras se centrifugaron 10 min a 20, 817 x g, en una centrifuga Ilettich zentrifugen® Modelo EBA 21, el sobrenadante se transfirió a viales para cromatografía, los cuales se guardaron en congelación (-4 °C) hasta su análisis.

El análisis se realizó en un cromatógrafo de gases Clarus 500 PerkinElmer®, con un detector de ionización de flama y columna capilar Elite FFAP PerkinElmer y las condiciones del análisis fueron las siguientes: temperatura del horno: 115 °C por 0.25 min, 125 °C por 0.5 min y 130 °C por 5.5 min, la temperatura de la columna fue 250 °C; el gas acarreador fue nitrógeno a un flujo de 23.3 mL min⁻¹ y aire e hidrógeno para combustión de la flama; la inyección se realizó de manera automática en un volumen de 1 µL. Los tiempos de aparición fueron de 1.3 min para el ácido acético, 1.6 min para el ácido propiónico y 2.15 min para el ácido butírico.

6.5.11 Concentración de bacterias totales y celulolíticas

La cuantificación de bacterias totales por mL se realizó con la técnica de conteo directo con una cámara Petroff- Hausser® en un microscopio Olympus® a 1000 X. Para el conteo se tomó una muestra de 1 mL de la parte líquida del biofermentador y se fijó en 0.25 mL de formaldehido al 10 %. Debido a la alta concentración de bacterias en las muestras, éstas se homogenizaron en un vortex Thermolyne® (Maxi mixII) y se hicieron dos diluciones con agua destilada 1:10; se tomó una gota con una pipeta Pasteur y un pipeteador de barril, la cual se colocó en la cámara Petroff Hausser®, se observó al microscopio de contraste de fases Olympus® y contó en cinco cuadros de la cámara.

La concentración de bacterias ruminales por mL se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Bacterias por mL: } \bar{X} (FD_1) (FD_2) (2 \times 10^7)$$

Donde. \bar{X} : promedio de las bacterias observadas en los cuadros de la cámara Petroff-Hausser®.

FD₁: valor inverso de la dilución usada con formaldehído

FD₂: valor inverso de dilución con agua

2X10⁷: valor obtenido por el volumen de la cámara

La concentración de bacterias celulolíticas se determinó con la técnica del número más probable (NMP) con diluciones de 10⁻¹ a 10⁻¹⁰ con tres repeticiones por dilución (Harrigan y McCance, 1979) para lo cual se empleó 4.5 mL de medio de cultivo anaerobio (Cobos y Yokoyama, 1995) similar al utilizado para bacterias totales, solo se intercambi6 la fuente de energía (glucosa, celobiosa y almid6n) por una tira de papel Whatman® N° 541 por tubo. Los tubos con medio de cultivo fueron inoculados con 0.5 mL del contenido del biofermentador e incubados a 39 °C por 10 d.

6.5.12 Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar con seis tratamientos (esquilmos) y cinco repeticiones por tratamiento, los datos se analizaron con el procedimiento GLM de SAS versión 9.1 y las medias de los tratamientos se compararon con la prueba de Tukey (P<0.05). La unidad experimental fue un biofermentador.

Las variables, producción de biogás, CH₄ y CO₂ se analizaron a las 24, 48 y 72 h. mientras que las variables pH, DIVMS, AGV y población de bacterias totales se analizaron a las 72 h de fermentación. Para la variable población de bacterias totales se hizo una transformación de la informaci6n con Log natural antes de ser analizada.

6.6 Resultados

6.6.1 Análisis químico de los esquilmos agrícolas

La composici6n química de los esquilmos agrícolas (Cuadro 25) fue la siguiente: MS 93.24 a 94.78 %, MO 86.70 a 94.16 %, cenizas 5.84 a 13.3 %, PC 2.53 a 8.79 %, FDN 65.80 a 78 %, y FDA 43.51 a 56.05 %.

Cuadro 25. Composición química de seis esquilmos agrícolas

Tratamientos	MS	MO	Cenizas	PC	FDN	FDA
	%				% MS	
Paja de triticale	94.11	90.05	9.94	8.79	70.31	49.56
Rastrojo de maíz Texcoco	94.47	94.16	5.84	5.25	78.00	51.63
Paja de avena	94.11	89.90	10.10	9.77	65.80	43.99
Rastrojo de maíz Querétaro.	94.11	90.76	9.24	4.42	82.36	56.05
Pata de sorgo	94.78	86.70	13.30	2.53	69.28	47.02
Cebada vana	93.24	88.07	9.28	8.37	72.67	43.51

MS: materia seca; MO; materia orgánica; PC: proteína cruda; FDN: fibra detergente neutro; FDA: fibra detergente ácido.

6.6.2 Producción de biogás total *in vitro* por cada 100 g de MS

La concentración molar de biogás acumulado (Cuadro 26) fue diferente entre tratamientos ($P < 0.05$) a las 24 y 48 h, y a las 72 h se observó una tendencia a ser diferente ($P = 0.06$). En las primeras 24 h de fermentación, la paja de triticale, el rastrojo de maíz y la pata de sorgo produjeron 34.6 % más biogás que la cebada vana ($P < 0.05$), y a las 48 h la paja de triticale incrementó la producción de biogás en 28.72 % comparada con la cebada vana ($P < 0.05$), pero no fue diferente de los otros tratamientos. La producción de biogás acumulado a las 72 h tuvo una tendencia a ser mayor para la paja de triticale ($P = 0.06$), comparada con paja de avena y cebada vana.

6.6.3 Producción de CH₄ y CO₂ por cada 100 g de MS

En el periodo de 0 a 48 h de incubación, la paja de triticale y la pata de sorgo incrementaron 34.14 % el CH₄ comparado con la cebada vana ($P < 0.05$), pero a las 72 h fue similar entre tratamientos (0.056 M), con una tendencia a ser diferentes, entre paja de triticale, rastrojo de maíz y cebada vana (Cuadro 26) ($P = 0.056$).

Cuadro 26. Concentración molar de biogás acumulado por 100 g de MS de esquilmos agrícolas.

Tratamiento	Tiempo de fermentación, h		
	24	48	72
Paja de triticale	0.159 ^a	0.181 ^a	0.202 ^a
Rastrojo de maíz Texcoco	0.151 ^a	0.165 ^{ab}	0.179 ^{ab}
Paja de avena	0.136 ^{ab}	0.155 ^{ab}	0.173 ^b
Rastrojo de maíz Querétaro	0.149 ^a	0.169 ^{ab}	0.187 ^{ab}
Pata de sorgo	0.144 ^a	0.168 ^{ab}	0.192 ^{ab}
Cebada vana	0.103 ^b	0.129 ^b	0.155 ^b
EEM	0.0087	0.009	0.010
Valor de P	0.005	0.016	0.06

^{a, b, c} Valores con literales diferentes en una columna son diferentes estadísticamente (Tukey; $P < 0.05$); EEM: Error estándar de la media; M: concentración molar.

La paja de triticale, el rastrojo de maíz de Texcoco y de Querétaro incrementaron en 33.39 % el CO_2 ($P < 0.05$) respecto a la cebada vana. De 24 a 48 h la producción de CO_2 fue mayor 29.64 % en paja de triticale y rastrojo de maíz de Querétaro, comparado con la cebada vana, pero, a las 72 h no hubo diferencias entre tratamientos (0.124 M) ($P > 0.05$).

6.6.4 CH_4 y CO_2 por cada 100 M de biogás

Al transcurrir el tiempo de fermentación la concentración molar de CH_4 aumentó: 25.17, 42.68 y 54.44 M a 24, 48 y 72 h, respectivamente; pero el CO_2 disminuyó: 74.99, 57.4 a 55.56 M, a 24, 48 y 72 h, respectivamente. Estos cambios en CH_4 y CO_2 fueron diferentes entre tratamientos: a las 24 h la concentración molar de CH_4 por cada 100 M de biogás producido (Cuadro 28) fue superior en la pata de sorgo comparado con el rastrojo de maíz Querétaro, mientras que la concentración molar de CO_2 (Cuadro 28) fue mayor para el rastrojo de maíz Querétaro respecto a la pata de sorgo ($P < 0.05$). Pero después de las 24 h no hubo diferencias entre tratamientos para el CO_2 ($P > 0.05$).

Cuadro 27. Concentración molar de CH₄ y CO₂ acumulados por 100 g de MS en seis esquilmos agrícolas

Tiempo de fermentación, h	24	48	72
Tratamiento	CH ₄ acumulado, M		
Paja de triticale	0.040 ^a	0.052 ^{ab}	0.063
Rastrojo de maíz Texcoco	0.036 ^{ab}	0.044 ^{ab}	0.050
Paja de avena	0.032 ^{ab}	0.042 ^{ab}	0.054
Rastrojo de maíz Querétaro	0.034 ^{ab}	0.044 ^{ab}	0.055
Pata de sorgo	0.042 ^a	0.054 ^a	0.067
Cebada vana	0.027 ^b	0.039 ^b	0.052
EEM	0.003	0.003	0.004
Valor de P	0.010	0.015	0.056
	CO ₂ acumulado, M		
Paja de triticale	0.118 ^a	0.129 ^a	0.138
Rastrojo de maíz Texcoco	0.114 ^a	0.122 ^{ab}	0.129
Paja de avena	0.105 ^{ab}	0.112 ^{ab}	0.119
Rastrojo de maíz Querétaro	0.115 ^a	0.124 ^a	0.133
Pata se sorgo	0.103 ^{ab}	0.114 ^{ab}	0.125
Cebada vana	0.077 ^b	0.089 ^b	0.102
Error estándar de la media	0.007	0.007	0.008
Valor de P	0.007	0.026	0.09

^{a, b, c} Valores con literales diferentes en una columna son diferentes estadísticamente (Tukey; P<0.05); EEM: error estándar de la media; M: Concentración molar.

Cuadro 28. Concentración molar de CH₄ y CO₂ por cada 100 M de biogás producido en esquimos agrícolas

Hora/Tratamiento	Tiempo de fermentación, h					
	24	48	72	24	48	72
	CH ₄ , M			CO ₂ , M		
Paja de Triticale	26.66 ^{ab}	42.70	54.58	74.33 ^{ab}	57.3	45.42
Rastrojo de maíz						
Texcoco	24.10 ^{ab}	42.21	52.03	75.89 ^{ab}	58.29	47.97
Paja de avena	23.20 ^{ab}	45.73	62.57	76.81 ^{ab}	54.27	37.42
Rastrojo de maíz						
Querétaro	22.67 ^b	41.71	56.14	77.33 ^a	58.29	43.86
Pata de sorgo	28.73 ^a	42.78	53.9	71.27 ^b	57.27	46.10
Cebada vana	25.66 ^{ab}	40.95	47.44	74.34 ^{ab}	59.05	52.56
EEM	1.32	3.15	4.73	1.32	3.15	4.73
Valor de P	0.051	0.57	0.39	0.05	0.57	0.39

^{a, b, c} Valores con literales diferentes en una columna son diferentes estadísticamente (Tukey; P<0.05); EEM: Error estándar de la media; M: concentración molar.

6.6.5 Variables químico fermentativas

El pH se mantuvo dentro de los valores de crecimiento de los microorganismos ruminales, pero fue diferente (P<0.05) entre la paja de avena y pata de sorgo, y cebada vana (Cuadro 29). Además la DIVMS fue diferente entre tratamientos y el rastrojo de maíz la aumentó (P<0.05). Pero la concentración milimolar de AGV, 163.6 mM, producción de acético, 44.45 mM, propiónico, 32.92 mM y butírico, 22.60 mM fueron similares (P>0.05) entre los esquimos agrícolas.

Cuadro 29. Variables químico fermentativas de esquilmos agrícolas

Variable Tratamiento	pH	DIVMS %	Acético mM por 100 Mm producidos	Propiónico	Butírico	Total mM
Triticale	6.8 ^{ab}	32.73 ^b	43.13	34.21	22.66	159.19
Rastrojo de maíz Texcoco	6.84 ^{ab}	36.43 ^a	43.24	31.44	25.32	150.79
Paja de avena	6.89 ^a	28.29 ^{bc}	47.25	31.52	21.22	169.94
Rastrojo de maíz Querétaro	6.82 ^{ab}	38.70 ^a	45.62	32.61	21.76	163.89
Pata de sorgo	6.79 ^b	27.37 ^c	43.47	34.54	22.00	171.51
Cebada vana	6.78 ^b	30.01 ^{bc}	44.12	33.21	22.66	166.3
Error estándar	0.46	0.78	6.92	6.23	2.43	19.21

a, b, c Valores con literales diferentes en una columna son diferentes estadísticamente (Tukey; $P < 0.05$); EEM: Error estándar de la media; DIVMS: Degradación *in vitro* de la materia seca; mM: concentración milimolar.

6.2.1 Variables microbiológicas

La fermentación de esquilmos agrícolas a las 72 h, produjo una población de bacterias totales y celulolíticas similar ($P > 0.05$) entre tratamientos (Cuadro 30).

Cuadro 30. Población de bacterias totales y celulolíticas de seis esquilmos agrícolas

Tratamiento	Bacterias totales* mL ⁻¹	Bacterias celulolíticas mL ⁻¹		
		Media	Límite inferior	Límite superior
Triticale	5.30E+09	1.50E+07	3.00E+06	4.40E+07
Rastrojo de maíz Texcoco	7.50E+09	2.30E+06	4.00E+05	1.10E+07
Paja de avena	7.20E+09	9.30E+06	1.15E+06	3.80E+07
Rastrojo de maíz Querétaro	5.10E+09	2.30E+07	4.00E+06	2.00E+08
Pata de sorgo	1.24E+10	3.90E+06	7.00E+05	1.50E+07
Cebada vana	1.12E+10	2.30E+06	4.00E+05	1.20E+07

*No hubo diferencia significativa (Tukey; $P < 0.05$).

