



**COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

**CAMPUS MONTECILLO  
POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
GANADERÍA**

**USO DE LEVADURAS Y FUMARATO PARA DISMINUIR LA METANOGENESIS EN  
LA FERMENTACIÓN DE ALFALFA**

**JOSÉ LUIS BÁEZ PÉREZ**

**T E S I S**

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

**2010**

La presente tesis, titulada: **Uso de levaduras y fumarato para disminuir la metanogénesis en la fermentación de alfalfa**, realizada por el alumno: **José Luis Báez Pérez**, bajo la dirección del consejo particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**DOCTOR EN CIENCIAS**  
**RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD**  
**GANADERÍA**

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO:



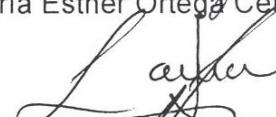
Dr. Mario Antonio Cobos Peralta

ASESOR:



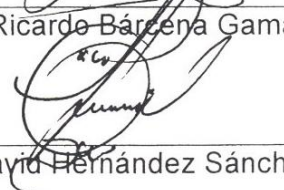
Dra. María Esther Ortega Cerrilla

ASESOR :



Dr. Ricardo Bárcena Gama

ASESOR:



Dr. David Hernández Sánchez

ASESOR:



Dr. Sergio Segundo González Muñoz

Montecillo, Texcoco, Estado de México, abril de 2010.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Colegio de Postgraduados, por el apoyo económico y la oportunidad de realizar mis estudios de doctorado.

A la línea prioritaria de investigación No. 8 **“Impacto y Mitigación del Cambio Climático Global”** del Colegio de Postgraduados, por el apoyo económico recibido para la realización de esta investigación.

Al Dr. Mario A. Cobos Peralta, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por guiarme durante la realización de la presente investigación, y por la oportunidad de realizar mis estudios de doctorado bajo su dirección.

Al Dr. Sergio S. González Muñoz, por su apoyo y consejos para mejorar la escritura y redacción de la tesis.

A la Dra. María Esther Ortega Cerrilla, por sus consejos para mejorar la redacción y presentación de la tesis.

Al Dr. Ricardo Bárcena Gamma, por sus valiosas aportaciones para la escritura de la tesis.

Al Dr. David Hernández Sánchez por sus observaciones y consejos para mejorar la presentación de la tesis.

A la Dra. María Magdalena Crosby Galvan, al Sr. Andrés Lee, y al Dr. Miguel Ángel Mata Espinosa, por su apoyo en el laboratorio durante la realización de la investigación, y por sus observaciones y consejos para realizar el trabajo de laboratorio.

Al Sr. Agustín Hernández Romero, por su apoyo para el montaje e implementación de las diferentes técnicas microbiológicas usadas en la presente investigación.

A todos los profesores quienes de una u otra forma intervinieron en mi formación académica y profesional.

A mis amigos; Irma Fabiola, Jaime Azael, Remedios, Anastasio, Laura, José Luis Cordero, Héctor Lee, Pedro Abel, José Alfredo, Enrique Guerra, Marcos Pérez Sato, Alejandro Ley y Germán Buendía por su amistad y apoyo durante mi estancia en el Colegio de Postgraduados.

Al Dr. Eduardo Espitia Rangel, al Dr. Josué Gámez, al Dr. Fernando Carrillo Anzures, y a todos los amigos y compañeros del Campo Experimental Valle de México del INIFAP, por su paciencia y apoyo para la realización de este documento.

## DEDICATORIA

A mis padres Pedro Báez Velázquez e Isabel Pérez Ramírez, que a lo largo de mi vida me han apoyado en forma incondicional y sin medida.

A María de la Luz y nuestros hijos María Luisa y Uriel, que me han acompañado y aguantado todo durante estos años.

A mis Hermanos Aurelio, Irma, Germán, Isabel, Alfonso, Natalia, Pedro y Mario por brindarme su apoyo incondicional.

A todos mis sobrinos, porque ellos son la nueva generación que nos impulsa a seguir adelante y trabajar para forjar un mejor futuro para todos.

A la Familia López García, por brindarme su amistad y apoyo.

## CONTENIDO

	Página
<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>1. INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	3
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	6
<b>3. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	8
3.1. La degradación de materia orgánica en condiciones de anaerobiosis.....	8
3.2. La fermentación de los alimentos en el rumen.....	9
3.3. Estequiometría de la producción AGV, CH <sub>4</sub> y CO <sub>2</sub> en el rumen.....	11
3.4. Las bacterias metanogénicas del rumen.....	14
3.5. La asociación entre bacterias metanogénicas y protozoarios en el rumen...	15
3.6. La metanogénesis.....	16
3.7. Disminución de la producción de CH <sub>4</sub> en los rumiantes.....	20
3.8. Los ionóforos.....	21
3.9. El fumarato de sodio.....	22
3.10. El uso de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	24
3.11. Métodos para medir producción de biogás, CO <sub>2</sub> y CH <sub>4</sub> .en el rumen.....	26
3.12. Leyes de los gases que se aplican para medir producción de biogás.....	27
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	30
4.1. Objetivo general.....	30
4.2. Objetivos particulares.....	30
<b>5. HIPÓTESIS</b> .....	31

<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	32
6.1 Experimento I.....	32
6.1.1 Medición <i>in vitro</i> de biogás, CO <sub>2</sub> y CH <sub>4</sub> en biodigestores acoplados a trampas de gas.....	32
6.1.2. Biodigestores y trampas de gas.....	33
6.1.3. Inóculo.....	35
6.1.4. Acoplamiento de biodigestores y trampas de gas.....	35
6.1.5. Variables evaluadas.....	36
6.1.6. Diseño experimental y análisis estadístico.....	37
6.2. Experimento II.....	39
6.2.1. Uso de levaduras para disminuir la metanogénesis en la fermentación <i>in vitro</i> de alfalfa.....	39
6.2.2. Tratamientos.....	39
6.2.3. Dosis usada el experimento.....	39
6.2.4. Biodigestores y trampas de gas.....	40
6.2.5. Inóculo usado en el experimento.....	41
6.2.6. Variables evaluadas.....	41
6.2.7. Diseño experimental y análisis estadístico.....	43
6.3. Experimento III.....	44
6.3.1. Uso de fumarato para disminuir la metanogénesis en la fermentación <i>in vitro</i> de alfalfa.....	44
6.3.2. Tratamientos.....	45
6.3.3. Dosis usada.....	45

6.3.4. Biodigestores y trampas de gas.....	46
6.3.5. Inóculo usado en el experimento.....	46
6.3.6. Variables evaluadas.....	47
6.3.7. Diseño experimental.....	48
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>50</b>
7.1. Experimento I.....	50
7.1.1. Concentración de bacterias totales y pH en las combinaciones.....	50
7.1.2. Desplazamiento en las trampas y composición del biogás.....	51
7.2 Experimento II.....	54
7.2.1 Desplazamiento en las trampas de gas de los tratamientos.....	54
7.2.2. Producción de CH <sub>4</sub> , pH y concentración de bacterias en los tratamientos.....	55
7.2.3. Concentración de AGV y N-NH <sub>3</sub> en los tratamientos.....	57
7.3. Experimento III.....	59
7.3.1. Desplazamiento en trampas de solución salina ácida del primer bloque.....	59
7.3.2. Desplazamiento en las trampas de NaOH del segundo bloque.....	60
7.3.3. Producción de CO <sub>2</sub> y CH <sub>4</sub> en los tratamientos.....	61
7.3.4. Concentración de bacterias, pH, N-NH <sub>3</sub> y degradación de MS en los tratamientos.....	63
7.3.5. Concentración de AGV en los tratamientos.....	64
<b>8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>68</b>
<b>9. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>70</b>



## ÍNDICE DE CUADROS

	Páginas
Cuadro 1. Equivalentes de oxidación de los productos de fermentación de la glucosa.....	12
Cuadro 2. Energía de activación de la metanogénesis con varios sustratos como fuente de carbono.....	17
Cuadro 3. Enzimas y cofactores que intervienen en la metanogénesis.....	18
Cuadro 4. Composición del medio de cultivo GCAFR.....	33
Cuadro 5. Dosis de Yea Sacc, Procreatin, y Diamon VXP usadas en los tratamientos del experimento I.....	40
Cuadro 6. Concentración de bacterias y pH en las combinaciones del experimento I.....	50
Cuadro 7. Desplazamiento en las trampas y composición del biogás del experimento I.....	52
Cuadro 8. Desplazamiento (mL) en trampas de NaOH del experimento II.....	54
Cuadro 9. Producción de CH <sub>4</sub> , pH y concentración de bacterias en el experimento II.....	55
Cuadro 10. Concentración de AGV y N-NH <sub>3</sub> en el experimento II.....	57
Cuadro 11. Desplazamiento (mL) en las trampas de solución salina del experimento III.....	59
Cuadro 12. Desplazamiento (mL) en trampas de NaOH del experimento III...	60
Cuadro 13. Desplazamiento en trampas de gas y producción de CO <sub>2</sub> y CH <sub>4</sub>	

	en el experimento III.....	62
Cuadro 14.	Concentración de bacterias, pH y N-NH <sub>3</sub> y degradación de MS en el experimento III.....	63
Cuadro 15.	Concentración de AGV en los tratamientos del experimento III.....	65

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1. Procesos microbiológicos anaeróbicos de los componentes de la materia orgánica: (A) hidrólisis y proceso fermentativo, (B) proceso de acetogénesis y (C) proceso de metanogénesis (adaptado de Marchain, 1992).....	9
Figura 2. Sustratos y metabolitos que intervienen en la fermentación de los alimentos en el rumen (adaptado de Shimada, 2009).....	10
Figura 3. Ruta de la metanogénesis (Thauer, 1998; Shima <i>et al.</i> , 2002).....	19
Figura 4. Metabolismo del fumarato en el rumen (Ungerfeld <i>et al.</i> , 2007)...	23
Figura 5. Diagrama de un biorreactor acoplado a trampa de gas.....	36

# USO DE LEVADURAS Y FUMARATO PARA DISMINUIR LA METANOGENESIS EN LA FERMENTACIÓN DE ALFALFA

José Luis Báez Pérez, Dr.