6.7 Discusión

La DIVMS promedio, 31.92 % de los esquilmos agrícolas fue similar, a la reportada para paja de avena por Plata *et al.* (1994) y superiores a las reportadas por Lozano *et al.* (1991) y Yescas-Yescas *et al.* (2004). El rastrojo de maíz incrementó su DIVMS en 5 % comparado con los otros ingredientes (37.13 %), y los resultados son superiores a los observados por Yescas-Yescas *et al.* 2004 y Lozano *et al.* (1991), pero similares a los de Alanís *et al.* (1992).

La concentración molar y proporción de AGV, así como la concentración de bacterias totales y celulolíticas fue similar entre ingredientes. Esto puede atribuirse a la similitud de sus componentes químicos, principalmente PC, FDN y FDA.

La cebada vana redujo la concentración molar de biogás y CH₄ solamente a las 24 y 48 h, mientras que la concentración molar de AGV y la población de bacterias totales y celulolíticas fueron similares entre tratamientos. Esto sugiere que la reducción del biogás y CO₂ en la cebada vana en las primeras 48 h se puede atribuir a su tipo de fibra. Así, celulosa, hemicelulosa y lignina, se correlacionan con la producción de biogás después de 24 h de fermentación, y Sing *et al.* (2012) reportan una relación positiva entre la cantidad de FDN y celulosa con la producción de CH₄.

La celulosa, amorfa o cristalina, es otro componente de la fibra que afecta la producción de CH₄ en las primeras horas de fermentación, y un aumento de celulosa cristalina en las pajas afecta la solubilidad en agua y reduce la afinidad con las enzimas microbianas, requiriendo mayor cantidad de exoglucanasas y tiempo de fermentación (Liu y Huang 2005; Jeoh *et al.*, 2007). La celulosa amorfa incrementa la degradación *in vitro* (+5.58 %), producción de biogás (+13.44 %), y CH₄ (+14.63 %) comparada con celulosa cristalina (Vaňradyova *et al.*, 2002). Estos factores limitarían la producción de biogás y de CH₄ de la cebada a las 24 h y después la aumentarían, por lo cual el CH₄ no fue diferente a las 72 h de fermentación. Estos resultados coinciden con los de Yu *et al.* (2012), quienes reportan una máxima degradación de la celulosa de 0.14 g L⁻¹ h⁻¹ en condiciones anaerobias de después de 51.5 h.

6.8 Conclusiones

El potencial de producción de biogás, CH₄, CO₂, pH, DIVMS, producción molar de ácidos grasos a las 72 h de fermentación no fueron modificadas por el tipo de esquilmo agrícola bajo las condiciones evaluadas. Por lo tanto, el uso de los esquilmos evaluados en la formulación de dietas dependerá de la disponibilidad en la región y el contenido de nutrientes, pero no por su capacidad para producir CH₄.

Literatura citada

- Alanís, R., J. E. Riquelme V., y S. González. 1992. Efectos de la suplementación nitrogenada y energética en la digestibilidad *in vitro* de la celulosa. *Agrociencia. Serie Ciencia Animal* 2(3): 279-294.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 2005. *Official Methods of Analysis. Edition 18.* Association of Official Analytical Chemists. Washington, 29 DC, EE.UU. Pp1928.
- Basurto, G., A. Escamilla, S. Moya, E. Ramírez, J. Becerra. 2012. Composición química, digestibilidad y cinética ruminal de la digestión de residuos agrícolas tratados con explosión de vapor. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias.* 3 (4): 407-424.
- Blummel, M., D. I. Givens, A. R. Moss. 2005. Comparison of methane produced by straw fed sheep in open-circuit respiration with methane predicted by fermentation characteristics measured by an *in vitro* gas procedure. *Animal Feed Science and Technology.* 123–124: 379–390.
- Boadi, D. A., K. M. Wittenberg. 2002. Methane production from dairy and beef heifers fed forages differing in nutrient density using the sulphur hexafluoride (SF₆) tracer gas technique. *Canadian Journal of Animal Science.* 82:202-206.
- Buranov, A., G. Mazza. 2008. Lignin in straw of herbaceous crops. *Industrial crops and products.* 28: 237–259.
- Cobos, M. A., M. T. Yokoyama. 1995. *Clostridium paraputrificum var ruminantium*: colonization and degradation of shrimp carapaces *in vitro* observed by scanning electron microscopy. *In: Rumen Ecology Research Planning, Proceedings of Workshop.* Wallace, R. J., and A. Lahlou-Kassi (eds.). Addis Abeba, Ethiopia. Pp: 151-161.
- Harrigan, W.F., M. E. McCance. 1979. *Métodos de Laboratorio en microbiología de alimentos y productos lácteos.* Editorial Academia. León, España. 419 p.

- Jeoh, T., C. I. Ishizawa, M. F. Davis, M. E. Himmel, W. S. Adney, D. K. Johnson. 2007. Cellulase digestibility of pretreated biomass is limited by cellulose accessibility. *Biotechnology Bioengineering*. 98: 112–122.
- Johnson, K. A., D. E. Johnson. 1995. Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*. 73:2483-2492.
- Kellems, R. O., D. C. Church. 2002. Roughages. *In: Livestock feeds and feeding*. Kellems R. O., D. C. Church (Eds). 5^a ed. ED. Prentice Hall. New Jersey. Pp: 86-116.
- Liu, R., H. Yu, Y. Huang. 2005. Structure and morphology of cellulose in wheat straw. *Cellulose*. 12: 25–34.
- Lozano, O. G., R. Herrera y Saldaña, S. González, R. Bárcena. 1991. Efecto de la degradabilidad de los ingredientes en la digestibilidad *in vitro* e *in vivo* de raciones para ovinos. *Agrociencia*. 1(2): 117-134.
- Posada, S. L., R. R. Noguera. 2005. Técnica *in vitro* de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. *Livestock Research for Rural Development*. Vol. 17, Art. # 36, from <http://www.lrrd.org/lrrd17/4/posa17036.htm>. Consultado el 30 de junio de 2014.
- Plata, P. F., G. D. Mendoza, J. R. Bárcena-Gama, S. González. 1994. Effect of a yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on neutral detergent fiber digestion in steers fed oat straw based diets. *Animal Feed Science and Technology*. 49: 203-210.
- Singh, S., B. P. Kushwahab, S. K. Naga, A. K. Mishraa, A. Singha, U. Y. Anele. 2012. *In vitro* ruminal fermentation, protein and carbohydrate fractionation, methane production and prediction of twelve commonly used Indian green forages. *Animal Feed Science and Technology*. 178: 2-11.
- Triolo, J., S. G. Sommer, Henrik B. Møller, M. R. Weisbjerg, X. Y. Jiang. 2011. A new algorithm to characterize biodegradability of biomass during anaerobic digestion: Influence of lignin concentration on methane production potential. *Bioresource Technology*. 102: 9395–9402.
- Vaňáryová, Z., I. Zelená, P. Siroka. 2000. *In vitro* study of the rumen and hindgut fermentation of fibrous materials (meadow hay, beech sawdust, wheat straw) in sheep. *Animal Feed Science and Technology* 83:127-138.
- Waghorn, G.C., M.H. Tavendale, D.R. Woodfield. 2002. Methanogenesis from forages fed to sheep. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association* 64:167-171.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*. 74: 3583-3579.

- Yescas-Yescas, R., R. Bárcena-Gama, G. Mendoza-Martínez, S. González- Muñoz, Cobos-Peralta, y Ortega-Cerrilla. 2004. Digestibilidad *in situ* de dietas con rastrojo de maíz o paja de avena con enzimas fibrolíticas.
- Yu, L., C. Zi-Xiang, T. Xin, K. Li, W. Li. 2012. Anaerobic degradation of microcrystalline cellulose: Kinetics and micro-scale structure evolution. *Chemosphere*. 86:348-353.

7. EXPERIMENTO V. EVALUACIÓN DEL POTENCIAL *in vitro* DE PRODUCCIÓN DE BIOGÁS, CH₄, CO₂ Y VARIABLES QUÍMICO-FERMENTATIVAS DE SIETE PASTAS DE OLEAGINOSAS

Mayra Iliana Rivas Martínez, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2015

7.1 Resumen

El objetivo de esta investigación fue calcular el potencial de biogás, metano (CH₄), y bióxido de carbono (CO₂) de siete pastas de oleaginosas de uso común para la alimentación de rumiantes en México (ajonjolí, dos muestras de cártamo, soya, harinolina, ajonjolí tostado y canola). El diseño experimental fue completamente al azar, los tratamientos fueron las siete pastas de oleaginosas. Los datos se analizaron con un ANDEVA y las medias de tratamientos se analizaron con la prueba de Tukey (P<0.05), y se usó el SAS para el análisis. En este estudio se utilizó la prueba de biogás *in vitro* a 72 h con un medio de cultivo anaerobio para bacterias ruminales. La producción de biogás se midió a 24, 48 y 72 h de incubación. La proporción de CH₄ y CO₂ se analizó por medio de cromatografía de gases. A 72 h se midió: pH, ácidos grasos volátiles (AGV), concentración de bacterias totales y celulolíticas, y la degradación *in vitro* de la materia seca (DIVMS). La pasta de ajonjolí tostado tuvo la menor (P<0.0001) producción de CH₄ y CO₂ a 24, 48 y 72 h, pero tuvo la mayor (P<0.0001) concentración molar de CH₄, expresada por 100 M de biogás producido. La pasta de soya tuvo mayor (P<0.0001) concentración molar de biogás, CH₄ y CO₂ a 24, 48 y 72 h, su proporción de CH₄ fue menor (P<0.05) a 24 y 48 h, y mostró mejores características fermentativas, mayor cantidad de AGV, ácido propiónico y DIVMS (P<0.0001). La pasta de soya tuvo mejor eficiencia de fermentación. Las pastas de oleaginosas no pueden ser intercambiables entre sí debido por sus diferencias en el potencial de producción de CH₄.

Palabras clave: gases efecto invernadero, rumiantes, CH₄, CO₂, ácidos grasos volátiles

EVALUATION OF *in vitro* POTENTIAL BIOGAS, CH₄, CO₂ AND CHEMICAL-FERMENTATIVE VARIABLES OF OIL MEALS

Mayra Iliana Rivas Martínez, Dra.
Colegio de Postgraduados, 2015

ABSTRACT

The objective of this research was to calculate the biogas, methane (CH₄) and carbon dioxide (CO₂) potential from seven oilmeals commonly used for feeding ruminants in Mexico (sesame, two samples of safflower, soybean, cottonseed, roasted sesame and canola meals). The experimental design was completely randomized, treatments were the seven oil meals, data were analyzed with ANOVA and treatments means were compared with the Tukey test ($P < 0.05$); these analysis were carried out using SAS. In this study an *in vitro* biogas test was used during 72 h, with an anaerobic culture medium for ruminal bacteria, containing oilmeals as an energy source. The biogas production was analyzed at 24, 48 and 72 h of incubation. The CH₄ and CO₂ proportion was quantified by gases chromatography. At 72 h, pH, volatile fatty acid (VFA) were measured and total and cellulolytic bacteria population and *in vitro* dry matter degradation (IVDMD) was quantified. Toasted sesame meal showed the lowest ($P < 0.0001$) CH₄ and CO₂ production at 24, 48 and 72 h, but it had highest ($P < 0.0001$) amount of CH₄, expressed per 100 M of biogas produced. The soybean produced the highest concentration ($P < 0.0001$) of biogas, CH₄ and CO₂ at 24, 28 h and 72 h, and its CH₄ proportion was lowest at 24 and 48 h ($P < 0.05$), besides it had better fermentative characteristics, highest VFA amount, propionic acid and IVDMD ($P < 0.0001$). Soybean meal showed better fermentation efficiency, and oilseed meals may not be interchangeable due to their differences in CH₄ production potential.

Key words: greenhouse gases, ruminants, CH₄, CO₂, volatile fatty acids.

7.2 Introducción

Las plantas oleaginosas son muy valiosas para el ser humano y se distinguen de otras plantas comestibles, como cereales, granos y tubérculos, porque sus frutos y semillas contienen ácidos grasos comestibles, y proteína (Matthäus y Angelini, 2003) indispensables para la nutrición de las personas. Al extraer el aceite de las semillas queda una pasta con un alto contenido de proteína de alta calidad, la cual se usa para la alimentación animal (Comité Nacional Sistema Producto-Oleaginosas, 2012).

Las pastas de oleaginosas contienen 35 a 60 % o más de proteína (Moure *et al.*, 2006), constituyen entre el 20 y 30 % de las dietas para bovinos, porcinos y aves, y proveen más de la mitad de la proteína (Dale, 1996), excepto la pasta de cártamo que proporciona cantidades menores, y además aportan nitrógeno en forma de proteína verdadera (90 %), la cual es altamente digestible y de un valor biológico de bueno a moderado. Algunas pastas tienen niveles bajos de cisteína, metionina, y lisina (pero la pasta de soya es rica en lisina), y moderados o bajos de vitamina B, y bajos de caroteno y vitamina E (Kellems y Church, 2002).

Los carbohidratos y proteínas de los alimentos son fermentados durante la fermentación microbiana del rumen, a AGV (acetato, propionato y butirato principalmente y valérico, isovalérico e isobutirato), CO₂, y CH₄, y este último es eliminado vía eructo hacia el ambiente por el rumiante (McAllister *et al.*, 1996). Por lo tanto, es importante incrementar las estrategias de mitigación de CH₄ en rumiantes, como elegir alimentos para rumiantes con bajo potencial de producción de CH₄, y las pastas de oleaginosas tienen buen contenido nutricional y una baja producción de CH₄. Lee *et al.* (2003) reportan que las pastas de oleaginosas disminuyen la producción *in vitro* de CH₄, comparado con granos, forrajes y salvados, y las pastas de coco y germen de maíz produjeron una cantidad inferior de CH₄ a 6 y 24 h de incubación.

La adición de pastas de soya y canola en dietas para vaquillas de razas para carne disminuyó la producción diaria de CH₄ expresada como L d⁻¹, L kg⁻¹ de consumo de MS, porcentaje del consumo de la energía total, y L kg⁻¹ del promedio de la ganancia diaria de la canal (Jordan *et al.*, 2006). Sin embargo, según Johnson *et al.*

(2002) dietas para vacas lecheras con harinolina y pasta de canola, con 2.3, 4.0, y 5.6 % de grasa, no afectaron las emisiones de CH₄; además Franco *et al.* (2013) no observaron cambios de la metanogénesis *in vitro* al incluir pasta de soya y torta de algodón en dietas para novillos en finalización. Al respecto, se debe de considerar que las pastas de oleaginosas pueden ser intercambiables entre sí, y cada una posee propiedades nutricionales y potencial de producción de CH₄ específicos.

7.3 Objetivo general

Calcular el potencial de producción de biogás, CH₄ y CO₂ de siete pastas de oleaginosas.

7.3.1 Objetivos particulares

- Evaluar *in vitro* las variables, DIVMS, AGV y pH, de siete pastas de oleaginosas.
- Evaluar *in vitro* las variables microbiológicas, concentración de bacterias totales y celulolíticas de siete pastas de oleaginosas.

7.4 Hipótesis

Las pastas de oleaginosas tienen diferentes características fermentativas, por lo tanto su potencial de producción de CH₄ es diferente.

7.5 Materiales y métodos

7.5.1 Ubicación del experimento

El experimento se realizó en el laboratorio de Microbiología ruminal y Genética Microbiana, programa IREGEP-Ganadería, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados, km 36.5 de la carretera México-Texcoco, Estado de México.

7.5.2 Material evaluado y tratamientos

Las pastas de oleaginosas evaluadas fueron: pasta de soya, pasta de ajonjolí tostado y sin tostar, harinolina, pasta de canola, provenientes del estado de Querétaro y pasta de Cártamo proveniente de los estados de Michoacán y de Jalisco. Cada una de las pastas fue considerada como un tratamiento, siete tratamientos con cinco

repeticiones por cada uno. Cada biofermentador con medio de cultivo, la pasta a evaluar y el inóculo se consideró como una unidad experimental.

Aproximadamente 200 g de cada ingrediente fueron molidas a 1 mm en un molino Willey (Arthur H. Thomas, Philadelphia, PA), para sus análisis.

7.5.3 Análisis químico de los ingredientes

La composición química de las pastas se determinó por los procedimientos de la AOAC (2005), y el contenido de fibra detergente neutro (FDN) y ácido (FDA) con el método propuesto por Van Soest *et al.* (1991).

7.5.4 Medio de cultivo para bacterias totales

Las pastas de oleaginosas se deshidrataron hasta peso constante en una estufa Riosa® a 60 °C por 24 h y se enfriaron en un desecador PYREX®, se pesaron 0.5 g de cada ingrediente, se colocaron en viales serológicos de 120 mL, y se añadió 1 mL de agua destilada, para evitar que se quemaran en la esterilización, la cual se llevó a cabo a 121°C y 15 PSI, durante 15 min.

Después de esterilizar los viales con el sustrato, se adicionaron 45 mL de medio de cultivo para bacterias ruminales totales (Cobos y Yokoyama, 1995), bajo condiciones de esterilidad, y flujo de CO₂ para mantener la anaerobiosis. Los viales fueron sellados con tapones de neopreno azules y arillos de aluminio con una engargoladora Weatton®.

7.5.5 Preparación de la trampa de captura de biogás

El biogás se capturó en una trampa de solución salina saturada acidificada pH<2, con la cual se llenó un vial serológico de 60 mL completamente lleno, sin espacio de cabeza. La solución se preparó con 350 g de sal común (NaCl) disuelta en 1 L de agua y 5 mL anaranjado de metilo al 0.1 %. El pH se ajustó con HCl 1N.

7.5.6 Inoculación de los medios de cultivo y montaje del sistema de producción de biogás

Los medios de cultivo se colocaron en un baño María a 39 °C para temperarlos e inoculados con 5 mL de líquido ruminal fresco extraído 3 h después de la alimentación matutina de una vaca Jersey. El líquido ruminal fue trasladado a 39 °C en un termo cerrado y con el fin de eliminar protozoarios y concentrar el número de bacterias fue filtrado en una manta cielo y centrifugado a 1259 x *g* por 3 min. La concentración de bacterias del inóculo fue de 10⁸ mL⁻¹. El término de la inoculación se consideró la hora cero para las mediciones de biogás.

Los biofermentadores fueron conectados a una trampa de captura por medio de una manguera de Tygon® 3/3210 x 1/32 de 40 cm adaptada a una aguja Terumo® de calibre 20 G X1 en cada extremo. La trampa de captura tenía una aguja de las mismas especificaciones que la de la manguera, la cual se utilizó como válvula de escape, la trampa de captura se colocó de manera invertida sobre una probeta modificada con una hendidura en V en la parte superior. El paso de biogás a la trampa se obstruyó con una pinza de plástico hasta su liberación a las 24, 48 y 72 h de fermentación.

7.5.7 Producción de biogás

El volumen de biogás se cuantificó por el volumen desplazado de solución salina de la trampa a las 24, 48 y 72 h de fermentación, las trampas se retiraron después de registrar la lectura y se almacenaron de manera invertida a temperatura ambiente para evitar que el biogás atrapado se escapara, hasta su posterior análisis.

La proporción de CH₄ y CO₂ se determinó en un cromatógrafo de gases PerkinElmer® modelo Clarus 500, con un detector de conductividad térmica y una columna empacada Porapak®. Las condiciones del análisis fueron: temperatura del horno 80 °C, temperatura del detector 130 °C, temperatura de la columna empacada 170 °C, el gas acarreador fue helio a 22.3 mL m⁻¹ y el volumen de inyección fue de 300 µL. Los tiempos de retención fueron 0.73 min para el CH₄ y 1.05 min para el CO₂. La concentración molar de biogás, CH₄ y CO₂ se calculó con la ecuación general de los

gases ideales (Posadas y Noguera, 2005), con la información obtenida en el desplazamiento de biogás y las proporciones de CH₄ y CO₂.

$$\text{Moles de biogás} = \frac{P * V}{R * T}$$

Donde:

P: presión atmosférica (Atm.)

V: volumen de biogás (L)

R: constante de los gases

T: temperatura (°K)

7.5.8 pH

A las 72 h de fermentación se abrieron los biofermentadores y fue medido el pH con un potenciómetro ORION® modelo 250A calibrado a pH 4 y 7.

7.5.9 Degradación *in vitro* de la Materia seca (MS)

La MS no degradada de los biofermentadores se filtró con un sistema de filtrado con una bomba de vacío Siemens®, en papel filtro Whatman® 514 de 70 mm de diámetro, el cual se secó a peso constante en una estufa Riossa® previo al filtrado; el residuo recuperado se deshidrató por 24 h a 60°C, se pasó a un desecador PYREX®, para que se enfriara, y se pesó en una balanza analítica.

La degradación *in vitro* de la MS se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ MS degradada} = \left(\frac{\text{MS inicial} - \text{MS final}}{\text{MS inicial}} \right) * 100$$

7.5.10 Concentración molar de AGV

La concentración de AGV se cuantificó con la metodología propuesta por Erwin *et al.* (1969). Al finalizar el periodo de fermentación (72 h) se tomó una muestra de 1 mL de la parte líquida del biofermentador, la cual se fijó en 0.25 mL de ácido metafosfórico al 25 % para guardar la relación 4:1. Las muestras se centrifugaron por 10 min a 18, 890 x g, en una centrifuga Ilettich zentrifugen® Modelo EBA 21, el

sobrenadante se transfirió a viales para cromatografía, los cuales se guardaron en congelación hasta su análisis.

El análisis se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases Clarus 500 PerkinElmer®, con un detector de ionización de flama y columna capilar Elite FFAP PerkinElmer®, las condiciones del análisis fueron las siguientes: temperatura del horno 115 °C por 0.25 min, 125 °C por 0.5 min y 130 °C por 5.25 min; la temperatura de la columna 250 °C, el gas acarreador fue nitrógeno con un flujo de 23.3 mL por min y aire e hidrógeno para combustión de la flama y la inyección fue automática en un volumen de 1 µL. Los tiempos de retención fueron de 1.3 min para el ácido acético, 1.6 min para el ácido propiónico y 2.15 min para el ácido butírico.

7.5.11 Concentración de bacterias totales y celulolíticas

La población de bacterias totales por mL después de 72 h de fermentación se cuantificó con la técnica de conteo directo en una cámara Petroff- Hausser® y un microscopio Olympus® a 1000 X.

Una muestra de 1 mL se tomó de la parte líquida del biofermentador y se fijó en 0.25 mL de formaldehído al 10 %. Las muestras se mantuvieron en refrigeración a 4 °C hasta que se contaron, se hicieron dos diluciones con agua destilada 1:10. por la concentración de bacterias de las muestras fijadas en formaldehído y se homogenizaron en un vortex Thermolyne® (Maxi mixII). Se tomó una gota con una pipeta Pasteur y un pipeteador de barril, la cual se colocó en la cámara Petroff Hausser®, se observó al microscopio de contraste de fases Olympus® y se realizó el conteo en cinco cuadros de la cámara.

La concentración de bacterias ruminales por mL se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Bacterias por mL: } \bar{X} (FD_1) (FD_2) (2 \times 10^7)$$

Donde: \bar{X} : promedio de las bacterias observadas en los cuadros de la cámara Petroff-Housser®.

FD₁: valor inverso de la dilución usada con formaldehído

FD₂: valor inverso de dilución con agua

2×10^7 : valor obtenido por el volumen de la cámara

La concentración de bacterias celulolíticas se determinó con la técnica del número más probable (NMP) con diluciones de 10^{-1} a 10^{-10} con tres repeticiones por dilución (Harrigan y McCance, 1979), para lo cual se utilizaron tubos de cultivo de 13x100 mm y 4.5 mL de medio de cultivo anaerobio Cobos y Yokoyama (1995) intercambiando la fuente de energía por una tira de papel Whatman® N° 541 por tubo como fuente de energía. El medio de cultivo fue inoculado con 0.5 mL del líquido del biofermentador e incubado a 39 °C por 10 d.

7.5.12 Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar y los tratamientos fueron siete pastas de oleaginosas. Los datos se analizaron con el procedimiento GLM de SAS versión 9.1 (SAS Inc., Cary, NC, USA) y las medias de los tratamientos se compararon con la prueba de Tukey ($P < 0.05$). La producción de biogás, CH_4 y CO_2 se analizaron a 24, 48 y 72. El pH, DIVMS, AGV y población de bacterias totales se analizaron a las 72 h de fermentación. Para la población de bacterias totales se hizo una transformación de los datos con Log natural antes de ser analizada.

7.6 Resultados

7.6.1 Análisis químico

Los resultados del análisis químico de las pastas evaluadas (Cuadro 31) fueron: contenido de MS promedio 94.63 %, MO 94.56 %, cenizas 5.44 %, y la proteína cruda y la fibra entre los ingredientes fue muy variable, la pasta de cártamo proveniente de Michoacán contenía 12 % de PC, mientras que las demás pastas contenían 41.42 %. La pasta de cártamo proveniente de Michoacán contenía en promedio 33.26 % más FDN que las otras pastas, la FDA de la pasta de ajonjolí y soya fue inferior en 10.67 y 14.57 % a las otras pastas, respectivamente, y la pasta de cártamo Michoacán contenía 61.58 % de FDA más que las otras pastas.

Cuadro 31. Análisis químico de siete pastas de oleaginosas

Pastas	MS	MO	Cenizas	PC	FDN	FDA
	%	% MS				
Harinolina	94.22	93.23	6.77	43.81	30.69	18.96
Pasta de ajonjolí tostado	95.26	93.55	6.45	44.23	47.75	30.09
Pasta de soya	94.24	93.43	6.56	46.77	37.08	14.57
Pasta de canola	93.96	96.02	3.97	38.16	45.52	23.32
Pasta de ajonjolí	95.31	93.56	6.44	52.00	31.48	10.67
Pasta de cártamo Jalisco	95.42	95.42	4.57	23.60	64.89	46.37
Pasta de cártamo Michoacán	94.03	96.71	3.28	12.66	76.17	61.58

MS: materia seca; MO: materia orgánica; PC: proteína cruda; FDN: Fibra detergente neutro; FDA: Fibra detergente ácido.

7.6.2 Producción de biogás total *in vitro* por cada 100 g de MS

La concentración molar de biogás de las pastas evaluadas se muestra en el Cuadro 32.

Cuadro 32. Concentración molar de biogás acumulado de siete pastas de oleaginosas a 72 h de fermentación

Tiempo de fermentación, h	24	48	72
Tratamiento	Biogás acumulado, M		
Harinolina	0.192 ^{cd}	0.225 ^{bc}	0.240 ^{bc}
Pasta de ajonjolí tostado	0.093 ^e	0.107 ^e	0.121 ^d
Pasta de soya	0.310 ^a	0.338 ^a	0.348 ^a
Pasta de canola	0.280 ^{ab}	0.313 ^a	0.324 ^a
Pasta de ajonjolí	0.238 ^{bc}	0.282 ^{ab}	0.294 ^{ab}
Pasta de cártamo Jalisco	0.153 ^d	0.160 ^{de}	0.194 ^c
Pasta de cártamo Michoacán	0.064 ^e	0.160 ^{de}	0.213 ^c
EEM	0.012	0.013	0.013
Valor de P	<0.0001	<0.0001	<0.0001

a, b, c Valores con literales diferentes en una columna son diferentes estadísticamente (Tukey; P<0.05), EEM: Error estándar de la media, M: Concentración molar.