Colegio de Postgraduados, 2010

## RESUMEN

Se realizaron tres experimentos en biorreactores acoplados a trampas de gas para evaluar el efecto de *Saccharomyces cerevisiae* y fumarato de sodio en la fermentación *in vitro* de alfalfa. En el primero se evaluó la fermentación de alfalfa en medio de cultivo glucosa, celobiosa, almidón y fluido ruminal (GCAFR) usando trampas de gas con agua, solución salina ácida y solución de NaOH. Se midió producción de biogás, CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, pH y bacterias totales (BT). El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo factorial 2 x 3, y tres repeticiones por tratamiento. En el segundo experimento se evaluó el efecto de Yea sacc®, Procreatin 7® y Diamond V XP® en la fermentación *in vitro* de alfalfa. Se midió producción de CH<sub>4</sub>, ácidos grasos volátiles (AGV), nitrógeno amoniacal (N-NH<sub>3</sub>), pH y BT. El diseño experimental fue completamente al azar con nueve repeticiones por tratamiento. En el tercer experimento se evaluó el efecto del fumarato de sodio en la fermentación *in vitro* de alfalfa. Se midió producción de biogás, CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, pH, AGV, N-NH<sub>3</sub>, BT y degradación de materia seca (MS). El diseño experimental fue bloques al azar generalizado con tres repeticiones por tratamiento. El análisis de los resultados del primer experimento mostró que la producción de biogás se puede medir en trampas de solución salina ácida, el CH<sub>4</sub> en trampas de NaOH y no es conveniente usar trampas de agua por la solubilidad del CO<sub>2</sub> de hasta 35.95 %. En el segundo experimento no hubo diferencias ( $P > 0.05$ ) en las variables evaluadas y no se recomienda el uso de levaduras para disminuir la metanogénesis. Finalmente, en el tercer experimento disminuyó ( $P \leq 0.05$ ) la producción de CH<sub>4</sub>, aumento ( $P \leq 0.05$ ) la degradación de MS, aumentó ( $P \leq 0.05$ ) la concentración molar de acético y propiónico, disminuyó ( $P \leq 0.05$ ) la relación acético/propiónico y no hubo diferencias ( $P > 0.05$ ) en pH, concentración de BT y N-NH<sub>3</sub>, por lo cual se concluye que el fumarato de sodio puede disminuir la metanogénesis en los rumiantes alimentados con alfalfa.

**Palabras clave.** Fermentación ruminal, biogás, CH<sub>4</sub>, *Saccharomyces cerevisiae*, fumarato de sodio.

**USE OF YEAST AND FUMARATE TO REDUCE METHANOGENESIS IN  
FERMENTATION OF ALFALFA**

**José Luis Báez Pérez, Ph. D.  
Colegio de Postgraduados, 2010**

**ABSTRACT**

Three experiments were conducted in bioreactors coupled to gas traps to evaluate effect of *Saccharomyces cerevisiae* and sodium fumarate on *in vitro* fermentation of alfalfa. In first experiment the fermentation of alfalfa in the culture medium glucose, cellobiose, starch and rumen fluid (GCAFR) using gas traps with water, saline acid solution and NaOH solution was evaluated. The biogas production, CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, pH and total bacteria (TB) were measured. The experimental design was completely random with factorial arrangement 2 x 3 and three replicates for treatment. In the second experiment the effect of add Yea sacc®, Procreatin 7® and Diamond VXP® on *in vitro* fermentation of alfalfa were evaluated. CH<sub>4</sub> production, volatile fatty acids (VFA), ammonia nitrogen (N-NH<sub>3</sub>), pH and TB were measured. The experimental design was completely random with nine replicates for treatment. In the third experiment it was evaluated the effect of sodium fumarate on *in vitro* fermentation of alfalfa. The variables measured were, biogas production CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, pH, VFA, N-NH<sub>3</sub>, TB and degradation of dry matter (DM). The experimental design was generalized randomized block with three replicates for treatment. The results obtained in the first experiment showed that biogas production can be measured in acid saline traps, CH<sub>4</sub> production in NaOH traps, and is not suitable the use of water traps because the solubility of CO<sub>2</sub> in water up to 35.95 %. In second experiment there were not differences ( $P>0.05$ ) in the variables evaluated and is not recommended the use of yeast to reduce methanogenesis. Finally, in the third experiment decreased ( $P\leq 0.05$ ) CH<sub>4</sub> production, increased ( $P\leq 0.05$ ) degradation of DM, increased ( $P\leq 0.05$ ) molar concentration of acetic and propionic acid, decreased ( $P\leq 0.05$ ) acetic:propionic rate, and there were not differences ( $P>0.05$ ) in pH, BT and N-NH<sub>3</sub>. It is concluded that sodium fumarate has potential to reduce methanogenesis in ruminants fed alfalfa.

**Keywords:** Rumen fermentation, biogas, CH<sub>4</sub>, *Saccaromyces cerevisiae*, sodium fumarate.

## 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

En el protocolo de Kyoto 141 países se comprometieron a disminuir la emisión de gases efecto invernadero (GEI) hasta en 5 % de 2008 a 2012 tomado como base las emisiones registradas en 1990 (artículo 2, inciso 1.a.iii; Protocolo de Kyoto, 1997). Los GEI considerados en dicho protocolo son: dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), metano ( $\text{CH}_4$ ), óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ), hidrofluorocarbonos (HFC), perfluorocarbonos (PFC) y hexafluoruro de azufre ( $\text{SF}_6$ ). México a pesar de estar suscrito a dicho protocolo no está obligado a reducir sus emisiones de GEI, pero tiene el compromiso moral y político de promover medidas que limiten o reduzcan su producción.

El  $\text{CH}_4$  es un gas que daña la capa de ozono y retiene la radiación infrarroja, lo cual potencializa el calentamiento del planeta (Raynaud *et al.*, 1988). Las emisiones de  $\text{CH}_4$  al ambiente pueden ser de origen fósil o antropogénico, y dentro de este último destacan los rumiantes como parte de los principales contribuyentes (IPCC, 2006; Smith *et al.*, 2008). En el rumen el  $\text{CH}_4$  es un producto final de la fermentación de los alimentos y representa pérdidas de hasta 15 % de la energía consumida que no es aprovechada por los rumiantes (Tamminga, 1996; DeRamus *et al.*, 2003).

La metanogénesis en los rumiantes contribuye a mantener constante el pH del rumen (Lana *et al.*, 1998; Rusell, 1998). Las bacterias metanogénicas utilizan el hidrógeno molecular del rumen ( $\text{H}_2$ ) para reducir  $\text{CO}_2$ , y sintetizar ATP y  $\text{CH}_4$  como productos finales de dicho proceso (Rusell y Richlik, 2001). El  $\text{CH}_4$  en el rumen no altera las características fisicoquímicas del fluido y al acumularse es expulsado al ambiente mediante el eructo (Ungerfeld *et al.*, 2007).

Los métodos para disminuir la metanogénesis en los rumiantes deben considerar la utilización de compuestos químicos que garanticen el bienestar animal, y la inocuidad de los productos destinados al consumo humano. Una alternativa, para disminuir la producción de CH<sub>4</sub> en el rumen, es el uso de aditivos que disminuyen la disponibilidad de H<sub>2</sub> para la metanogénesis, aumentan el aprovechamiento de la energía de los alimentos por los rumiantes, y favorecen el desarrollo de la población de microorganismos fermentadores que habitan el rumen (Schingoether *et al.*, 2004; Fonty *et al.*, 2007).

Un problema frecuente, para evaluar la producción de CH<sub>4</sub> en los rumiantes, es la disponibilidad de técnicas que permitan medir la cantidad de CH<sub>4</sub> producido en el rumen: las técnicas *in vivo* requieren equipos sofisticados, instalaciones especiales o animales entrenados (DeRamus *et al.*, 2003), mientras que las técnicas *in vitro*, que simulan la fermentación anaeróbica, requieren biodigestores en lugar de animales vivos.

Existen varias técnicas *in vitro* donde se utilizan biodigestores para medir la producción de biogás, pero su composición se calcula por medio de modelos matemáticos que consideran la medición continua del incremento interno de presión en los biodigestores (Menke *et al.*, 1979; Pell y Shofield, 1993). Estas técnicas se usan comúnmente para medir la digestibilidad de sustratos, y tienen como desventaja que al medir producción de biogás, el incremento en la presión interna de los biorreactores altera la solubilidad de los gases y genera evaluaciones erróneas de la cantidad y composición del biogás producido. Una alternativa para corregir este problema es usar

trampas para captura de gas, y medir el desplazamiento de la solución interna de las trampas mediante válvulas de alivio y probetas graduadas (Jawed y Tare, 1999).

Por lo anterior el objetivo del presente estudio fue evaluar la producción de biogás  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$ , mediante biorreactores acoplados a trampas de gas al adicionar aditivos para disminuir la metanogénesis en la fermentación *in vitro* de un forraje.



## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El CH<sub>4</sub> y el CO<sub>2</sub> son gases que afectan el ambiente porque contribuyen al calentamiento global alterando el clima del planeta. Estos gases interactúan con las ondas de energía infrarroja que ingresan a la atmósfera, lo cual genera reacciones de oxidación con radicales hidroxilo (OH) que dañan la capa de ozono del planeta (Crutzen 1991; Johnson y Johnson, 1995; Moss *et al.*, 2000).

A pesar que en la atmósfera, el CO<sub>2</sub> es más abundante que el CH<sub>4</sub> y contribuye en mayor medida al calentamiento global, el CH<sub>4</sub> tiene 21 a 30 veces más efecto invernadero que el CO<sub>2</sub>, y puede permanecer en la atmósfera hasta 15 años (Moss *et al.*, 2000). La medición de CH<sub>4</sub> en el hielo de los casquetes polares muestra que su concentración en la atmósfera aumentó de 750 a 1,800 ppb con incrementos anuales de más de 500 millones de t (Johnson y Johnson, 1995; Moss *et al.*, 2000; Demeyer y Fievez, 2000; Schils *et al.*, 2007), de las cuales los rumiantes contribuyen con aproximadamente 70 millones de tg (Johnson y Johnson, 1995; Moss *et al.*, 2000; Ellis *et al.*, 2007).

En los rumiantes el CH<sub>4</sub> producido es eructado al ambiente, lo cual inicia en la cuarta semana de vida sólo después que el alimento sólido es retenido en el retículo-rumen ((Watson *et al.*, 1992; Kinsman *et al.*, 1995; Weimer, 1998; Lana *et al.*, 1998). Se calcula que anualmente una vaca adulta puede producir de 60 a 130 kg de CH<sub>4</sub>, lo que representa de 2 a 18 % de la energía total consumida por el rumiante (Johnson y Johnson, 1995; McGinn *et al.*, 2006, Fonty *et al.*, 2007).

Algunos factores que regulan la producción de CH<sub>4</sub> en los rumiantes son: el tipo alimento consumido y su contenido de carbohidratos disponibles para los microorganismos del rumen (Moss y Givens, 2002), la interacción entre los rumiantes y los microorganismos, el balance entre la tasa de fermentación de los carbohidratos y la tasa de pasaje, la cantidad de H<sub>2</sub> y formato disponible para la metanogénesis, y la producción molar de ácidos grasos volátiles de cadena corta (AGV) que se generan de la fermentación ruminal del alimento (Tamminga, 1996; Lana *et al*, 1998).