La fermentación con pasta de soya produjo 45.16, 57.29 y 40.37 % más biogás (Cuadro 32) a 24, 48 y 72 h, que las otras pastas. La pasta de ajonjolí tostado redujo la concentración molar de biogás *in vitro* ($P < 0.0001$) a las 24, 48 y 72 h (- 60.35, 56.50, 54.85 %, que el promedio, respectivamente).

7.6.3 Concentración molar de CH₄ y CO₂ por cada 100 g de MS

La producción de CH₄ y CO₂ de las pastas de se muestra en el Cuadro 33.

Cuadro 33. Concentración molar de CH₄ y CO₂ acumulados por 100 g de MS en siete pastas de oleaginosas.

Tiempo de fermentación, h	24	48	72
Tratamiento	CH ₄ acumulado, M		
Harinolina	0.040 ^a	0.052 ^a	0.058 ^a
Pasta de ajonjolí tostado	0.024 ^{bc}	0.032 ^b	0.040 ^b
Pasta de soya	0.041 ^a	0.051 ^a	0.059 ^a
Pasta de canola	0.043 ^a	0.054 ^a	0.061 ^a
Pasta de ajonjolí	0.035 ^{ab}	0.049 ^a	0.054 ^{ab}
Pasta de cártamo Jalisco	0.035 ^{abc}	0.042 ^{ab}	0.048 ^{ab}
Pasta de cártamo Michoacán	0.019 ^c	0.043 ^{ab}	0.055 ^{ab}
EEM	0.002	0.003	0.003
Valor de P	0.0001	0.052	0.0001
	CO ₂ acumulado		
Harinolina	0.152 ^c	0.173 ^b	0.181 ^b
Pasta de ajonjolí tostado	0.068 ^d	0.074 ^d	0.080 ^c
Pasta de soya	0.269 ^a	0.286 ^a	0.289 ^a
Pasta de canola	0.244 ^{ab}	0.260 ^a	0.262 ^a
Pasta de ajonjolí	0.202 ^b	0.233 ^a	0.241 ^a
Pasta de cártamo Jalisco	0.122 ^c	0.139 ^{bc}	0.146 ^b
Pasta de cártamo Michoacán	0.044 ^d	0.118 ^{cd}	0.157 ^b
EEM	0.010	0.012	0.011
Valor de P	0.0001	0.0001	0.0001

a, b, c Valores con literales diferentes en una columna son diferentes estadísticamente (Tukey; $P < 0.05$); EEM: Error estándar de la media; M: Concentración molar.

La concentración molar de CH₄ (Cuadro 33) fue superior (P<0.0001) en harinolina, pasta de soya y pasta de canola en promedio + 41.88, 38.81 y 32.20 % a 24, 48 y 72 h, respectivamente, comparado con pasta de ajonjolí tostado. Y la concentración molar de CO₂ a 24 y 48 h fue inferior (P<0.0001) en la pasta de ajonjolí tostado comparado con las otras pastas. A 72 h la mayor concentración molar de CO₂ fue en la pasta de soya, canola y ajonjolí, pero se redujo en la pasta de ajonjolí tostado (P<0.05).

7.6.4 Concentración molar de CH₄ y CO₂ por cada 100 M de biogás de siete pastas de oleaginosas

De la concentración molar de biogás a 24 h, el 28.38 % fue CH₄ para la pasta de cártamo Michoacán y la pasta de ajonjolí tostado, cantidad superior (P<0.05) a las otras pastas. A 48 h, la pasta de ajonjolí tostado produjo mayor (P<0.05) concentración molar de CH₄ respecto a la pasta de cártamo de Michoacán. Y a las 72 h el 71.38 % de la concentración molar de biogás correspondió a CH₄ para la pasta de soya, y canola, y fue superior (P<0.05) a otras pastas.

El CO₂ (Cuadro 34) a 24 h representó el 84.25 % del biogás para las pastas soya, ajonjolí y canola. A las 48 h, la producción de CO₂ fue mayor para la pasta de cártamo de Michoacán (75.85 %) comparado con la de ajonjolí tostado (42.24 %), y a las 72 h la pasta de cártamo de Michoacán produjo más (P<0.0001) CO₂, comparada con la pasta de soya y la de canola.

Cuadro 34. Concentración molar de CH₄ y CO₂ por cada 100 M de biogás producido de siete pastas de oleaginosas

Hora/Tratamiento	Tiempo de fermentación, h					
	24	48	72	24	48	72
	CH ₄ , M			CO ₂ , M		
Harinolina	21.22 ^{bc}	36.99 ^{bc}	43.5 ^{bc}	78.78 ^{ab}	62.99 ^{ab}	56.50 ^{ab}
Pasta de ajonjolí tostado	25.30 ^{ab}	57.76 ^a	58.03 ^b	74.70 ^{bc}	42.24 ^c	41.96 ^{bc}
Pasta de soya	13.41 ^c	39.67 ^{bc}	64.99 ^{ab}	86.59 ^a	60.32 ^{ab}	34.00 ^c
Pasta de canola	14.95 ^c	39.76 ^{bc}	77.77 ^a	85.05 ^a	60.24 ^{ab}	22.22 ^c
Pasta de ajonjolí	14.90 ^c	30.46 ^{bc}	44.08 ^{bc}	85.10 ^a	69.53 ^{ab}	58.95 ^{ab}
Pasta de cártamo Jalisco	19.71 ^{bc}	45.35 ^{ab}	43.48 ^{bc}	80.29 ^{ab}	54.65 ^{bc}	56.52 ^{ab}
Pasta de cártamo Michoacán	31.46 ^a	24.15 ^c	25.02 ^c	68.54 ^c	75.85 ^a	74.98 ^a
EE	2.11	3.66	4.73	2.11	3.65	4.85
Valor de P	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

a, b, c Valores con literales diferentes en una columna son diferentes estadísticamente (Tukey; P<0.05); EEM: Error estándar de la media; M: Concentración molar.

7.6.5 Variables químico fermentativas

El pH (Cuadro 35) de las pastas fue neutro 7.13, la DIVMS fue superior (P<0.05) en 15.64 % en las pastas de harinolina, ajonjolí tostado, soya y canola. La producción de ácido acético se incrementó (P<0.05) en 16.11 mM y la de ácido propiónico disminuyó 7.5 mM en pasta de cártamo de Michoacán. Por el contrario la pasta de soya disminuyó (P<0.05) la producción de ácido acético e incrementó la de propiónico y butírico. La concentración molar de AGV (Cuadro 35) fue superior para la harinolina, pasta de soya, ajonjolí y canola, comparado con pasta de cártamo Jalisco, y pasta de ajonjolí tostado.

Cuadro 35. Variables químico fermentativas de siete pastas de oleaginosas

Tratamiento	pH	DIVMS	Acético	Propiónico	Butírico	Total mM
		%	Mm por 100	Mm producidos		
Harinolina	7.02 ^b	32.94 ^a	52.49 ^c	29.41 ^c	18.11 ^b	152.99 ^a
Pasta de ajonjolí tostado	7.36 ^a	36.0 ^a	60.75 ^b	22.58 ^e	16.67 ^c	124.2 ^{bc}
Pasta de soya	7.24 ^{ab}	39.37 ^a	50.24 ^d	32.71 ^a	17.04 ^c	147.74 ^{ab}
Pasta de canola	7.12 ^{ab}	33.55 ^a	50.46 ^d	31.04 ^b	18.50 ^{ab}	145.95 ^{ab}
Pasta de ajonjolí	7.09 ^{ab}	18.97 ^b	49.93 ^d	30.87 ^{cb}	19.19 ^a	134.71 ^{ab}
Pasta de cártamo Jalisco	7.11 ^{ab}	20.77 ^b	53.70 ^c	27.06 ^d	19.23 ^a	108.04 ^c
Pasta de cártamo Michoacán	7.00 ^b	16.43 ^b	69.04 ^a	21.45 ^e	9.51 ^d	65.6 ^d
EEM	0.14	1.54	0.64	0.78	0.47	5.58

^{a, b, c} Valores con literales diferentes en una columna son diferentes estadísticamente (Tukey; P<0.05); EEM: Error estándar de la media; DIVMS: degradación *in vitro* de la materia seca; Mm: concentración milimolar.

7.6.6 Variables microbiológicas

La población de bacterias totales y celulolíticas a 72 h de fermentación se muestran en el Cuadro 35. La población de bacterias totales fue similar (P<0.05) para todas las pastas evaluadas, pero la población de bacterias celulolíticas fue reducida en la pasta de ajonjolí (Cuadro 35).

Cuadro 36. Población de bacterias totales y celulolíticas en siete pastas

Tratamiento	Bacterias totales*	Bacterias Celulolíticas	Límite inferior	Límite superior
Harinolina	5×10^9	4×10^7	4×10^6	1.3×10^8
Pasta de ajonjolí tostado	5.1×10^{10}	2.3×10^6	4×10^5	1.2×10^7
Pasta de soya	5.2×10^9	3.0×10^4	5×10^3	9.7×10^6
Pasta de canola	7.0×10^9	1.5×10^6	3×10^5	9.7×10^6
Pasta de ajonjolí	6.0×10^9	1.1×10^3	3×10^2	9.7×10^3
Pasta de cártamo Jalisco	8.8×10^9	1.7×10^6	3×10^5	3.6×10^6
Pasta de cártamo	8.1×10^9	2.0×10^6	7×10^5	8.9×10^6
Michoacán				
Error estándar	0.071			

*No hay diferencias significativas ($P > 0.05$; Tukey)

7.7 Discusión

La fermentación *in vitro* a las 72 h fue diferente en pH, DIVMS, concentración y proporción molar de AGV ($P < 0.05$), sin embargo, la concentración de bacterias totales fue similar para los tratamientos ($P > 0.05$). Esto muestra una cantidad de bacterias similar, pero las poblaciones bacterianas desarrolladas en la fermentación fueron diferentes, lo cual se reflejó en una concentración inferior de bacterias celulolíticas en la pasta de ajonjolí.

La pasta de soya presentó una concentración molar de CH_4 superior a las otras pastas debido a la cantidad alta de proteína cruda (46.77 %) y baja de fibra. Miller, (1995) y Wagner *et al.* (2013) reportan que la alimentación o incubación de ingredientes ricos en proteína cruda estimulan especies de microorganismos que viven en consorcio celulolíticas-metanogénicas las cuales acoplan la degradación de carbohidratos con el uso de hidrógeno para la reducción de CO_2 a CH_4 . Según Lee *et al.* (2003), las pastas de soya y canola sintetizan mayor cantidad de CH_4 (7.14 y 7.45 mL por 0.2 g de MS fermentada) comparada con pasta de germen de maíz, harinolina, pasta de girasol, pasta de coco, y pasta de gluten de maíz a 24 h de fermentación, Rossi *et al.* (2001) también reportan que la pasta de soya produce mayor cantidad de CH_4 a 24 h de

fermentación, comparada con la pasta de girasol y la harinolina, pero la cantidad de CH_4 (0.291 M por 100 g de MS) es superior en 85.91 % a la observada en el presente estudio (0.041 M por 100 g de MS). Según Lee *et al.* (2003) los sustratos altamente fermentables por los microorganismos del rumen en pasta de germen de maíz causaron cantidades altas de biogás y CH_4 , mientras que niveles bajos de sustratos fermentables y un contenido alto de grasa en pasta de palma suprimieron la actividad microbiana, y por lo tanto la cantidad de biogás y CH_4 . En contraste, Franco *et al.* (2013) no reportan disminución de la metanogénesis al incluir pasta de soya y torta de algodón en dietas para ganado de carne en finalización.

La disminución en la concentración molar de biogás afectó la de CH_4 y CO_2 en la pasta de ajonjolí tostado; sin embargo, el CH_4 , representó el 23.36, 57.76 y 58.03 % de la concentración molar de biogás a 24, 48 y 72 h superior a las otras pastas, ello sugiere que esta pasta contiene pocos compuestos de fermentación rápida, lo cual limita su producción de biogás y CH_4 . Además, un aumento en el ácido acético y reducción de propiónico se ha atribuye al incremento del CH_4 , característica que también presentó la pasta de ajonjolí y fue reportada por Moss *et al.* (2000), Knapp *et al.* (2014) y Wang *et al.* (2014).

7.8 Conclusiones

Las variables evaluadas fueron diferentes para los tratamientos incluyendo la concentración molar de biogás, CH_4 y CO_2 , que se incrementaron para incrementaron para la pasta de soya y se redujeron con pasta de ajonjolí tostado. En consecuencia, las pastas de oleaginosas no pueden sustituirse entre sí debido a sus características específicas en su composición química, variables fermentativas y potencial y producción de CH_4 .

Literatura citada

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 2005. Official Methods of Analysis. Edition 18. Association of Official Analytical Chemists. Washington, 29 DC, EE.UU. Pp 1928.