En el rumen la relación entre el ácido acético y propiónico varía de 0.9 a 4.0 (Johnson y Johnson 1995; Van Kessel y Rusell 1996), pero si sólo se produjera ácido acético y no se produjera ácido propiónico, la producción de CH<sub>4</sub> en el rumen aumentaría hasta 33 %. Por otra parte, si aumentara la concentración molar de ácido propiónico y decreciera la relación acético: propiónico hasta 0.5, la producción de CH<sub>4</sub> en el rumen puede disminuir al mínimo (Christophersen *et al.*, 2007).

Una forma de regular la producción de CH<sub>4</sub> en los rumiantes es amentar la producción molar de ácido propiónico sin incrementar la producción de ácido acético. Esto limita la producción de H<sub>2</sub> y su disponibilidad para la metanogénesis (Asanuma *et al.*, 1999). Entre los métodos que se han propuesto para aumentar la producción de ácido propiónico está el uso de ionóforos (Rusell y Strobel, 1989), levaduras más su medio de cultivo (Wallace, 1994), y compuestos aceptores de electrones como el fumarato de sodio (Carro y Ranilla, 2003). Sin embargo, los estudios realizados no son concluyentes y se requiere continuar la evaluación de estos compuestos para determinar su efectividad en los rumiantes.

### 3. REVISIÓN DE LITERATURA

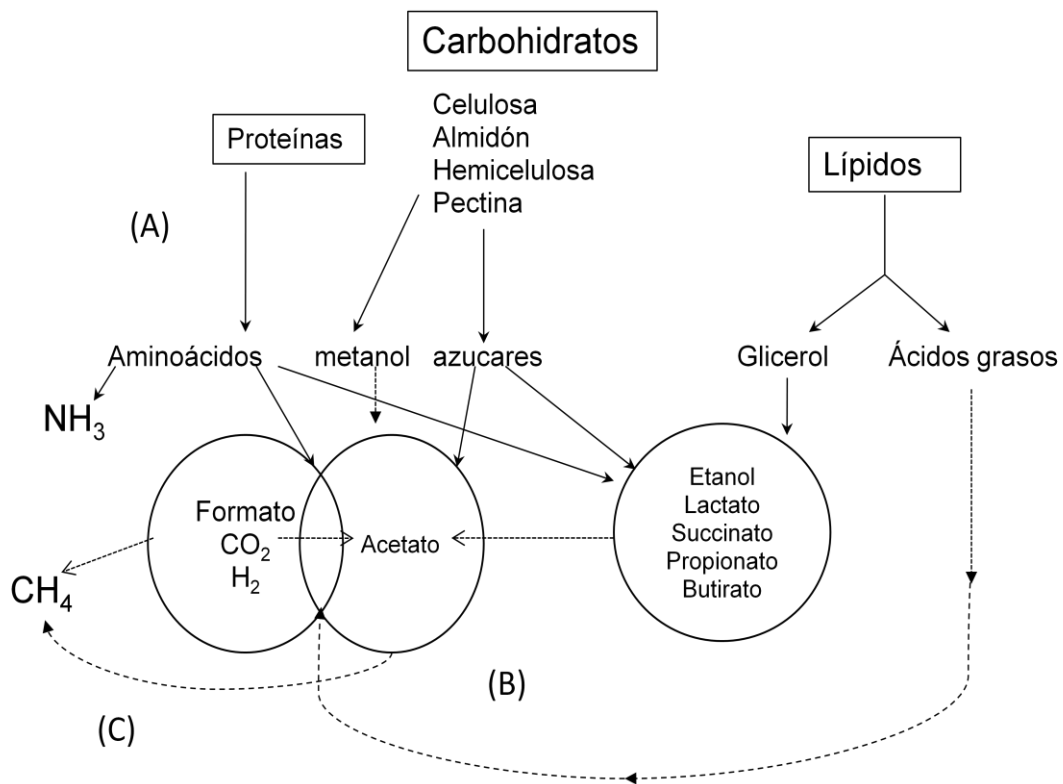
#### 3.1. La degradación de materia orgánica en condiciones de anaerobiosis

La degradación de la materia orgánica en condiciones anaeróbicas se realiza por microorganismos que han existido en la naturaleza desde hace 3400 millones de años, y que habitan en ambientes anóxicos como el sedimento del fondo de ríos y lagos, zonas pantanosas, cultivos inundados y el tubo digestivo de rumiantes e insectos (Miller *et al.*, 1986; Lin *et al.*, 1997; Nafikov y Beits, 2007). Ésta consiste en tres procesos microbiológicos (Figura 1), en donde la materia orgánica compleja es metabolizada por microorganismos anaeróbicos y el resultado es una mezcla de gases llamada biogás, que se compone principalmente de CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> (Angelidaki *et al.*, 1998).

En el primer proceso llamado hidrólisis de la materia orgánica; los microorganismos actúan sobre las moléculas orgánicas depolimerizándolas enzimáticamente hasta sus correspondientes monómeros o fragmentos más sencillos. Así los lípidos son degradados por lipasas hasta ácidos grasos de cadena larga y glicerol, las proteínas son hidrolizadas por proteasas en péptidos y aminoácidos, y los polisacáridos son hidrolizados hasta monosacáridos. Posteriormente los compuestos solubles obtenidos son metabolizados por los microorganismos en AGV (principalmente acético, propiónico y butírico) alcoholes, NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>.

En la segunda etapa llamada acetogénica (aunque no se realiza en los rumiantes es un proceso común en los ambientes anaeróbicos); los ácidos propiónico y butírico son transformados por las bacterias acetogénicas en ácido acético, H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>.

Finalmente, en la tercera etapa (metanogénesis); las bacterias metanogénicas transforman el ácido acético,  $H_2$  y  $CO_2$  en  $CH_4$  (Weber *et al.*, 1984). Considerando el tipo de sustrato que consumen, las bacterias pueden ser de dos tipos; bacterias metanogénicas acetoclásticas o hidrogenotróficas. Las primeras degradan el ácido acético a  $CH_4$  y  $CO_2$  y se encuentran distribuidas en la mayoría de los ambientes anóxicos de la tierra, y las segundas son bacterias que reducen el  $CO_2$  con  $H_2$  a  $CH_4$  y  $H_2O$  y se encuentran principalmente en el tubo digestivo de los rumiantes.



**Figura 1.** Procesos microbiológicos anaeróbicos de los componentes de la materia orgánica: (A) hidrólisis y proceso fermentativo, (B) proceso de acetogénesis y (C) proceso de metanogénesis (adaptado de Marchain, 1992).

### 3.2. La fermentación de los alimentos en el rumen

En el rumen los microorganismos utilizan enzimas extracelulares para hidrolizar los complejos orgánicos y fermentar sus componentes (azúcares, aminoácidos, glicerol, ácidos grasos y proteínas) (Figura 2). Los productos finales de dicho proceso son AGV, etanol, lactato,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{CO}_2$  y  $\text{CH}_4$  (Hegarty, 1999). El biogás que se produce en el rumen es eructado al ambiente (Barker, 1999). Su composición es una mezcla de  $\text{CO}_2$  y  $\text{CH}_4$  (Eun *et al.*, 2004; Schils *et al.*, 2007), la cual varía en función del consumo de alimento, el tipo de forrajes en la ración, el contenido de carbohidratos de rápida fermentación y la concentración molar de AGV (Lana *et al.*, 1998; Rusell, 1998).

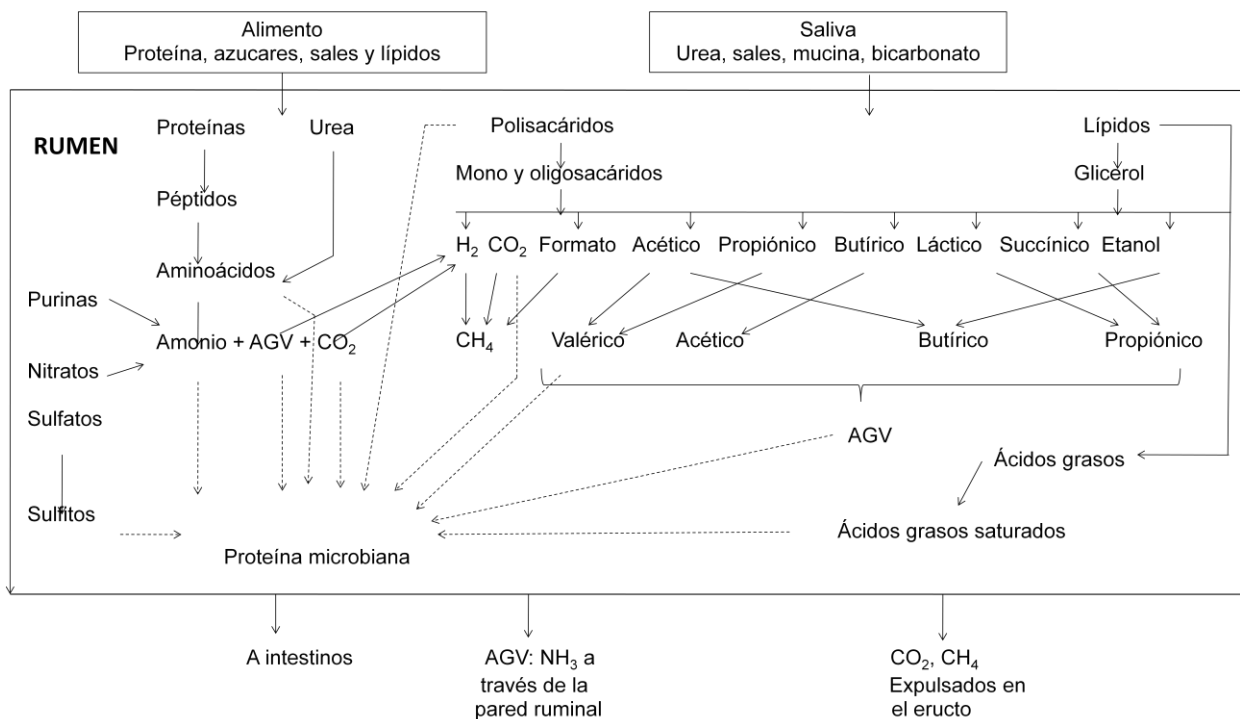
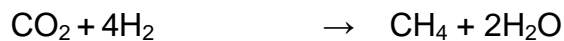
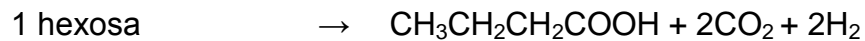
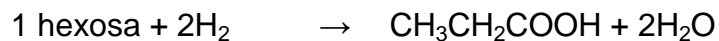
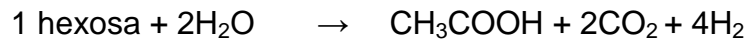


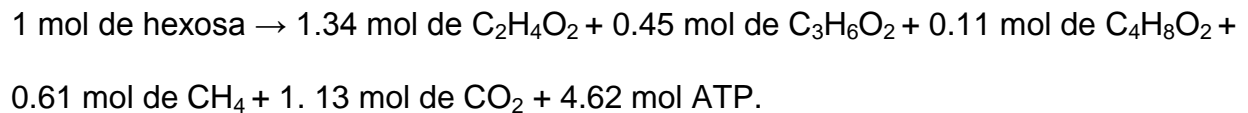
Figura 2. Sustratos y metabolitos que intervienen en la fermentación de los alimentos en el rumen (adaptado de Shimada, 2009).

### 3.3. Estequiometria de la producción AGV, CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> en el rumen

La producción de AGV, CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>, que resulta del proceso de fermentación de una hexosa en el rumen, fue resumida por Hungate (1966) en la siguiente relación estequiométrica:



Como puede observarse en la producción de ácido acético y butírico se produce CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>. En cambio, la producción de ácido propiónico requiere de H<sub>2</sub> sin producción de CO<sub>2</sub> (D'Mello, 2000). Al respecto Beever (1993) resume que el proceso se puede expresar de la siguiente manera:



La producción de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> en el rumen depende en gran parte de la producción molar AGV. Por este motivo Wolin (1960) propuso que se puede conocer la producción de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> cuando se conoce la concentración molar de AGV. Para esto es necesario que en la ecuación anterior se multipliquen los productos por sus valores equivalentes de oxidación (Cuadro 1) y se sumen los componentes.

Cuadro 1. Equivalentes de oxidación de los productos de fermentación de la glucosa.

Compuesto	Formula	Equivalente de oxidación mol <sup>-1</sup>
Glucosa	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	0
Ácido acético	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	0
Ácido propiónico	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	-1
Ácido butírico	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	-1
Dióxido de carbono	CO <sub>2</sub>	+2
Metano	CH <sub>4</sub>	-2

(Van Soest, 1982).

En esta ecuación se considera que la sumatoria de los productos de la fermentación ruminal multiplicados por su respectivo equivalente de oxidación es igual a cero

$$(+2)\text{CO}_2 + (-2)\text{CH}_4 + (0)\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2 + (-1)\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2 + (-2)\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2 = 0$$

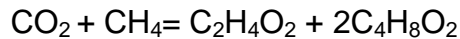
Como se puede observar, el acetato sale de la ecuación por qué su valor es cero y al simplificar la ecuación se tiene:

$$2\text{CO}_2 - 2\text{CH}_4 - \text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2 - 2\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2 = 0$$

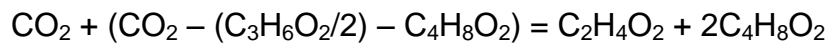
Despejando al CH<sub>4</sub> se obtiene lo siguiente:

$$\text{CH}_4 = \text{CO}_2 - (\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2/2) - \text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$$

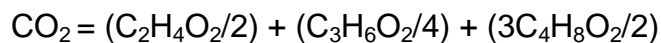
Pero si se sabe que el CH<sub>4</sub> se forma a expensas del CO<sub>2</sub> que resulta de la formación del acetato y del butirato, y que el butirato alternativamente se puede formar a partir de dos moles de acetato se tiene entonces que:



Al eliminar el CH<sub>4</sub> de la ecuación por sustitución algebraica se tiene que:



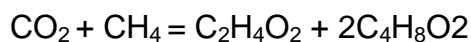
De aquí se puede despejar al CO<sub>2</sub> y se obtiene tiene una ecuación que permite calcular la producción de CO<sub>2</sub>:



Conociendo que en el rumen la proporción molar de AGV es 65 % acético, 20 % propiónico y 15 % butírico, al sustituir estos valores en la ecuación se tiene que la proporción de CO<sub>2</sub> es de 60 %.

$$\text{CO}_2 = (65/4) + (20/4) + (3*15/2) = 60$$

Para conocer la producción de CH<sub>4</sub> se sustituyen nuevamente los valores y se obtiene una proporción de 35%.



$$60 + \text{CH}_4 = 65 + 2*15$$



$$60 + \text{CH}_4 = 65 + 30$$

$$\text{CH}_4 = 35$$

Por lo tanto, en el rumen cuando la proporción molar de AGV es de 65 % acético, 20 % propiónico y 15 % butírico. El biogás producido tiene una composición de 65 % CO<sub>2</sub> y 35 % CH<sub>4</sub>.

### 3.4. Las bacterias metanogénicas del rumen

Taxonómicamente todas las bacterias metanogénicas pertenecen al reino arquea de *Euryarchaeota* y se clasifican en los órdenes *Methanobacteriales*, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales*, *Methanopyrales* y *Methanosarcinales* (Thauer, 1998). En el rumen las bacterias metanogénicas identificadas se clasifican en los géneros *Methanobrevibacter*, *Methanobacterium*, *Methanomicrobium* y *Methanosarcina* (McAllister *et al.*, 1996; Wolin *et al.* 1997). Las principales especies son *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobrevibacter sp*, *Methanobacterium aebophilicum*, *Methanobacterium formicum*, *Methanobacterium mobile*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Methanococcus vannieli*, *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina mazei* y *Methanospirillum hungatii*. En general todas estas especies tienen como principal característica que utilizan H<sup>+</sup>, H<sub>2</sub> y formato para reducir el CO<sub>2</sub> hasta CH<sub>4</sub> (Zeikus, 1977; Miller *et al.*, 1986; McAllister *et al.*, 1996; Wright *et al.*, 2004).

La población de bacterias metanogénicas en el rumen está en una concentración no menor a  $10^6$  bacterias  $\text{mL}^{-1}$  (McAlister *et al.*, 1996) y habita un medio anaeróbico donde el potencial de oxido reducción puede variar de -250 a -450 mV. El proceso fermentativo mantiene una osmolaridad entre 260 a 340 mOsm, con una presión parcial de  $\text{H}_2$  de  $1 \times 10^{-3}$  atm que equivale al 0.18 % del total de los gases disueltos en la fracción líquida del contenido ruminal (Cobos, 2007).

En este medio las bacterias fermentadoras obtienen mayor eficiencia de energía en el uso del carbono, al transferir el  $\text{H}_2$  producido en las reacciones metabólicas a las bacterias metanogénicas, lo cual también favorece la conversión del NAD en NADH (Hegarty, 1999). De tal forma los microorganismos oxidan el  $\text{H}^+$  transfiriéndolo a los productos de la fermentación (usualmente a NADH) o lo usan en la producción  $\text{H}_2$  molecular (Deppenmeier *et al.*, 1996; Hegarty, 1999). Para que esto ocurra, el potencial de óxido reducción en las reacciones debe ser tan negativo, como el del  $\text{H}_2$  ( $\text{CO}_2/\text{HCOOH}$  y  $2\text{H}^+/\text{H}_2$  tienen un  $E'_0 = -420$  mV). El  $\text{H}_2$  producido por las bacterias no se acumula en el fluido ruminal y se transfiere tan rápido como se produce a las bacterias metanogénicas que pueden utilizar  $\text{H}^+$  o  $\text{H}_2$  (Thauer, 1998).

### **3.5. La asociación entre bacterias metanogénicas y protozoarios en el rumen**

La relación entre las bacterias metanogénicas y los protozoarios ciliados del rumen es muy estrecha, debido al fenómeno de transferencia interespecifica de  $\text{H}_2$  (Finlay y Fenchel, 1993; Johnson y Johnson, 1995; Moss *et al.*, 2002). A pesar de esto la relación entre las bacterias metanogénicas y los protozoarios no es obligada y el número de bacterias metanogénicas asociadas con protozoarios en el rumen puede

umentar o disminuir hasta 40 %, si varía la tasa de fermentación (Vogels *et al.*, 1980; Tokura *et al.*, 1997).

Al respecto, Cobos (2007) menciona que en el rumen, los protozoarios de la familia Ophryoscolecidae (orden Entodinomorphida) en los géneros *Diplodinium*, *Diploplastrum*, *Enoploplastrum*, *Entodinium*, *Epidinium*, *Eremoplastrom*, *Ostracodinium* y *Polyplastrum* las bacterias metanogénicas se adhieren a su superficie porque existe un mutualismo metabólico que involucra la actividad catabólica de los hidrogenosomas de los protozoarios. De esta relación tanto protozoarios como las bacterias se benefician porque los protozoario evitan la acidificación celular y las bacterias metanogénicas se abastecen de H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>.

Por su parte McAlister (1996) menciona que la eliminación de los protozoarios del rumen puede disminuir la producción de metano hasta en 50 %. Sin embargo, los métodos que se utilizan para eliminar a los protozoarios pueden ser dañinos para los rumiantes (Baker, 1999), y además en rumiantes alimentados con dietas a base de forrajes la eliminación de los protozoarios no ha demostrado tener un efecto positivo en disminuir la producción de CH<sub>4</sub> en el rumen (Newbold *et al.*, 1995a; Johnson y Johnson, 1995; Ushida *et al.*, 1997).

### **3.6. La metanogénesis**

La metanogénesis a pesar de estar ligada a la fermentación anaeróbica, no es un proceso fermentativo porque las bacterias metanogénicas no realizan fosforilación a nivel de sustrato. En la metanogénesis el ATP se produce por fuerza motriz de

protones y en el proceso no intervienen citocromos, flavinas o quinonas para el transporte de electrones. La fuente de carbono en estas bacterias es el CO<sub>2</sub> (Cuadro 2), el cual se reduce a CH<sub>4</sub> por hidrogenación enzimática (Deppenmeier *et al.*, 1996; Thauer, 1998;).

Cuadro 2. Energía de activación de la metanogénesis con varios sustratos como fuente de carbono.

Sustrato	Ecuación estequiométrica	$\Delta G^{\circ}$ (kj mol <sup>-1</sup> CH <sub>4</sub> )
H <sub>2</sub> y CO <sub>2</sub>	$4H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$	-131
Formato	$4HCO_2H \rightarrow CH_4 + 3CO_2 + 2H_2O$	-144.5
Metanol	$4CH_3 OH \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 2H_2O$	-106.5
Methanol + H <sub>2</sub>	$CH_3OH + H_2 \rightarrow CH_4 + H_2O$	-112.5
Metilamina	$4CH_3 NH_2 Cl + 2H_2O \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 4NH_4Cl$	-
Dimetilamina	$2(CH_3)_2 NHCl + 2H_2O \rightarrow 3CH_4 + CO_2 + 2NH_4Cl$	-
Trimetilamina	$4(CH_3)_3 NCl + 6H_2O \rightarrow 9CH_4 + 3CO_2 + 4NH_4Cl$	-76
Acetato	$CH_3 COO^- + H^+ \rightarrow CH_4 + CO_2$	-36

(Thauer, 1998).