- Cobos, M. A., M. T. Yokoyama. 1995. *Clostridium paraputrificum* var *ruminantium*: colonization and degradation of shrimp carapaces *in vitro* observed by scanning electron microscopy. *In: Rumen Ecology Research Planning, Proceedings of Workshop*. Wallace, R. J., and A. Lahlou-Kassi (eds.). Addis Abeba, Ethiopia. Pp 151-161.
- Comité Nacional Sistema-producto Oleaginosas, 2012, disponible en: <http://www.oleaginosas.org/>. Consultado el 25-08-14.
- Dale, N. 1996. Variation in feed ingredient quality: oilseed meals. *Animal Feed Science and Technology* 59: 129-135.
- Erwin, E. S., G. J. Marco, E. Emery. 1961. Volatile fatty acid analysis of blood and rumen fluid by chromatography. *Journal of Dairy Science*. 44(9):1768-1771.
- Franco, A. L., I. Y. Mizubuti, J. A. Azevêdo, E. L. Ribeiro, E. S Pereira, E. L Peixoto, D. M. Ferreira, A. Q. Andrade. 2013. *In vitro* rumen fermentation and methane production from diets containing cottonseed cake. *Semina: Ciências Agrarias*: 34(4):1955-1966.
- Harrigan, W. F., M. E. McCance. 1979. Métodos de laboratorio en microbiología de alimentos y productos lácteos. ED. Academia. León España. Pp 419.
- Johnson, K. A., R. L. Kincaid, H. H. Westberg, C. T. Gaskins, B. K. Lamb, and J. D. Cronrath. 2002. The effect of oilseeds in diets of lactating cows on milk production and methane emissions. *Journal of Dairy Science*. 85:1509–1515.
- Jordan, E., D. K. Lovett, F. J. Monahan, J. Callan, B. Flynn, F. P. O'Mara. 2006. Effect of refined coconut oil or copra meal on methane output and on intake and performance of beef heifers. *Journal of Animal Science*. 84:162-170.
- Kellems, R. O., D. C. Church. 2002. Supplemental protein source. *In Livestock feeds and feeding*. Kellems R.O., D.C. Church (Eds). 5ª edición. ED. Prentice Hall. New Jersey. Pág 86-116.
- Lee, H. J., S. C. Lee, J. D. Kim, Y. G. Oh, B. K. Kim, C. W. Kim, K. J. Kim. 2003. Methane production potential of feed ingredients as Measured by *In vitro* Gas test. *Asian-Australian Journal of Animal Science* 16(8):1143-1150.
- Matthäus, B., L. G. Angelini. 2005. Anti-nutritive constituents in oilseed crops from Italy. *Industrial Crops and Products*. 21: 89–99.
- McAllister, T. A., E. K. Okine, W. G. Mathison, K. J. Cheng. 1996. Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. *Canadian Journal of Animal Science*. 76:231-243.

- Miller, T. L. 1995. Ecology of methane production and hydrogen sinks in the rumen. Ruminant physiology: digestion, metabolism, growth and reproduction: proceeding of the eight international symposium on ruminant physiology. 317-331.
- Moss, A., J. Jouan, J. Newbold. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Annales de Zootechnie*. 49:231-253.
- Moure A., J. Sineiro, H. Domínguez, J. C. Parajo. 2006. Functionality of oilseed protein products: A review. *Food Research International* 39: 945-963.
- Posada, S. L., R. R. Noguera. 2005: Técnica *in vitro* de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. *Livestock Research for Rural Development*. Vol. 17, Art. # 36. Disponible en: <http://www.lrrd.org/lrrd17/4/posa17036.htm>. Consultado el 30 de junio de 2014.
- Rossi, F., P. Vecchia, F. Masoero. 2001. Estimate of methane production from rumen fermentation. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 60: 89–92.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*. 74:3583-3579.
- Wagner, A. O., P. Lins, C. Malin, C. Reitschuler, P. Illmer. 2013. Impact of protein, lipid and cellulose containing complex substrates on biogas production and microbial communities in batch experiments. *Science of the Total Environment*. 458-460: 256–266.

8. EXPERIMENTO VI. EVALUACIÓN *in vitro* DE CUATRO DIETAS CON ALTO Y BAJO POTENCIAL DE PRODUCCIÓN DE CH₄ PARA CORDEROS EN FINALIZACIÓN

Mayra Iliana Rivas Martínez, Dra.
Colegio de Postgraduados, 2015

8.1 RESUMEN

El objetivo de este estudio fue, evaluar la producción *in vitro* de biogás, metano (CH₄) y bióxido de carbono (CO₂) de cuatro dietas con ingredientes de alto y bajo potencial de producción de CH₄ con pastos templados y tropicales. Las dietas fueron isoproteínicas e isoenergéticas para corderos en crecimiento. El diseño experimental fue un factorial 2x2 de tratamientos: tipo de pasto (tropical y templado), y potencial de producción de CH₄ (alto y bajo); dietas consideradas como tratamientos: pasto tropical de potencial en producción de CH₄ alto (T1); pasto tropical con potencial de producción de CH₄ bajo (T2), pasto templado con potencial de producción de CH₄ alto (T3) y pasto templado con potencial en producción de CH₄ bajo (T4). Las dietas fueron incubadas 72 h y el inóculo fue líquido ruminal fresco. La producción de biogás fue medida a 24, 48 y 72 h de incubación y la cantidad de CH₄ y CO₂ fue cuantificada por cromatografía de gases. Las variables: población de bacterias totales (BT) y celulolíticas (BC), pH, ácidos grasos volátiles (AGV) y degradación *in vitro* de la materia seca (DIVMS) se midieron a las 72 h de incubación. Las variables DIVMS, BT, biogás, CH₄ y CO₂ acumulado, y CO₂ y CH₄ por 100 M de biogás producido fueron estimuladas por la interacción tipo de pasto* potencial de producción de CH₄, mientras que pH, producción de AGV, ácido acético y butírico fueron superiores (P<0.05) en dietas con potencial de CH₄ alto. Las variables producción de ácido propiónico y BT no presentaron diferencias (P>0.05). La producción de biogás total, CH₄ y CO₂ aumentó para T4, mientras que para T2 la producción fue inferior (P<0.05). Por lo anterior se concluye que la propuesta de elaborar dietas con bajo potencial de CH₄ *in vitro* fue práctica solo con el uso de pastos tropicales.

Palabras clave: dietas, potencial de CH₄, CO₂, corderos.

IN VITRO EVALUATION OF FOUR DIETS WITH HIGH AND LOW CH₄ POTENTIAL FOR GROWING LAMBS

**Mayra Iliana Rivas Martínez, Dra.
Colegio de Postgraduados, 2015**

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate *in vitro* production of biogas, methane (CH₄) and carbon dioxide (CO₂) from four diets with ingredients with high and low potential for CH₄, temperate and tropical grasses. The diets were isonitrogenous and isoenergetic for growing lambs. The statistical design was completely randomized with a factorial 2x2 arrangement of treatments: type of grass (tropical and temperate), and methane potential (high and low); diets considered as treatments: high CH₄ potential containing tropical grass (T1); low CH₄ potential containing tropical grass (T2); high CH₄ potential and temperate grass (T3); and low CH₄ potential containing temperate grass CH₄ (T4). The diets were incubated for 72 h; the inoculum used was fresh rumen fluid. Biogas production was measured at 24, 48 and 72 h of incubation and the amount of CH₄ and CO₂ was quantified by gas chromatography. Total and cellulolytic bacteria, pH, volatile fatty acids (VFA) and *in vitro* dry matter degradation (IVDMD) variables were quantified at 72 h of incubation. IVDMD, total bacteria, accumulated biogas, CH₄ and CO₂, and CO₂ and CH₄ by 100 M of produced biogas, were stimulated by grass type * methane production potential interaction, whereas pH, production of VFA, acetic and butyric acid were higher (P<0.05) in diets with high methane potential. Total biogas, CH₄ and CO₂ production increased for T4, whereas lower production of these variables was for T2 (P<0.05). Therefore it is concluded that the proposed developments of diets with low potential for *in vitro* CH₄ was practical only with use of tropical grasses.

Keywords: diet, CH₄ potential, CO₂, lambs.

8.2 Introducción

La transformación de una fracción de los nutrientes de la dieta en CH₄ es una de las principales ineficiencias metabólicas en los sistemas de producción de rumiantes, además de su contribución significativa en las emisiones de gases efecto invernadero (Eckard *et al.*, 2010). La cantidad de la energía de los alimentos transformada en CH₄ está relacionada negativamente con la calidad nutritiva y la concentración de grasa en la dieta, mientras que la digestibilidad de la dieta y el tipo de carbohidratos tiene un efecto menor (Ramin y Huhtanen, 2013).

La dieta consumida por los rumiantes tiene un efecto en la producción de AGV, metanogénesis y salud del animal; un cambio en la disponibilidad de sustratos en el rumen produce un cambio en las comunidades microbianas del mismo, la absorción de los AGV y su metabolismo (Meng-meng *et al.*, 2014); por tanto, es importante entender la relación entre el animal hospedero y su microbiota ruminal. A medida que se entienda esta relación se logrará una mejor eficiencia alimenticia y se reducirá el impacto ambiental por las emisiones de CH₄ entérico (Khiaosa-ard y Zebeli, 2014).

Las estrategias nutricionales evaluadas para reducir la producción de CH₄ en rumiantes son: incrementar el nivel de grano en la dieta, inclusión de lípidos y suplementación con ionóforos (Beauchemin *et al.*, 2007). Las estrategias nutricionales o alimenticias, como la selección de alimentos que estimulan la fermentación propiónica o disminuyen la tasa de pasaje y la alimentación con dietas de mayor calidad reducen la producción de CH₄ de 2.5 a 15 % (Knapp *et al.*, 2014).

En Australia se evaluaron 128 plantas con efecto antimetanogénico sobre la síntesis de CH₄, con la identificación de compuestos asociados a la planta con bioactividad antimetanogénica en el rumen, pero no se demostró un efecto importante en la mayoría de las plantas evaluadas (Durmic *et al.*, 2010). De manera similar, de 450 plantas evaluadas por Bodas *et al.* (2008), solo dos mostraron tener un efecto antimetanogénico sin que afectaran la fermentación. Además, la evaluación de ingredientes como pastas de oleaginosas, cascarillas y salvados, y granos, muestra a las pastas como el grupo con características para la reducción de producción de CH₄

en rumiantes y las pastas de canola, soya y coco causaron una mayor reducción de la producción de CH₄ (Lee *et al.*, 2003).

La identificación de ingredientes con bajo potencial de CH₄, es el primer paso; después se requiere de estudios que permitan determinar si la formulación de dietas con ingredientes de bajo potencial de CH₄ reduce la producción de éste gas en el rumen sin afectar la eficiencia productiva de los animales. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar *in vitro* la capacidad de producción de biogás y CH₄, de cuatro dietas para ovinos en crecimiento, formuladas con ingredientes clasificados por su bajo y alto potencial de CH₄, que incluyeron pastos templados y tropicales.

8.3 Materiales y métodos

8.3.1 Diseño experimental y tratamientos

El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial 2x2 de tratamientos (dietas), dos tipos de pasto y dos niveles de potencial de producción de CH₄ (bajo y alto): 1) pasto tropical con potencial de CH₄ alto, 2) pasto tropical con potencial de producción de CH₄ bajo, 3) pasto templado con potencial de producción de CH₄ alto; y 4) con pasto templado con potencial de producción de CH₄ bajo. La unidad experimental fue un biofermentador.

8.3.2 Selección de ingredientes

En experimentos previos fueron evaluados 37 ingredientes de acuerdo a su potencial de producción de CH₄ mediante técnicas de producción de biogás *in vitro*. Los ingredientes se clasificaron en seis grupos: pastos templados y tropicales, leguminosas, granos, esquilmos agrícolas, y pastas de oleaginosas. De cada grupo se seleccionaron los que tenían un potencial de CH₄ alto y bajo.

8.3.3 Análisis químico de ingredientes y formulación de dietas

La composición química de los ingredientes seleccionados para formular las cuatro dietas se determinó usando la metodología descrita por la AOAC (2005) y el

contenido de fibra detergente neutro (FDN) y ácido (FDA) se determinó con el método propuesto por Van Soest *et al.* (1991).

Las dietas evaluadas (Cuadro 37) fueron formuladas de acuerdo a los requerimientos nutricionales de corderos en crecimiento, y se usó el programa Nutrion®. Las dietas se balancearon para un contenido de energía de 2.4 Mcal EM Kg⁻¹ MS y 14.7 % de PC (NRC, 2007).

8.3.4 Producción de biogás

Para la producción de biogás se utilizaron viales serológicos de 120 mL con 45 mL de medio de cultivo anaerobio para bacterias ruminales totales (Cobos y Yokoyama, 1995), con 0.5 g de la dieta como sustrato (Cuadro 37). El medio de cultivo fue esterilizado a 121°C, 15 PSI por 15 minutos, vertido bajo flujo de CO₂ para mantener condiciones de esterilidad y anaerobiosis. Los viales con medio de cultivo fueron cerrados con tapones de neopreno y sellados con arillos de aluminio.

Los viales se colocaron en un baño María a 39°C, y se inocularon con 5 mL de líquido ruminal fresco extraído 2 h después de la alimentación matutina, de una vaca Jersey con cánula ruminal. El líquido ruminal fue filtrado y centrifugado a 1257 x g por 3 min, con el fin de eliminar protozoarios y partículas de alimento, la concentración de bacterias del inóculo fue de 10⁸ mL⁻¹. La inoculación de los biofermentadores se tomó como la hora cero para las mediciones de biogás.

Para la cuantificación del biogás se utilizaron trampas elaboradas con una solución salina saturada preparada con 350 g de NaCl por cada litro de agua y 5 mL de naranja de metilo al 0.1, el pH de la solución se ajustó a 2 con HCl 2N, y los viales serológicos de 120 mL se llenaron completamente con esta solución.