En la ruta de la metanogénesis las bacterias usan varias enzimas y seis cofactores únicos, que no han sido observados en algún otro microorganismo (Cuadro 3). Tres de estos cofactores, metanofuran (MFR), tetrahidrometanopterina (THMP), y la coenzima M (CoM) actúan como acarreadores de unidades de carbono y agentes reductores. El factor 420 (F<sub>420</sub>), acarrea electrones, y el factor 430 (F<sub>430</sub>) y el

componente B (CoB) intervienen en el paso final de la metanogénesis para la formación del CH<sub>4</sub> (Thauer, 1998; Shima *et al.*, 2002).

Cuadro 3. Enzimas y cofactores que intervienen en la metanogénesis.

Enzima	Cofactores
Formil-metanofuran sintetasa	MFR
Formil metanofuran-tetrahidro metanopterín transferasa	THMP
Metil tetrahidrometanopterín ciclohidrolasa	THMP
Metilén tetrahidrometanopterín F <sub>420</sub> oxidoreductasa	THMP
	F <sub>420</sub>
Metilén tetrahidrometanopterín coenzima M metil transfererasa	THMP
Metil coenzima M reductasa	THMP
	Coenzima M
Metil coenzima M reductasa	Coenzima M
	CoB
	F <sub>430</sub>

MFR: metanofuran, THMP: tetrahidrometanopterina, F<sub>420</sub>; factor 420, F<sub>430</sub>; factor 430,

CoB; componente B. (Thauer, 1998).

En la ruta de la metanogénesis (Figura 3), el CO<sub>2</sub> es reducido hasta formilo por las enzimas que contienen MFR, después el grupo formilo se transfiere del MFR a una enzima que contiene THMP y luego es deshidratado y reducido en dos pasos a metileno y metilo. En seguida, el grupo metilo se transfiere de la THMP a una enzima

que contiene CoM, y al final el complejo metil-CoM es reducido a CH<sub>4</sub> por la enzima metil reductasa donde intervienen F<sub>430</sub> y CoM. La coenzima F<sub>430</sub> elimina el grupo CH<sub>3</sub> del CH<sub>3</sub>-CoM, formando un complejo Ni<sup>2+</sup>-CH<sub>3</sub>, después este es reducido por los electrones del CoB y un complejo disulfuro de CoM y CoB (CoM-S-S-HTP) (Madigan *et al.*, 2002).

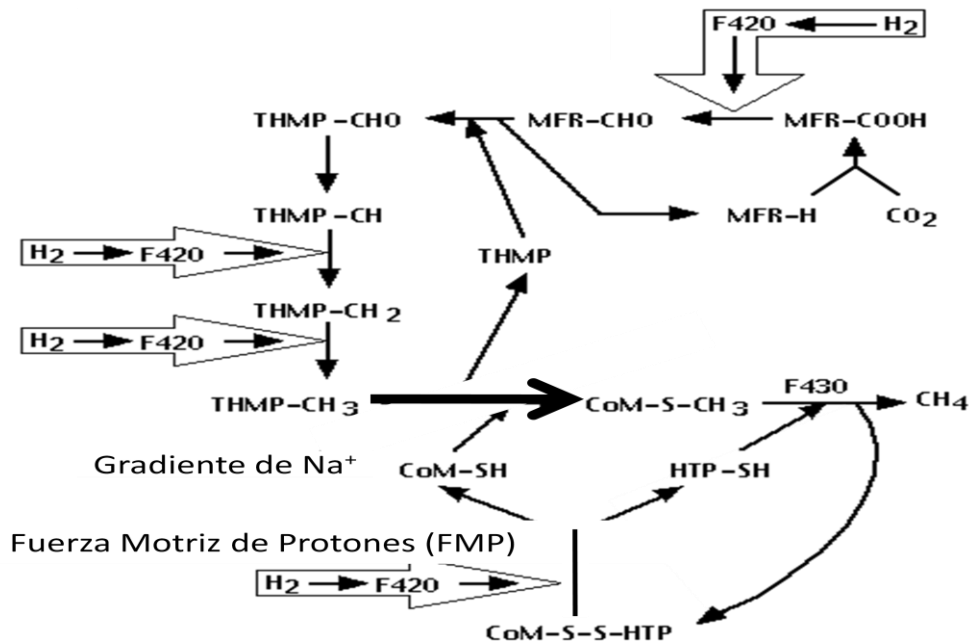


Figura 3. Ruta de la metanogénesis (Thauer, 1998; Shima *et al.*, 2002).

Aparentemente en la metanogénesis podría haber síntesis de dos ATP, uno acoplado a un gradiente de protones y el otro a un gradiente de sodio. El primer se produce en la reducción del complejo disulfido CoM-S-S-HTP, tras la separación de los grupos -SH, por un FAD que contenga heterodisulfito reductasa formándose un ATP por fuerza motriz de protones. El segundo se produciría en la transferencia del grupo CH<sub>3</sub> del complejo CH<sub>3</sub>-THMP a CoM por un gradiente de sodio (Thauer, 1998).

Es importante mencionar que con anterioridad se creía que la coenzima B12 participaba en la metanogénesis, debido a que al adicionarla en medios de cultivo para bacterias metanogénicas actúa donando grupos  $\text{CH}_3$  a la CoM. Sin embargo, se ha observado que en cualquier cultivo *in vitro* otros compuestos también pueden donar grupos  $\text{CH}_3$  (Thauer, 1998). A pesar de que la coenzima B12 no participa realmente en la metanogénesis, sí está involucrada en la síntesis celular de las bacterias metanogénicas debido a que en este tipo de bacterias al no llevarse a cabo el ciclo de Calvin, la principal ruta para la incorporación de  $\text{CO}_2$  al interior del material celular es la ruta de la monóxido de carbono reductasa. En esta ruta una molécula de  $\text{CO}_2$  es reducida a un grupo  $\text{CH}_3$  y después este grupo se transfiere a la coenzima B12, en tanto otra molécula de  $\text{CO}_2$  o  $\text{CO}$  se acopla con el grupo  $\text{CH}_3$  para formar un grupo acetilo con intervención de la enzima monóxido de carbono deshidrogenasa (CODH) (Banerjee y Ragsdale, 2003).

### **3.7. Disminución de la producción de $\text{CH}_4$ en los rumiantes**

Para reducir la producción de  $\text{CH}_4$  en los rumiantes se pueden usar compuestos químicos como cloroformo, amicloral, tricloroacetamida, tricloroetil, bromoclorometano,  $\alpha$ -cyclodextrin, ácido 2-bromoetanosulfónico y 9-10-antraquinona (García-López *et al.*, 1996; Anderson y Rasmussen, 1998; Moss *et al.*, 2000). Estos compuestos han demostrado que pueden inhibir la formación de  $\text{CH}_4$  en el rumen, pero también pueden causar daño a los rumiantes y acumularse en productos como leche y carne.

Una alternativa para disminuir la producción de  $\text{CH}_4$  en el rumen es mejorar el tipo de alimentación de los rumiantes; mediante el uso de forrajes y alimentos concentrados

más digestibles, de mejor calidad nutrimental y con mayor proporción de carbohidratos de rápida fermentación (Rusell y Wallace, 1997; Weimer *et al*, 1998; Rafael y Donald, 2007).

En los rumiantes alimentados con forrajes de mala calidad, en sistemas extensivos, se estima que su producción anual de CH<sub>4</sub> es de 60 a 120 kg con pérdidas de 15 a 18% de la energía consumida en el alimento (Kurihara *et al.*, 1999), en cambio cuando se utilizan forrajes altamente digestibles en sistemas de pastoreo rotacional o dietas con elevado contenido de carbohidratos de rápida fermentación, la producción anual de CH<sub>4</sub> puede ser de 35 a 55 kg con pérdidas de 2 a 12 % de la energía consumida (Kinsman *et al.*, 1995). Además, la adición de 4.6 a 5 % de grasas o aceites en la elaboración de alimento para rumiantes, puede disminuir hasta en 36 % la producción de CH<sub>4</sub> en el rumen, debido a la hidrogenación de las grasas insaturadas. Sin embargo, su uso disminuye el consumo de alimento, la fermentación del alimento y la digestibilidad de la fibra (Wallace, 1994; Johnson y Johnson, 1995; McGinn *et al.*, 2004; Calsamiglia *et al.*, 2007).

### **3.8. Los ionóforos**

Una alternativa, que ha tenido un impacto positivo para disminuir la metanogénesis en el rumen, es el uso de los ionóforos. Estos son antibióticos producidos por una variedad de actinomicetos del género *Streptomyces* los cuales afectan el crecimiento de las bacterias metanogénica en el rumen en forma selectiva, alterando el transporte de iones y cationes al interior de la célula (NRC, 2001).



Los Ionóforos son compuestos lipolíticos que transportan iones y cationes como  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  a través de la membrana por medio de interacciones dipolo, enlaces de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals (Rusell y Strobel, 1989). Los más utilizados son la monensina (que se une preferentemente a cationes monovalentes) y lasolacida (se une a iones monovalentes y bivalentes), estos afectan a las bacterias metanogénicas al actuar en el intercambio iónico de la membrana celular, modificando el gradiente de protones y cationes en uno y otro lado de la membrana. Como respuesta a esta modificación de gradientes, las bacterias metanogénicas mantienen un bombeo activo de protones al exterior de la membrana, para mantener la concentración iónica y el equilibrio ácido-base en su citoplasma (Rusell y Strobel, 1989). Al respecto el NRC (2001) recomienda agregar lasolacida y monensina en la dieta de los rumiantes en una dosis de  $1 \text{ mg kg}^{-1}$  de peso corporal.

Los ionóforos hacen más eficiente la fermentación de los alimento en el rumen, incrementando la producción de ácido propiónico, reducen la pérdida de energía disponible para el animal hasta en 25 % y disminuyen la producción de  $CH_4$  de 21 a 28 % (Tedeschi *et al.*, 2003). Sin embargo, pese a su efectividad y debido a las políticas de inocuidad alimentaria, el uso de los ionóforos ha sido prohibido en varios países de Europa por considerar que tienen efectos residuales en los productos destinados para consumo humano (CE, 2003).

### **3.9. El fumarato de sodio**

En el rumen, la producción de AGV libera  $H_2$  que en su mayoría es utilizado por las bacterias metanogénicas. Sin embargo, existen otros tipos de bacterias en el rumen

que pueden usar H<sub>2</sub> con menor eficiencia que las bacterias metanogénicas (Le Van *et al.*, 1998; Nollet *et al.*, 1998; Fonty *et al.*, 2007); *Selenomonas ruminantium*, *Vibrio succinogenes*, *Megasphaera elsdenii* y *Anaerovibrio lipolítica* utilizan H<sub>2</sub> y ácido láctico para producir ácido propiónico (Lana *et al.*, 1998, Cobos 2007).

Al respecto algunos investigadores (Carro y Ranilla, 2003; Ungerfeld *et al.*, 2007) mencionan que la formación de ácido propiónico en el rumen es una forma de disminuir la metanogénesis debido a que no involucra liberación de H<sub>2</sub>, y además el fumarato, un compuesto intermediario en la síntesis de propionato, al transformarse en succinato requiere hidrógeno. Por este motivo, al agregar fumarato en el rumen como aditivo aceptor de electrones que favorece la producción de propionato (Figura 4), se puede competir con las bacterias metanogénicas por el H<sub>2</sub> disponible (Demeyer y Henderickx, 1967; Martin, 1998; Asanuma *et al.*, 1999).

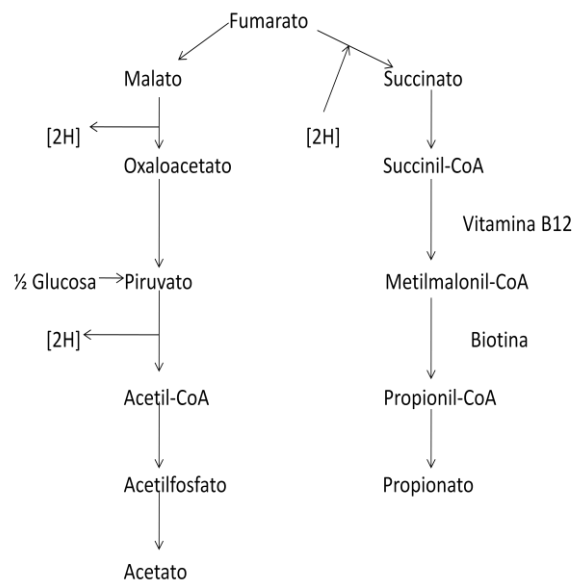


Figura 4. Metabolismo del fumarato en el rumen (Ungerfeld *et al.*, 2007).

Al respecto Asanuma *et al.* (1999) en un estudio *in vitro* realizado con las bacterias ruminales *Selenomonas ruminantium*, *Veillonella párvula*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminobacter amylophilus*, *Megasphaela elsdenii*, *Selenomonas lactilytica* y *Wollinella succinogenes*, reporta que agregar fumarato de sodio en el medio de cultivo de estas bacterias aumentó ( $P \leq 0.05$ ) la producción ácido propiónico y la oxidación de  $H^+$ .

Por su parte, López *et al.* (1999) reporta que en un experimento *in vitro* con bacterias ruminales y dietas con alto contenido de carbohidratos de rápida fermentación, la adición de fumarato de sodio aumentó ( $P \leq 0.001$ ) el número de bacterias celulolíticas de  $8.8 \times 10^5$  a  $2.4 \times 10^6$   $mL^{-1}$  e incrementó la ( $P \leq 0.05$ ) digestibilidad de la materia seca de 47.6 a 50.8 % sin alterar el pH del medio de cultivo. A pesar de esto, es importante mencionar que el efecto del fumarato podría estar influenciado por la dosis empleada, el tipo de sustrato utilizado, y las especies de microorganismos presentes en el rumen (Asanuma *et al.*, 1999; Demeyer y Fievez, 2000; Fonty *et al.*, 2007), debido a que las bacterias metanogénicas del rumen son susceptibles a los cambios de pH (Lana *et al.*, 1998; Asanuma y Hino, 2000).

### **3.10. El uso de *Saccharomyces cerevisiae***

En la alimentación de rumiantes es común usar aditivos, elaborados con extractos de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) más su medio de cultivo, que se agregan al alimento para aumentar su eficiencia productiva y favorecer el desarrollo de los microorganismos del rumen (Williams *et al.*, 1991; Schingoether *et al.*, 2004, Pinos *et al.*, 2008). Algunos autores mencionan que *S. cerevisiae* mejora la digestión de los

forrajes, estimula el desarrollo de bacterias que consumen ácido láctico, incrementa la producción de ácido propiónico y ayuda a mantener estable el pH del rumen (Erasmus *et al.*, 1992; Sullivan y Martin, 1999; Lynch y Martin, 2002; Miller-Webster *et al.*, 2002; Lila *et al.*, 2004; Lila *et al.*, 2006).

En lo que se refiere a la producción de CH<sub>4</sub>, Wallace (1994) menciona que *S. cerevisiae* tiene un efecto positivo en disminuir la producción de CH<sub>4</sub> en el rumen porque ayuda a eliminar el oxígeno del fluido ruminal, reduciendo de esta forma su efecto negativo en el desarrollo de los microorganismos del rumen, lo cual mejora la capacidad de los microorganismos para aprovechar los nutrientes y disminuir la pérdida de energía por la formación de CH<sub>4</sub>.

Al respecto Newbold *et al.* (1995b) reporta que en ovinos con dosis de 2 g d<sup>-1</sup> de *S. cerevisiae*, la concentración de bacterias totales aumentó ( $P \leq 0.05$ ) de 1.53 a 3.1 x 10<sup>8</sup> mL<sup>-1</sup> y la de bacterias celulolíticas se incrementó ( $P \leq$ ) de 17.5 a 60.1 x 10<sup>6</sup> mL<sup>-1</sup>. Por su parte, Chaucheyras *et al.* (1995), McGinn *et al.* (2004) Lila *et al.* (2004) reportan que *S. cerevisiae* incrementa la utilización de H<sub>2</sub> y favorece la formación de ácido acético disminuyendo así forma la producción de CH<sub>4</sub> en los rumiantes, y Mutsvagwa *et al.* (1992) reporta que en un experimento *in vivo* usando dosis de 1.5 kg t<sup>-1</sup> de *S. cerevisiae* disminuyó la producción de CH<sub>4</sub> en el rumen 10.56 %.

En contraste Sullivan y Martin (1999) mencionan que el efecto de *S. cerevisiae* sobre la producción de CH<sub>4</sub> en los rumiantes puede ser variable y reportan que *in vitro* usando dosis de *S. cerevisiae* de 0.35 y 0.73 g L<sup>-1</sup> de medio de cultivo, la producción de propiónico y acético aumentó ( $P \leq 0.05$ ) pero la relación acético/propiónico se mantuvo

constante ( $P \geq 0.05$ ), y la producción de  $\text{CH}_4$  aumento ( $P \leq 0.05$ ) tres veces con respecto al tratamiento testigo. En cambio Lila *et al.* (2004) en condiciones similares reporta que con dosis de 0.33, 0.66, 0.99 y  $1.32 \text{ g L}^{-1}$  no aumento ( $P \geq 0.05$ ) la producción de  $\text{CH}_4$ , y la concentración molar de propiónico aumentó ( $P \leq 0.05$ ) disminuyendo la relación acético/propiónico.

### **3.11. Métodos para medir producción de biogás, $\text{CO}_2$ y $\text{CH}_4$ en el rumen**

En las técnicas *in vivo* para medir producción de biogás,  $\text{CO}_2$  y  $\text{CH}_4$  en el rumen se requieren instalaciones especiales, equipos y animales. En cambio las técnicas *in vitro*, que únicamente simulan la fermentación de los alimentos en biodigestores, usan como inóculo sólo fluido ruminal fresco (MacCaughen *et al.* 1997; DeRamus *et al.* 2003).

Las técnicas *in vitro* generalmente usan viales serológicos de vidrio como biodigestores, y por medio de transductores de presión, jeringas volumétricas, trampas para captura de gas o cromatografía de gases se mide la producción biogás y su contenido de  $\text{CO}_2$  y  $\text{CH}_4$  (Menke y Steingass. 1988; Pell y Schofield 1993; Theodorou *et al.* 1994; Jawed y Tare, 1999; Hindrichsen *et al.* 2004; Eun *et al.* 2004).

Los transductores de presión y las jeringas volumétricas tienen como desventaja, que la alta presión interna que se acumula en el interior de los biorreactores altera la solubilidad de los gases en solución acuosa en forma directamente proporcional a la presión generada en el interior de los biorreactores (France *et al.* 1993; Theodorou *et al.* 1994; Shofield y Pell, 1995; Getachew *et al.* 1998). Esto provoca que se realicen

mediciones erróneas de la cantidad de biogás que se produce por la fermentación de un sustrato. Sin embargo, cuando se usan biodigestores acoplados a trampas de gas se puede medir la producción de biogás, CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> equilibrando la presión interna de los biorreactores con la presión atmosférica por medio de una válvula de alivio evitando de esta forma que la solubilidad de los gases altere las mediciones (Menke *et al.* 1979; Jawed y Tare, 1999; Gaviria *et al.* 2003).

### **3.12. Leyes de los gases que se aplican para medir producción de biogás**

Para medir la producción de biogás, que se genera cuando se simula la fermentación *in vitro* en un sustrato, es necesario considerar las leyes fisicoquímicas que rigen el comportamiento de los gases. En primer lugar la ley de las presiones parciales dice, que la presión de vapor total (P<sub>t</sub>) de una mezcla de gases en el interior de un recipiente, es igual a la suma de las presiones parciales de cada uno de sus componentes:

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

La ley de Boyle-Mariotte dice que el volumen de un gas a temperatura constante varía en forma inversamente proporcional a la presión ejercida por el gas:

$$P_1 V_1 = P_2 V_2$$

La ley de Charles-Gay Lussac dice que el volumen ocupado por cualquier muestra de gas a una presión constante es directamente proporcional a la temperatura absoluta del sistema y se resume en la siguiente ecuación:

$$V_1/T_1 = V_2/T_2$$

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

$$P V = n R T$$

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

La ley de Raoult menciona que en una solución acuosa ideal, cuando sus componentes alcanzan el equilibrio químico, la presión de vapor de los gases disueltos en la solución acuosa, es igual la suma de la presión de vapor de cada componente multiplicada por su respectiva fracción molar (Sander, 1999) y se puede expresar:

$$P = P_1 * X_1 + P_2 * X_2 + \dots + P_i * X_i$$

Donde P es la presión de vapor de los gases disueltos en solución acuosa,  $P_i$  es la presión de vapor de cada gas disolvente y  $X_i$  es la fracción molar del componente en solución acuosa.

La Ley de Henry dice que a temperatura constante, la cantidad de gas disuelto en un líquido es proporcional a la presión parcial que ejerce ese gas sobre el líquido (Sander, 1999) y se expresa:

$$K_H = C_a/P_g$$

Donde  $P_g$  es la presión parcial del gas (en atm),  $C_a$  es la concentración del gas en la fase acuosa (en mol) y  $K_H$  es la constante de Henry, que depende de la naturaleza del gas y la temperatura. La constante de disolución de Henry a 25 °C y 1 atm de presión para el  $\text{CO}_2$  y el  $\text{CH}_4$  es  $3.4 \times 10^{-2}$  y  $1.4 \times 10^{-3}$  mol atm<sup>-1</sup> (Sander, 1999).



## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo general

Determinar *in vitro* la producción de biogás y su composición, mediante biodigestores acoplados a trampas para captura de gas, cuando se utiliza como sustrato alfalfa y se adiciona *Saccharomyces cerevisiae* o fumarato de sodio para disminuir la metanogénesis.

### 4.2. Objetivos particulares

- a) Estandarizar una técnica donde mediante la fermentación *in vitro* de un sustrato en biodigestores acoplados a trampas para captura de gas se pueda medir la producción de biogás y su composición.
- b) Evaluar el efecto de los productos Yea Sacc<sup>®</sup>, Procreatin 7<sup>®</sup> y Diamond V XP<sup>®</sup> en la producción de CH<sub>4</sub>, AGV, NH<sub>3</sub>, pH y concentración de bacterias totales cuando se simula la fermentación *in vitro* de alfalfa en biodigestores acoplados a trampas de gas.
- c) Determinar el efecto de diferentes dosis de fumarato de sodio en la producción de biogás, CH<sub>4</sub>, AGV, N-NH<sub>3</sub>, pH y concentración de bacterias totales al simular la fermentación *in vitro* de alfalfa en biodigestores acoplados a trampas de gas.

## 5. HIPÓTESIS

Durante la fermentación *in vitro* de alfalfa en biodigestores acoplados a trampas para captura de gas se puede medir de la producción total de biogás y su contenido de CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub>.

Los productos Yea Sacc<sup>®</sup>, Procreatin 7<sup>®</sup> y Diamond V XP<sup>®</sup>, elaborados con *Saccharomices cerevisiae*, disminuyen la producción de CH<sub>4</sub> en la fermentación *in vitro* de un forraje aumentando la concentración molar de ácido propiónico.

El fumarato de sodio disminuye la producción de CH<sub>4</sub> y aumenta la producción molar de ácido propiónico en la fermentación *in vitro* de un forraje.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el laboratorio de microbiología ruminal del Programa de Ganadería, posgrado en Recursos Genéticos y Productividad del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México.

### 6.1 Experimento I

#### 6.1.1 Medición *in vitro* de biogás, CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> en biodigestores acoplados a trampas de gas

Durante la fermentación *in vitro* de un sustrato en biodigestores se puede medir la producción de biogás CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> acoplando trampas de gas a los biodigestores (Menke y Steingass., 1988; Beuvink y Spoeltra, 1992; Pell y Shofield, 1993; Blummel y Ørskov, 1993; Cone *et al.*, 1996; Getachew *et al.*, 1998). Sin embargo, en las trampas de gas se puede usar como solución interna agua destilada, solución salina ácida o solución de NaOH (Krabill *et al.*, 1969; Beuvink y Spoeltra; 1993; Menke *et al.*, 1979; Gaviria *et al.*, 2003).

Debido a que la solubilidad del CO<sub>2</sub> varía dependiendo el tipo de solución interna usada en las trampas de gas, que en solución salina ácida es 0 % (Smith y Stöckle, 2008), en agua hasta 73.8 % (Reid y Prausnitz, 1987), y en solución de NaOH 100 % (Lin y Chen, 2007), se realizó un experimento con el objetivo de medir la producción de biogás en tres tipos de trampas, cuando se usan biodigestores con medio GCAFR con y sin alfalfa, y usando líquido ruminal fresco como inóculo.

### 6.1.2. Biodigestores y trampas de gas

En la preparación de los biodigestores y trampas de gas se usaron viales serológicos de 100 mL. Para los biodigestores se usaron 24 viales de los cuales sólo en 12 se depositó 1 g de alfalfa molida (criba de 2 mm). En condiciones de anaerobiosis todos los viales fueron llenados con 45 mL de medio GCAFR (Cuadro 4), y sellados con tapones de goma y arillos de aluminio. Los viales se esterilizaron 15 min a 121 °C y se sometieron a prueba de esterilidad en una incubadora 48 h a 39 °C. Se desecharon los biodigestores donde se observó crecimiento microbiano después del periodo de incubación. Fueron seleccionados para el experimento nueve biodigestores que contenían medio GCAFR con 1 g de alfalfa y nueve que contenían sólo medio GACFR.

Para las trampas de gas se llenaron seis viales con 100 mL de agua destilada (pH de 5.12), seis viales con 100 mL de solución salina acida; 400 g L<sup>-1</sup> de NaCl + HCl 0.5 N hasta disminuir el pH a 2 y 400 g L<sup>-1</sup> de solución de anaranjado de metilo al 20 % como indicador (Krabill *et al.*, 1969; Williams y Shih, 1989; Hardik y Madamwar, 2000), y seis viales con 100 mL de solución de NaOH 1N; 40 g L<sup>-1</sup> de NaOH con pH final de 13.74 (Vidal *et al.*, 2007; Stolaroff *et al.*, 2008). Las trampas fueron selladas con tapones de goma y arillos de aluminio.

Cuadro 4. Composición del medio de cultivo GCAFR.

Ingrediente	Dosis 100 mL <sup>-1</sup>
Agua destilada (mL)	56.2
Fluido ruminal clarificado (mL)	30
Solución mineral 1 (mL)	5.0
Solución mineral 2 (mL)	5.0
Resarzurina al 0.1 % (mL)	0.1
Tripticasa peptona (g)	0.2
Extracto de levadura (g)	0.1
Glucosa (g)	0.06
Celobiosa (g)	0.06
Almidón (g)	0.06
Carbonato de sodio 8% (mL)	5.0
Solución de sulfato-cisteína (mL)	2.0

Fluido ruminal clarificado: líquido ruminal filtrado en manta de cielo, centrifugado 15 min a 11,000 rpm y esterilizado 35 min a 15 psi, 121 °C (el proceso se realizó tres veces).

Solución mineral 1: 6 g de K<sub>2</sub>HPO por cada 1000 mL de agua destilada.

Solución mineral 2: 6 g de KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>, 6 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 12 g NaCl, 2.45 g MgSO<sub>4</sub> y 1.6 g CaCl<sub>2</sub> H<sub>2</sub>O por cada 1000 mL de agua destilada

Solución de resarzurina 0.1 %: 0.1 g de de resarzurina en 100 mL de agua destilada, calentar para disolver y esterilizar 15 min a 121 °C.

Solución de Carbonato de sodio 8 %: 8 g de NaHCO<sub>3</sub> en 100 mL de agua destilada, calentar para disolver y esterilizar 15 min a 121 °C.

Solución de sulfato-cisteína: agregar 2.5 g de L- cisteína en 50 mL de agua destilada, ajustar el pH a 10 con solución de NaOH al 10 % (4 N), añadir 2.5 g de Na<sub>2</sub>S.9H<sub>2</sub>O y aforar a 200 mL. Pasar la mezcla a un matraz de bola, calentar con flujo de CO<sub>2</sub> y se esteriliza 15 min a 121 °C.

Cobos y Yokoyama (1995).

### **6.1.3. Inóculo**

Como inóculo se usó fluido ruminal fresco obtenido de una vaca Holstein canulada en el rumen, alimentada 30 d en una pradera de alfalfa (*Medicago sativa*) y pasto ovillo (*Dactylis glomerata*). El fluido ruminal fue extraído a las 08:00 h, se filtró en manta de cielo doblada en cuatro para quitar las partículas grandes, y depositó en un termo para transportarlo al laboratorio. El fluido fue filtrado con papel Whatman No 540 con una bomba de vacío y depositado en un matraz de bola con flujo de CO<sub>2</sub> a 39 °C. La concentración de bacterias totales en el inóculo fue  $6.9 \times 10^{10}$  bacterias mL<sup>-1</sup> de fluido y el pH 6.78. El tiempo transcurrido entre la extracción del fluido y su aplicación en los biodigestores fue 45 min y se aplicaron 5 mL de fluido en cada biodigestor por medio de punción con jeringa hipodérmica.

### **6.1.4. Acoplamiento de biodigestores y trampas de gas**

Antes de iniciar el experimento, los biodigestores fueron colocados en un baño maría hasta que se estabilizó la temperatura a 39 °C, después se aplicó el inóculo en cada biodigestor acoplando al mismo tiempo una trampa de gas por medio de una porción de tubería Taygon® (Ø externo e interno de 2.38 x 3.63 mm y 45 cm de longitud) a la cual le fue colocado en sus extremos agujas hipodérmicas (marca Terumo® 20G x 31.8 mm).

La presión del sistema se mantuvo constante, mediante una aguja hipodérmica colocada en el tapón de la trampa de gas, para que esta funcionara como válvula de alivio (Figura 5). Finalmente, la trampa de gas fue colocada en forma invertida sobre

una probeta de plástico para medir el desplazamiento de la solución interna en la trampa de gas, por la acumulación del biogás en el espacio de cabeza.

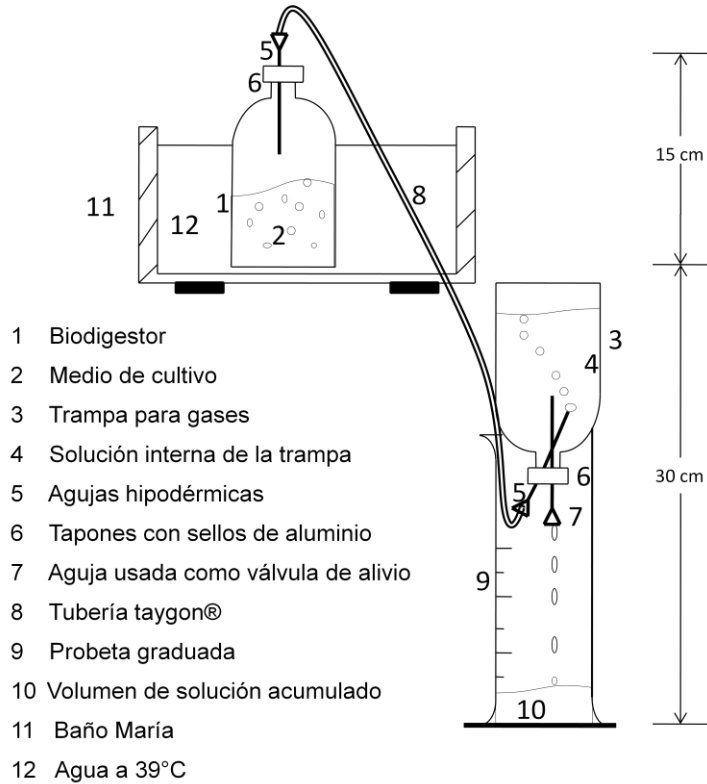


Figura 5. Diagrama de un biorreactor acoplado a trampa de gas.