Cuadro 37. Dietas evaluadas *in vitro* para corderos en crecimiento

Dieta con pasto tropical con alto potencial de CH ₄ (T1)			
Ingredientes utilizados	% de inclusión*	Composición nutricional de la dieta	
Maíz amarillo Ixcamilpa	49.4	EM (Mcal kg MS ⁻¹)	2.45
Alfalfa <i>var.</i> Atlixco	29.6	Proteína total (%)	14.70
King grass	13.0	Forraje (%)	42.69
Pasta de soya	8.0	Calcio	0.57
Total	100	Fósforo	0.29
Dieta con pasto tropical y bajo potencial de CH ₄ (T2)			
Maíz amarillo cordillera	41.2	EM (Mcal kg ⁻¹ MS)	2.40
Leucaena	30.3	Proteína total (%)	14.70
Pasto bermuda	15.0	Forraje (%)	45.28
Pasta de ajonjolí tostado	13.5	Calcio	0.75
Total	100	Fósforo	0.22
Dieta con pasto templado y alto potencial de CH ₄ (T3)			
Maíz amarillo Ixcamilpa	53.2	EM (Mcal Kg ⁻¹ MS)	2.55
Alfalfa <i>var.</i> Atlixco	24.96	Proteína total (%)	14.70
Pasto festuca	16.6	Forraje (%)	41.60
Pasta de soya	5.1	Calcio	0.51
Total	100	Fósforo	0.30
Dieta con pasto templado y bajo potencial de CH ₄ (T4)			
Maíz amarillo cordillera	44.95	EM (Mcal Kg ⁻¹ MS)	2.60
Alfalfa <i>var.</i> Oaxaca	25.00	Proteína total (%)	14.70
Ovillo Chapingo	22.05	Forraje (%)	47.05
Pasta de ajonjolí tostado	8.00	Calcio	0.36
Total		Fósforo	0.65

* % de inclusión en base seca, las dietas fueron formuladas con base a los requerimientos para borregos en finalización del NRC (2007).

Cada biofermentador fue conectado a una trampa de captura, por medio de una manguera de Tygon® 3/3210 x 1/32 de 40 cm adaptada a una aguja en cada extremo de la marca Terumo® de calibre 20 G X 1". La trampa tenía una aguja del mismo calibre que sirvió como válvula de escape, las trampas se colocaron sobre una probeta modificada con una hendidura en V en la parte superior y el paso del biogás a la trampa se obstruyó con una pinza de plástico hasta su liberación a 24, 48 y 72 h de fermentación. El biogás liberado se introdujo en la trampa de solución salina, desplazando a esta, la cual cayó en la probeta y de esta forma se midió el volumen de solución desplazado. Las trampas se retiraron después de tomar la lectura y se almacenaron de manera invertida a temperatura ambiente (25 °C) hasta cuantificar la proporción de CH₄ y CO₂ del biogás.

8.3.5 Determinación de CH₄ y CO₂

La proporción de CH₄ y CO₂ se determinó en un cromatógrafo de gases PerkinElmer® modelo Clarus 500, con un detector de conductividad térmica y una columna empacada Porapak®, las temperaturas del horno, detector y columna empacada fueron 80, 130 y 170 °C, respectivamente; el gas acarreador fue helio a un flujo de 22.3 mL min⁻¹, el volumen de inyección fue de 300 µL y los tiempos de retención fueron 0.73 y 1.05 min para el CH₄ y CO₂, respectivamente.

La concentración molar de biogás total, CH₄ y CO₂ (M), fue calculada por medio de la ecuación general de los gases ideales expresada en la siguiente ecuación (Posada y Noguera, 2005), y se utilizó la información obtenida en el desplazamiento de biogás y las proporciones de CH₄ y CO₂ que fueron analizadas por cromatografía de gases.

$$\text{Concentración molar de biogás} = (P \cdot V) / (R \cdot T)$$

Donde:

P: presión atmosférica (Atm.)

V: volumen de biogás (L)

R: constante de los gases

T: temperatura (°K)

8.3.6 Cuantificación de AGV

A las 72 h de fermentación, los biofermentadores se destaparon y se tomó una muestra de 1 mL del sobrenadante, la cual se fijó con 0.25 mL de ácido metafosfórico al 25 %, guardando la relación 4:1, las muestras se centrifugaron por 10 min a 20,817 x g, el sobrenadante fue recuperado y transferido a viales para cromatografía. El análisis fue realizado en un cromatógrafo de gases Clarus 500 de la marca PerkinElmer con un automuestreador y las condiciones del análisis fueron las siguientes: temperatura del horno 115 °C por 0.25 min, 125 °C por 0.5 min y 130 °C por 5.25 min; la temperatura de la columna fue de 250 °C, el gas acarreador usado fue nitrógeno con un flujo de 23.3 mL min⁻¹, se usó un detector de ionización de flama, y una columna capilar Elite FFAP PerkinElmer®. La inyección fue automática con un volumen de 1 µL y los tiempos de retención fueron de 1.3 min para el ácido acético, 1.6 min para el ácido propiónico y 2.15 min para el ácido butírico.

8.3.7 Determinación de variables microbiológicas

Las variables microbiológicas evaluadas fueron población de bacterias totales y celulolíticas a 72 h de fermentación. Para el conteo de bacterias totales se utilizó la técnica de conteo directo, con una cámara Petroff Hausser® en un microscopio de contraste de fases Olympus® a 1000 X. Una muestra de 1 mL se tomó de la parte líquida del biofermentador y se fijó en 0.25 mL de formaldehído al 10 % para su conservación. Las muestras se homogenizaron con un vortex Thermolyne® (Maxi mix II), se hicieron dos diluciones con agua destilada 1:10; se tomó una gota con una pipeta Pasteur, la cual se colocó en la cámara, se observó al microscopio y se procedió al conteo en cinco cuadros de la cámara. La concentración de bacterias ruminales por mL se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Bacterias totales, mL} = \bar{X}(\text{FD}_1) (\text{FD}_2) (2 \times 10^7)$$

Donde: \bar{X} : promedio de bacterias observadas en los cuadros de la cámara Petroff-Hausser®.

FD₁: valor inverso de la dilución usada con formaldehído

FD₂: valor inverso de dilución con agua

2X10⁷: valor obtenido por el volumen de la cámara

Para el conteo de bacterias celulolíticas se utilizó la técnica del número más probable (NMP) por medio de diluciones de 10⁻¹ a 10⁻¹⁰ con tres repeticiones por dilución (Harrigan y McCance, 1979). Se incubaron a 39°C por 10 d, se emplearon tubos de cultivo de 13 x 100 mm con 4.5 mL de medio de cultivo anaerobio (Cobos y Yokoyama, 1995), cambiando la fuente de energía (glucosa, celobiosa y almidón) por una tira de papel Whatman® N° 541 por tubo como fuente de celulosa. El primer tubo de cada serie se inoculó con 0.5 mL de la parte líquida del biofermentador.

8.3.8 Medición de pH

A las 72 h de fermentación se midió el pH usando 5 mL del sobrenadante de los biofermentadores en un potenciómetro ORION® modelo 720A+, calibrado a pH 4 y 7.

8.3.9 Degradación *in vitro* de la MS

A las 72 h de fermentación, la MS no degradada fue filtrada en papel filtro Whatman® (previamente llevado a peso contante) con un sistema de filtrado con bomba de vacío. Después el residuo fue secado en una estufa de aire forzado Riossa® y colocado en un desecador PYREX® para llevar a peso constante los residuos y se pesaron en una balanza analítica.

La degradación *in vitro* de la materia seca se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Materia seca degradada} = (\text{MS inicial} - \text{MS final}) / \text{MS inicial}$$

8.3.10 Análisis y modelo estadístico

Los datos se analizaron con el procedimiento GLM de SAS 9.1. La variable concentración de bacterias totales se transformó logarítmicamente usando la función Log (10) de SAS. Las medias de mínimos cuadrados se estimaron para los niveles de interacción, tipo de pasto por potencial de producción de CH₄, y cuando no hubo efecto

de interacción las medias se compararon con la prueba de Tukey ($P < 0.05$), para los efectos individuales y de tratamiento.

El modelo estadístico fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + A_j + \beta_j + (A\beta)_{ij} + e_{ijk}$$

Dónde:

Y_{ijk} = variable respuesta

μ = media general

A_j = efecto del tipo de pasto (templado o tropical)

β_j = efecto del potencial de producción de CH_4 de los ingredientes (alto o bajo).

$(A\beta)_{ij}$ = efecto de la interacción $A\beta$ (tipo de pasto, efecto de producción de CH_4)

en el nivel i, j

e_{ijk} = error aleatorio

8.4 Resultados

8.4.1 Variables químico fermentativas

El pH de los tratamientos (Cuadro 38) no fue afectado ($P > 0.05$) por la interacción tipo de pasto*potencial de producción de CH_4 , tampoco ($P > 0.05$) por el tipo de pasto (templado o tropical) con que fueron formuladas las dietas, sin embargo, el pH fue más bajo ($P < 0.05$) en las dietas con alto potencial de CH_4 (6.59), comparadas con las de bajo potencial (6.71).

La DIVMS (Cuadro 38) mostró interacción entre el tipo de pasto y el potencial de producción de CH_4 ($P < 0.05$) mostró un efecto positivo con un incremento en el T1, en contraste, en la T4 se observó una disminución del 15 %.

Cuadro 38. Variables químico-fermentativas de cuatro dietas con alto y bajo potencial de producción de CH₄

Tratamiento	pH	DIVMS % MS	Acético	Propiónico	Butírico	Total mM
			mM por 100 mM producidos			
T1	6.58	49.1	59.82	26.73	13.45	79.49
T2	6.74	45.1	63.87	24.37	11.78	73.26
T3	6.60	45.7	61.52	24.32	14.17	74.16
T4	6.69	35.1	62.68	24.78	12.52	72.63
EEM	0.018	1.13	0.74	0.89	0.24	1.48
Valor de P						
Pasto	0.060	0.001	0.73	0.278	0.0076*	0.0575
Potencial	<.0001*	<0.0001	0.0021*	0.3026	<0.0001*	0.0166*
Pasto*potencial	0.0660	0.0075*	0.0658	0.1303	0.9731	0.1289

EEM: Error estándar de la media; DIVMS: Degradación *in vitro* de la materia seca; T1: pasto tropical y potencial de CH₄ alto; T2: pasto tropical y potencial de CH₄ bajo; T3: pasto templado y potencial de CH₄ alto; T4: pasto templado y potencial de CH₄ bajo.

La producción total de AGV y ácido acético (Cuadro 38) se incrementaron (P<0.05) en las dietas con potencial de CH₄ alto, 76.82 mM y 60.66 mM, respectivamente, comparadas con las de potencial bajo, 72.94 y 63.28 mM, respectivamente, la producción de ácido propiónico (25.06), no mostró diferencias (P>0.05) de interacción, efectos individuales, ni de tratamientos, pero el ácido butírico fue superior (P<0.05) en las dietas con pasto templado (13.35 vs 12.61 mM) y también se incrementó (P<0.05) en las dietas de potencial de CH₄ alto.

8.4.2 Variables microbiológicas

La interacción pasto*potencial resultó significativa (P<0.05) para la variable concentración de bacterias totales (Cuadro 39), el efecto positivo del incremento de la población de bacterias totales se observó en el T1 con pasto tropical y con ingredientes de alto potencial de CH₄, 1.39 X 10¹⁰ bacterias por mL, en contraste el T2 redujo la población de bacterias a 9.8X10⁹ mL⁻¹. La dieta con pasto templado incremento su

producción de bacterias con ingredientes de bajo potencial de CH₄. La población de bacterias celulolíticas fue similar (P>0.05) para todos los tratamientos, no fue afectada por la interacción tipo de pasto*potencial de CH₄, ni por los efectos individuales.

Cuadro 39. Concentración de bacterias totales y celulolíticas en cuatro dietas

Tratamiento	Bacterias Totales	Bacterias celulolíticas	Límite inferior	Límite superior
T1	1.39E+10 ^a	1.10E+09	3.00E+08	9.70E+09
T2	9.80E+09 ^{ab}	1.10E+09	3.00E+08	9.70E+09
T3	6.75E+09 ^b	2.80E+09	4.00E+08	4.70E+09
T4	1.00E+10 ^{ab}	2.10E+09	3.50E+08	4.70E+10
EEM	0.07			
Pasto	0.0567			
Potencial	0.9266			
Pasto*potencial	0.0275			

EEM: Error estándar de la media, T1: Dieta con pasto tropical y potencial de producción de CH₄ alto, T2: Dieta con pasto tropical y potencial de CH₄ bajo, T3: Dieta con pasto templado y potencial de CH₄ alto, T4: dieta con pasto templado y potencial de CH₄ bajo.

8.4.3 Concentración molar de biogás, CH₄ y CO₂

En la figura 3 se observa la concentración molar de biogás *in vitro* de las cuatro dietas, en las primeras 24 h se produjo en promedio el 75 % del total de la concentración molar de biogás producido a 72 h, entre 24 y 48 h la producción de biogás disminuyó y de 48 a 72 h la producción de biogás fue mínima y estable.

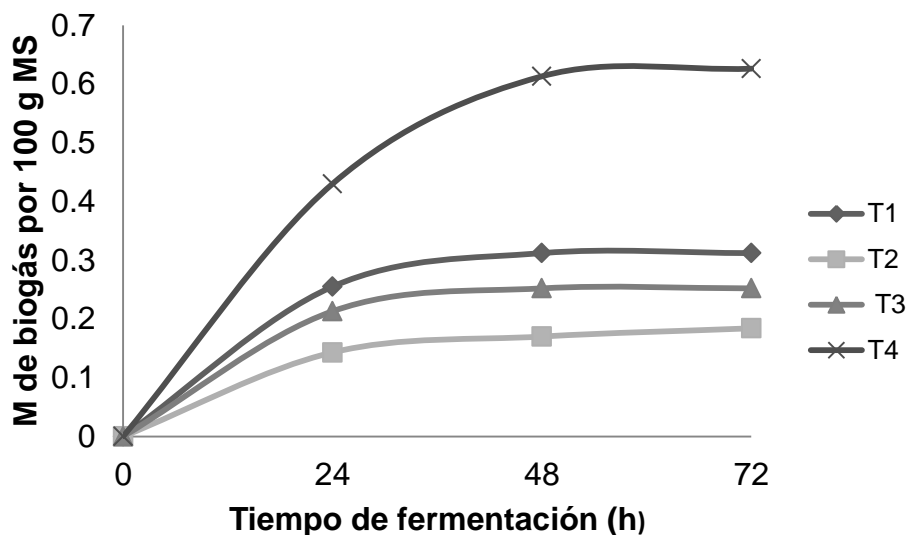


Figura 3. Comportamiento de producción de biogás *in vitro* de cuatro dietas

T1: pasto tropical y potencial de producción de CH₄ alto; T2: pasto tropical y potencial de CH₄ bajo, T3: pasto templado y potencial de CH₄ alto; T4: pasto templado y potencial de CH₄ bajo; M: concentración molar.

La concentración molar de biogás (Cuadro 40) fue estimulada por la interacción pasto*potencial ($P > 0.0001$). La presencia de ingredientes de bajo potencial de CH₄ estimuló la concentración molar de biogás en el T4 que contenía pasto templado, sin embargo, cuando el pasto fue tropical la concentración se incrementó más del triple en el T2 con ingredientes de bajo potencial, a 24, 48 y 72 h de fermentación.

Cuadro 40. Concentración molar de biogás acumulado de cuatro dietas con alto y bajo potencial de producción de CH₄.

Tiempo de fermentación, h	24	48	72
Tratamiento	Biogás producido por 100 g de MS, M		
T1	0.255 ^b	0.312 ^b	0.312 ^b
T2	0.143 ^c	0.170 ^c	0.184 ^c
T3	0.213 ^b	0.252 ^b	0.252 ^b
T4	0.430 ^a	0.613 ^a	0.626 ^a
EEM	0.0130	0.011	0.026
	Valor de P		
Pasto	<0.0001	<0.0001	0.0002
Potencial	0.019	<0.0001	0.0058
Pasto*potencial	<0.0001	<0.0001	<0.0001

T1: pasto tropical y potencial de producción de CH₄ alto; T2: pasto tropical y potencial de CH₄ bajo; T3: pasto templado y potencial de CH₄ alto; T4: pasto templado y potencial de CH₄ bajo; EEM: Error estándar de la media; M: Concentración molar.

El efecto positivo de ($P < 0.0001$) de formular dietas con ingredientes de potencial de CH₄ bajo (Cuadro 41) solo se observó en dietas con pasto tropical (T2), ya que la T4 (con pasto templado) incrementó la concentración molar de CH₄ a 24, 48 y 72 h, aunque disminuyó el CH₄ por 100 M de biogás producido a 24 y 48 h, y el T2 la incrementó ($P < 0.05$). A 72 h no se observó efecto, ni de interacción pasto*potencial, ni de efectos principales, pero el tratamiento T4 redujo en 8.39 % la producción de CH₄ por cada 100 M de biogás producido.

Cuadro 41. Concentración molar de CH₄ en cuatro dietas con alto y bajo potencial de producción de CH₄

Tiempo de fermentación, h	24	48	72
Tratamiento	CH ₄ acumulado por 100 g de MS, M		
T1	0.040	0.061	0.069
T2	0.036	0.053	0.063
T3	0.042	0.059	0.068
T4	0.062	0.099	0.117
EEM	0.003	0.003	0.0042
Valor de P			
Pasto	0.012	0.0006	0.0009
Potencial	0.133	0.0071	0.00045
Pasto*potencial	0.030	0.0004	0.0006
CH ₄ por cada 100 M de biogás producido			
T1	18.28	39.47	22.78
T2	26.17	70.37	34.18
T3	22.71	41.73	27.29
T4	14.97	20.23	19.69
EEM	0.85	1.07	2.04
Valor de P			
Pasto	0.0275	<0.0004	0.0589
Potencial	0.1679	0.0947	0.4429
Pasto*potencial	<0.0001	<0.0001	0.2801

EEM: Error estándar de la media; T1: pasto tropical y potencial de producción de CH₄ alto; T2: pasto tropical y potencial de CH₄ bajo; T3: Dieta con pasto templado y potencial de CH₄ alto; T4: dieta con pasto templado y potencial de CH₄ bajo; M: Concentración molar.

La concentración molar de CO₂ para dietas formuladas con pastos tropicales (Cuadro 42) se incrementó (P<0.0001) en la dieta con ingredientes de alto potencial a 24, 48 y 72 h de fermentación y disminuyó en la dieta con pasto templado y potencial alto (Anexo 1).

Cuadro 42. Concentración molar de CO₂ en cuatro dietas con alto y bajo potencial de producción de CH₄

Tiempo de fermentación, h	24	48	72
Tratamiento	CO ₂ acumulado por 100 g de MS, M.		
T1	0.216	0.2517	0.256
T2	0.107	0.1184	0.122
T3	0.170	0.195	0.198
T4	0.368	0.513	0.534
EEM	0.0110	0.011	0.011
	Valor de P		
Pasto	<0.0001	0.0787	<0.0001
Potencial	0.0210	0.4217	<0.0001
Pasto*potencial	<0.0001	0.0049	<0.0001
	CO ₂ acumulado por cada 100 M de biogás producido		
T1	84.42	80.66	84.89
T2	74.44	68.62	69.00
T3	79.75	76.37	79.63
T4	85.56	83.73	88.39
EEM	0.875	1.07	2.04
	Valor de P		
Pasto	0.0330	<0.0001	0.5287
Potencial	0.1451	0.0336	0.7490
Pasto*potencial	<0.0001	<0.0001	0.2801

EEM: Error estándar de la media; T1: pasto tropical y potencial de producción de CH₄ alto; T2: pasto tropical y potencial de CH₄ bajo; T3: pasto templado y potencial de CH₄ alto; T4: pasto templado y potencial de CH₄ bajo; M: concentración molar.

La concentración molar de CO₂ por 100 M de biogás producido, tuvo efecto de interacción (P<0.0001), la dieta con pasto tropical con potencial de CH₄ alto produjo mayor concentración molar de CO₂; sin embargo, las dietas con pasto templado disminuyeron la cantidad de CO₂ producida a 24 y 48 h de fermentación, y a las 72 h el T4 (Cuadro 43) produjo una cantidad superior de CO₂.

Cuadro 43. Concentración molar de CH₄ y CO₂ por 100 M de biogás producido a 72 h, M.

Tratamiento	CH ₄	CO ₂
T1	22.78 ^b	84.89 ^{ab}
T2	34.18 ^a	69.00 ^c
T3	27.29 ^{ab}	79.63 ^b
T4	19.69 ^c	88.39 ^a

a, b, c Valores con letras diferentes en una columna son diferentes estadísticamente (P<0.05; Tukey); T1: pasto tropical y potencial de producción de CH₄ alto; T2: pasto tropical y potencial de CH₄ bajo; T3: pasto templado y potencial de CH₄ alto; T4: pasto templado y potencial de CH₄ bajo; M: concentración molar.

8.5 Discusión

La reducción de la producción de biogás por el T2, puede ser explicado por la composición de la dieta, con 30 % de leucaena, ingrediente que reduce el biogás y CH₄ porque este forraje contiene metabolitos secundarios como taninos condensados y mimosina que inhiben los microorganismos ruminales, la producción de biogás y CH₄, Tan *et al.* (2011), reportan una disminución en la producción de biogás total en dietas con taninos condensados presentes en la leucaena; así como una disminución en la producción de CH₄ hasta en 47 % al incluir 15 mg por cada 500 mg de MS. Huang *et al.* (2011) también muestran un efecto directo entre la cantidad de taninos condensados de la leucaena y la reducción en la producción de CH₄.

La reducción de CH₄ y biogás tuvo una interacción positiva entre el tipo de pasto y el potencial de CH₄ de la dieta, y se observó una disminución del potencial de CH₄ en

el T2 que contiene pasto bermuda en 15 %, y un incremento en el T1 con pasto King grass; este efecto no se observó en las dietas con pasto templado, lo que sugiere que la gramínea tropical tuviera menor cantidad de materia fermentable. Sánchez *et al.* (2005) reportan bajo contenido de carbohidratos solubles y baja contribución energética a la fermentación ruminal en las gramíneas tropicales, especialmente en estados maduros y en épocas de sequía. Coblenz *et al.* (2013) correlacionaron positivamente la producción de biogás de 60 forrajes con el contenido de carbohidratos solubles en agua y nutrientes totales, y negativamente con el contenido de FDN y hemicelulosa. En contraste, Benchaar *et al.* (2001) determinaron una correlación positiva entre la fermentación carbohidratos no estructurales y la producción de propionato, lo cual disminuye la producción de CH₄ en el rumen. Según Chandramoni *et al.* (2000), la producción de CH₄ es menor con dietas ricas en almidones respecto a dietas ricas en fibra, mientras que Ramin y Huhtanen, (2013), reportan que el tipo de que el tipo de carbohidratos presentes en la dieta no tuvo un efecto importante en esta variable

8.6 Conclusiones

La interacción pasto por potencial de CH₄ fue significativa, por lo que el comportamiento de las dietas fue diferente, el pasto tropical y bajo potencial de CH₄ (T2) redujo la cantidad emitida de gases efecto invernadero, por lo cual la propuesta de elaboración de dietas con ingredientes con alto o bajo potencial de producción de CH₄ solo es posible para dietas que contienen pastos tropicales. En cambio, la dieta con pastos templados (T4) potencializó su producción de biogás, CH₄ y CO₂ y no disminuyó la producción de CH₄. Así, hay otros factores que afectan la producción de CH₄ en dietas a base de pastos templados con ingredientes de potencial de CH₄ bajo como saponinas o taninos que tiene un efecto negativo en la producción del CH₄ entérico.

Literatura citada

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 2005. Official Methods of Analysis. Edition 18. Association of Official Analytical Chemists. Washington, 29 DC, EE.UU. 1928 p.

- Beauchemin, K. A., S. M. McGinn, H. V. Petit. 2007. Methane abatement strategies for cattle: Lipid supplementation of diets. *Canadian Journal of Animal Science*. 87: 431-440.
- Benchaar, C., C. Pomar, J. Chiquette. 2001. Evaluation of dietary strategies to reduce methane production in ruminants: A modeling approach. *Canadian Journal of Animal Science*. 81:563-574.
- Bodas, R., S. Lopez, M. Fernandez, R. García-Gonzalez, A. B. Rodríguez, R. J. Wallace, J. S. Gonzalez. 2008. *In vitro* screening of the potential of numerous plant species as antimethanogenic feed additives for ruminants. *Animal Feed Science and Technology* 145: 245–258.
- Chandramoni, S. B., C. M. Jadhao, C. M. Tiwari, M. Y. Khan. 2000. Energy metabolism with particular reference to methane production in: Muzaffarnagari sheep fed rations in roughage to concentrate ratio. *Animal Feed Science and Technology* 83: 287-300.
- Coblentz, W. K., S. E. Nellis, P. C. Hoffman, M. B. Hall, P. J. Weimer, N. M. Esser, M. G. Bertram. 2013. Unique interrelationships between fiber composition, water-soluble carbohydrates, and *in vitro* gas production for fall-grown forages. *Journal of Dairy Science*. 96: 7195-7209.
- Cobos, M. A., M. T. Yokoyama. 1995. *Clostridium paraputrificum* var *ruminantium*: colonization and degradation of shrimp carapaces *in vitro* observed by scanning electron microscopy. *In: Rumen Ecology Research Planning, Proceedings of Workshop*. Wallace, R. J., and A. Lahlou-Kassi (eds.). Addis Ababa, Ethiopia. Pp: 151-161.
- Durmic, Z., P. Hutton, D. K. Revell, J. Emms, S. Hughes, P. E. Vercoe. 2010. *In vitro* fermentative trails of Australian woody perennial plant species that may be considered as potential sources of feed for grazing ruminants. *Animal Feed Science and Technology*. 160: 98-109.
- Eckard, R. J., C. Grainger, C. A. M. de Klein. 2010. Options for the abatement of methane and nitrous oxide from ruminant production: A review. *Livestock Science*. 130: 47–56.
- Huang, X.D., J. B. Liang, H. Y. Tana, R. Yahyac, Y. W. Hoa. 2011. Effects of Leucaena condensed tannins of differing molecular weights on *in vitro* CH₄ production. *Animal Feed Science and Technology*. 166-167: 373-376.
- Khiaosa-ard, R. and Q. Zebeli. 2014. Cattle's variation in rumen ecology and metabolism and its contributions to feed efficiency. *Livestock Science*. 162: 66-75.
- Knapp, J. R., G. L. Laur, P. A. Vadas, W. P. Weiss, J. M. Tricarico. 2014. Invited review: Enteric methane in dairy cattle production: Quantifying the opportunities and impact of reducing emissions. *Journal of Dairy Science*. 97:3231-3261.

- Lee, H., S. C. Lee, J. D. Kim, Y. G. Oh, B. K. Kim, C. W. Kim, K. J. Kim. 2003. Methane production potential of feed ingredients as measured by *in vitro* gas test. *Asian-Australian Journal of Animal Science*. 16 (8): 1143-1150.
- Meng-meng, L., Z. Gui-guo, S. Xue-zhao, D. Shu-ting, S. O. Hoskin. 2014. Studies on methane emissions from pastoral farming in New Zealand. *Journal of Integrative Agriculture*. 13(2): 365-377.
- National Research Council (NRC). 2007. *Nutrient Requirements of Small Ruminants*. The National Academies Press. Washington, DC.
- Posada, S. L., R. R. Noguera 2005. Técnica *in vitro* de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. *Livestock Research for Rural Development*. Vol. 17, Art. # 36. Disponible en: <http://www.lrrd.org/lrrd17/4/posa17036.htm>. Consultado: 30 de junio de 2014.
- Ramin, M. and P. Huhtanen. 2013. Development of equations for predicting methane emissions from ruminants. *Journal of Dairy Science*. 96:2476–2493.
- Sánchez D., L. C. Arreaza., B. Abadía. 2005. Estudio de la cinética de degradación *in vitro* de cuatro forrajes tropicales y una leguminosa de clima templado. *Revista Corpoica* (6)1:58-68.
- Tan H. Y., C. C. Sieo, N. Abdullaha, J. B. Lianga, X. D. Huanga, Y. W. Hoa. 2011. Effects of condensed tannins from *Leucaena* on methane production, rumen fermentation and populations of methanogens and protozoa *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology*. 169: 185-193.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, B. A. Lewis.1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*. 74:3583-3579.

9. CONCLUSIONES GENERALES

La producción de CH₄ aumenta debido a un aumento en la producción de biogás de los ingredientes, pero la proporción metano-dióxido de carbono es similar entre ingredientes clasificados con alto o bajo potencial de producción de metano.

Las variables fermentativas fueron afectadas por el tipo de ingredientes aunque fueran del mismo grupo, mientras que las variables microbiológicas fueron afectadas por el tipo de leguminosa, granos y pastas de oleaginosas, pero no por pastos y esquilmos agrícolas.

La propuesta de elaboración de dietas con ingredientes con bajo potencial de CH₄, solo se observó si las dietas contienen también un pasto tropical.

La metodología de producción de biogás *in vitro* demostró ser útil, como parte de las estrategias alimenticias, para reducir las emisiones de gases efecto invernadero generados por la fermentación entérica de los rumiantes.

ANEXO 1

Comportamiento de la producción de biogás, CH₄ y CO₂ de cuatro dietas

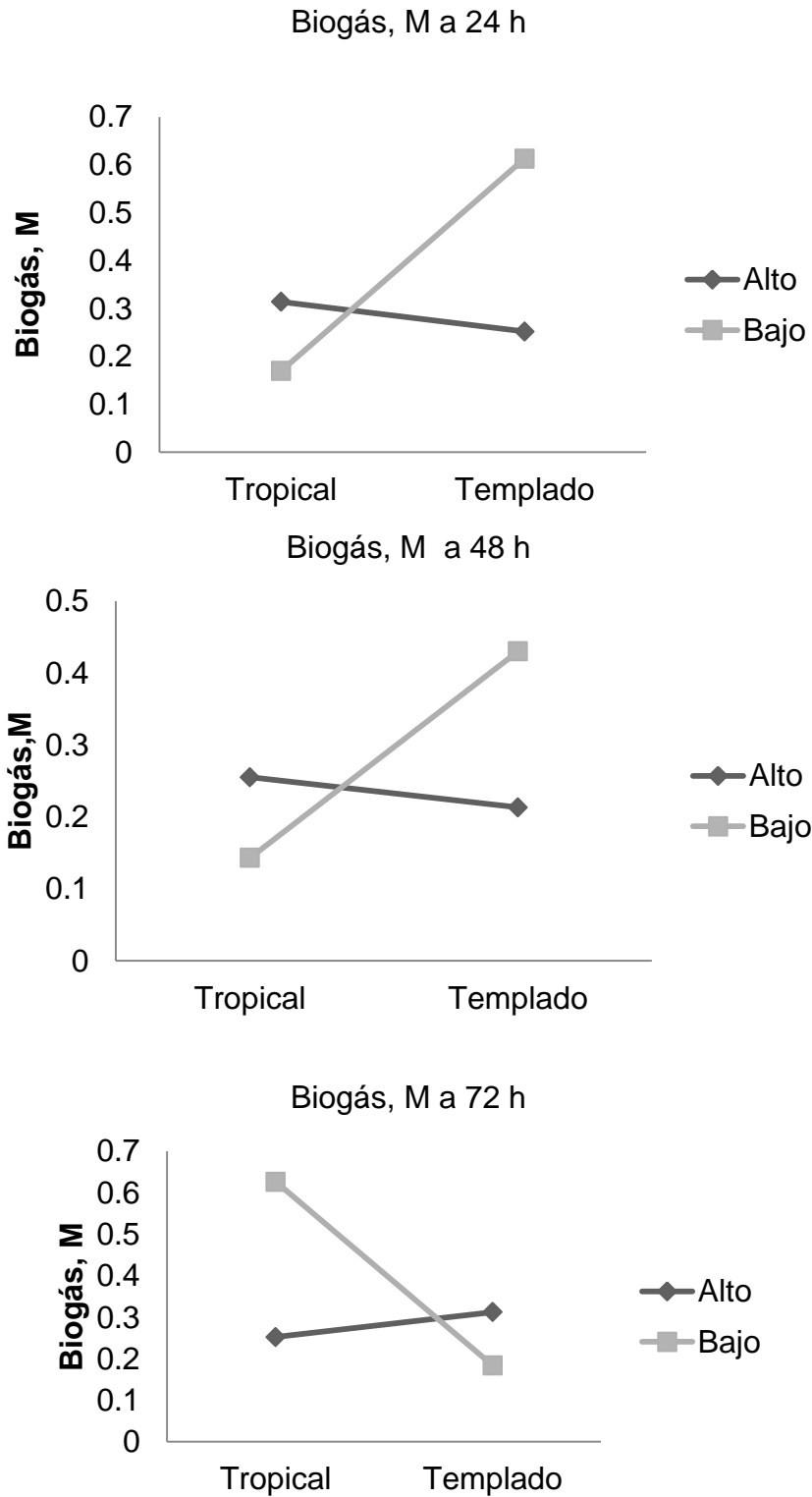


Figura 4. Biogás *in vitro* a 24, 48 y 72 h de cuatro dietas

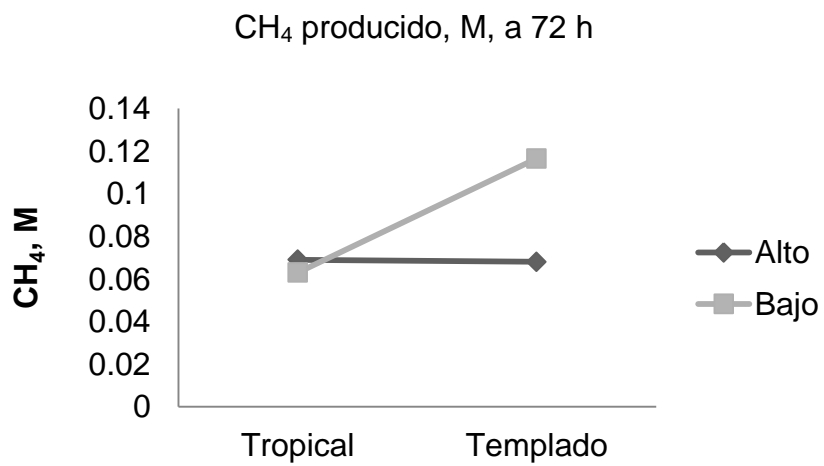
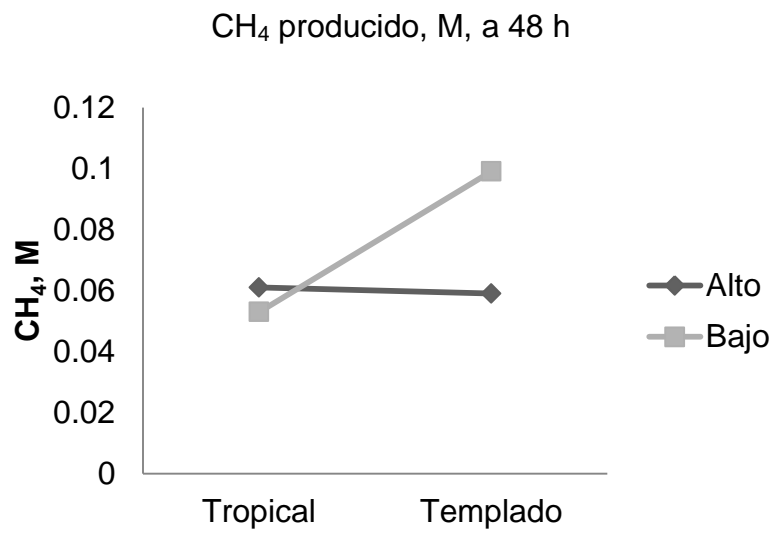
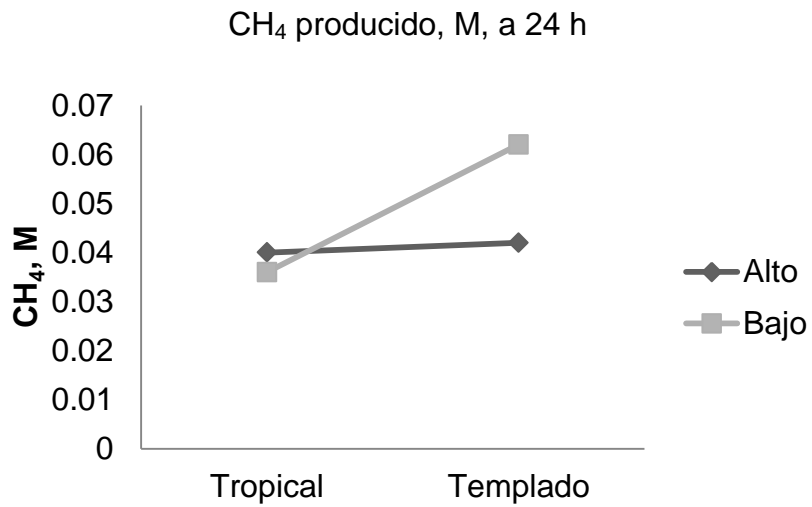


Figura 5 CH₄ *in vitro* a 24, 48 y 72 h de cuatro dietas

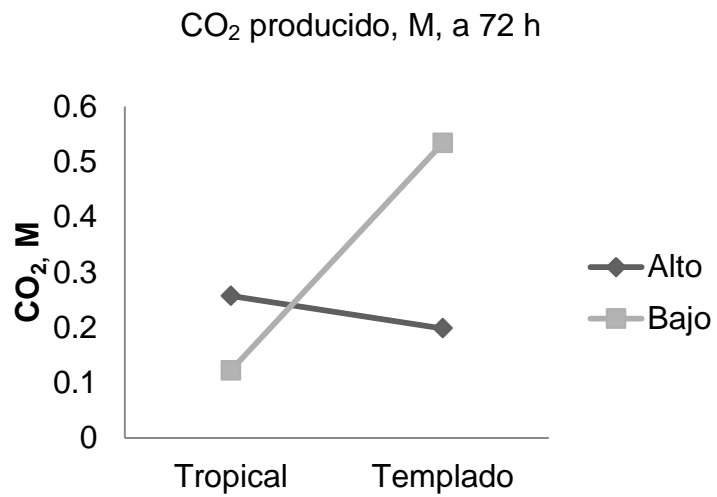
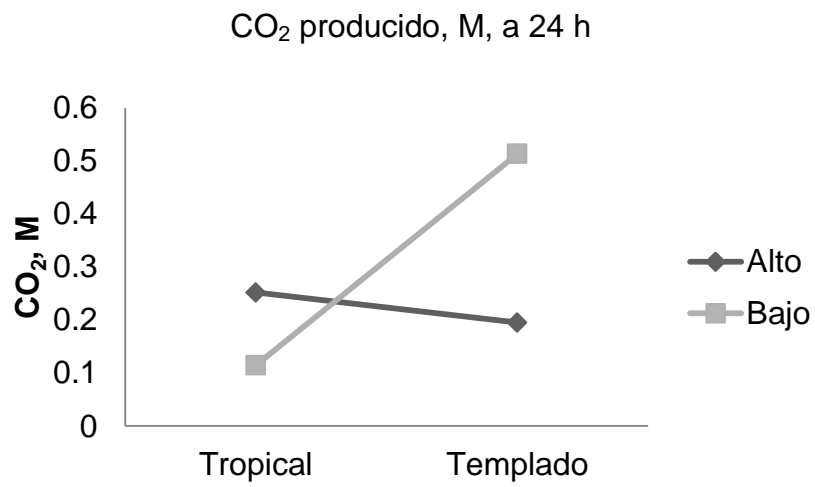
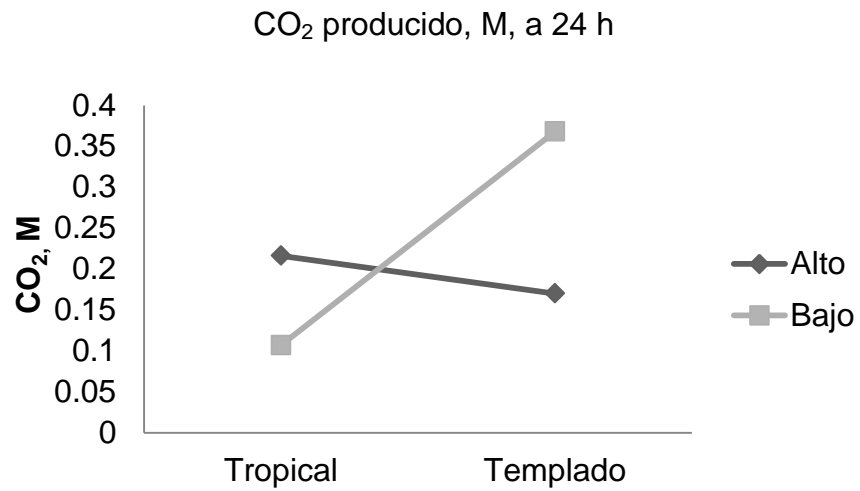


Figura 6. CO₂ *in vitro* a 24, 48 y 72 h producido por cuatro dietas