### 6.1.5. Variables evaluadas

Se midió el pH en las trampas de gas y los biodigestores, a las 0 y 72 h de incubación por medio de un potenciómetro portátil marca ORION modelo 250A calibrado con estándares de 4 y 7.

Concentración de bacterias totales; se midió a 72 h de incubación, por medio de diluciones en tubos de ensaye, una cámara Petroff-Hausser y un microscopio marca Olympus® modelo BX51n equipado con objetivo de inmersión 100X. El conteo se realizó en la cuadrícula central de la cámara con un área de 0.05 mm<sup>2</sup> y profundidad de 0.02 mm, para determinar la concentración de bacterias mL<sup>-1</sup> se consideró el promedio de bacterias observado en la cuadrícula, el factor de dilución de la muestra y el factor de la cámara de  $2 \times 10^7$  (Madigan *et al.*, 2002).

Desplazamiento en las trampas de gas a las 0, 3, 6, 12, 24, 48 y 72 h de incubación. Se midió el volumen de solución desplazado de las trampas hacia las probetas por observación visual.

La composición del biogás, capturado en el espacio de cabeza de las trampas de gas a las 72 h de incubación, se midió por cromatografía de gases. Se tomó con una jeringa para cromatografía una muestra de biogás de 0.5 mL del espacio de cabeza de cada trampa de gas. Las muestras se inyectaron en un cromatógrafo de gases marca Perkin Elmer modelo Claurus 500 equipado con detector de conductividad térmica y columna empacada Porapak Q, 50/80, en el horno se uso una rampa de temperatura de 40 a 60 °C con incrementos de 10 °C min<sup>-1</sup>, la temperatura del inyector fue 30 °C, la del detector de 150 °C, el gas acarreador fue helio con flujo de 20 mL min<sup>-1</sup> y el tiempo de retención observado para el CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> fue 0.955 y 2.055 min, con un tiempo de corrida por muestra de 7 min.



### 6.1.6. Diseño experimental y análisis estadístico

Para el experimento se usó un diseño completamente al azar con arreglo factorial 2 x 3. El factor uno (A) fue el tipo de sustrato usado en los biodigestores con dos niveles; con y sin alfalfa. El factor dos ( $\beta$ ) fue el tipo de solución usado en las trampas de gas con tres niveles; trampas de agua, trampas de solución salina ácida y trampas de NaOH. Los tratamientos fueron, tratamiento uno (T1); biodigestores con alfalfa con trampas de agua, tratamiento dos (T2); biodigestores con alfalfa con trampas de solución salina ácida, tratamiento tres (T3); biodigestores con alfalfa con trampas de solución de NaOH, tratamiento cuatro (T4) biodigestores sin alfalfa con trampas de agua, tratamiento cinco (T5) biodigestores sin alfalfa con trampas de solución salina ácida, y tratamiento seis (T6) biodigestores sin alfalfa con trampas de solución de NaOH. Cada tratamiento se realizó por triplicado, las unidades experimentales fueron los biodigestores con su trampa de gas, y el modelo estadístico fue el siguiente:

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

Donde:

$Y_{ijk}$  = variable de respuesta del i-ésimo nivel del factor A, en el nivel j-ésimo nivel del factor  $\beta$ , en la repetición k

$\mu$  = media general

$A_i$  = efecto del i-ésimo nivel del factor A

$\beta_j$  = efecto del j-ésimo nivel del factor  $\beta$

$A\beta_{ij}$  = interacción de los i niveles del fact A en los j niveles del factor  $\beta$

$\epsilon_{ijk}$ ; error experimental.

El análisis de varianza para el resultado de las variables pH, concentración de bacterias totales, desplazamiento, producción de CH<sub>4</sub> y producción de CO<sub>2</sub> se realizó mediante el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS (1999), y para la comparación de medias se uso la prueba de Tukey (Steel y Torrie, 1988).

## **6.2. Experimento II**

### **6.2.1. Uso de levaduras para disminuir la metanogénesis en la fermentación *in vitro* de alfalfa**

Se realizó un experimento en biodigestores acoplados a trampas de gas, para evaluar el efecto de los productos Yea sacc®, Procreatin 7® y Diamond VXP® en la producción de CH<sub>4</sub>, AGV, pH, concentración de bacterias totales y N-NH<sub>3</sub> en la fermentación *in vitro* de alfalfa.

### **6.2.2. Tratamientos**

Los tratamientos fueron: testigo (Testigo); 45 mL de medio de cultivo GCAFR + 1.0 g de alfalfa molida (criba de 2 mm) + 5.0 mL de fluido ruminal fresco; tratamiento uno (T1), Testigo + Yea Sacc® (2.0 mg); tratamiento dos (T2), Testigo + Procreatin 7®

(5.0 mg); tratamiento tres (T3), Testigo + Diamond V XP® (10.0 mg). Para medir la cantidad de vapor de agua se usaron biodigestores sin inóculo (45 mL de medio GCAFR + 1.0 g de alfalfa).

### 6.2.3. Dosis usada el experimento

La dosis comercial de *S. cerevisiae* recomendada en alimento para vacas lecheras es 45 a 120 g d<sup>-1</sup> y en bovinos para carne 15 a 120 g d<sup>-1</sup> (Sullivan y Martin, 1999; Lynch y Martin, 2002). Considerando que el rumen de un bovino tiene una capacidad de 100 L, la dosis de *S. cerevisiae* que se puede usar en biodigestores con capacidad de 100 mL es 0.15 a 1.2 g. Sin embargo, las casas comerciales recomiendan las siguientes dosis; yea Sacc® 1 kg t<sup>-1</sup>, Procreatin 7® 2.5 kg t<sup>-1</sup> y Diamond V XP® 5 kg t<sup>-1</sup>. Con éstas recomendaciones, para los tratamientos en el experimento se disolvieron 2.0 g de Yea sacc® en 100 mL de agua destilada, para Procreatin 7® 5.0 g en 100 mL y para Diamond VXP® 10.0 g en 100 mL. Así, la dosis empleada para inocular los tratamientos fue 100 µL de cada solución líquida (Cuadro 5) de los productos comerciales (2x10<sup>-3</sup>, 5x10<sup>-3</sup> y 0.1 g por cada 50 mL de medio GCAFR).

Cuadro 5. Dosis de Yea Sacc, Procreatin y Diamon VxP usadas en los tratamientos.

Especificaciones	Producto		
	Yea Sacc	Procreatin	Diamon VxP
Concentración de <i>S. cerevisiae</i>	20 mg mL <sup>-1</sup>	50 mg mL <sup>-1</sup>	100 mg mL <sup>-1</sup>
Producto disuelto en 100 mL de agua	2 g	5 g	10 g
pH de la mezcla	5.28	4.97	4.78
Dosis en los tratamientos	100 µL	100 µL	100 µL

#### **6.2.4. Biodigestores y trampas de gas**

Los biodigestores se implementaron con 60 viales serológicos de vidrio de 100 mL, en condiciones de anaerobiosis se agregó en cada biodigestor un gramo de alfalfa molida (criba de 2 mm) y 45 mL de medio GCAFR. Los biodigestores fueron sellados con tapones de goma y arillos de aluminio, posteriormente fueron esterilizados en autoclave 15 min a 121 °C y sometidos a prueba de esterilidad 48 h a 39 °C.

Las trampas de gas se implementaron con viales serológicos de 100 mL depositando en cada uno 100 mL de solución de NaOH 1.0 N y sellándolos con tapones de goma y arillos de aluminio. El acoplamiento de los biodigestores y las trampas se hizo como se describe en el experimento uno.

#### **6.2.5. Inóculo usado en el experimento**

Como inóculo se aplicó en cada biodigestor 5 mL de fluido ruminal fresco. Fue extraído de una vaca Holstein canulada en el rumen, alimentada 30 d en una pradera de alfalfa y pasto ovillo. El fluido se filtro con manta de cielo doblada en cuatro para eliminar partículas grandes y se mantuvo con flujo de CO<sub>2</sub> a 39 °C hasta el momento de aplicarse en los tratamientos (Carro y Ranilla, 2003; Eun *et al.*, 2004). El pH del inóculo fue 6.67 y la concentración de bacterias totales  $6.1 \times 10^{11}$  mL<sup>-1</sup>. Los productos Yea sacc®, Procreatin 7® y Diamond VXP®, y el inóculo se aplicaron a los biodigestores mediante punción con jeringa hipodérmica al momento de iniciar el experimento.

### 6.2.6. Variables evaluadas

Se midió el desplazamiento en las trampas de gas a las 0, 6, 12, 24, 48 y 72 usando probetas de plástico.

La composición del biogás capturado en el espacio de cabeza de las trampas gas a las 72 h de incubación se midió por cromatografía de gases. Con una jeringa para cromatografía se tomó 0.5 mL del biogás contenido en el espacio de cabeza de cada trampa, el análisis se realizó con un cromatógrafo marca GOW-MAC equipado con detector de conductividad térmica y columna marca Alltech CTR-1 modelo 428496W-11359. En el horno se uso una rampa de temperatura de 30 a 74 °C con incrementos de 10 °C, la temperatura del inyector fue 30 °C y la del detector 190 °C. El gas acarreador fue He con flujo de 120 mL min<sup>-1</sup>. El tiempo de corrida por muestra fue 10 min y en las muestras sólo se detecto CH<sub>4</sub> con un tiempo de retención de 0.85 min.

El pH en los biodigestores a las 0 y 72 h se midió con un potenciómetro portátil marca ORION modelo 250A calibrado con estándares de 4 y 7.

La concentración de bacterias totales a las 72 h se midió mediante diluciones en tubos de ensaye y el conteo de bacterias se realizó con una cámara Petroff Hausser, y un microscopio marca Olympus modelo BX51 equipado con objetivo de inmersión 100X.

La concentración de AGV a las 72 h de incubación se midió por cromatografía de gases. Del interior de cada biodigestor se tomaron muestras de fluido y se depositaron en viales de plástico para mezclarse con ácido metafórico (al 25 %) en proporción 4:1

(muestra: ácido metafosfórico). Las muestras se centrifugaron 10 min a 14 000 rpm y del sobrenadante se tomaron alícuotas de 1.5 mL para depositarlas en viales para cromatografía. Después se almacenaron a 3 °C hasta el momento de ser analizadas con un cromatógrafo marca Perkin Elmer, Modelo Claurus 500 equipado con una columna capilar Marca Elite FFAP (15 m de longitud) y detector de ionización de flama (FID). El gas acarreador fue nitrógeno con flujo 4.0 mL min<sup>-1</sup>, para generar la flama se utilizó H<sub>2</sub> y O<sub>2</sub> con flujo de 45 y 450 mL min<sup>-1</sup>. Para el análisis se inyectó 1 µL de muestra, la temperatura del inyector fue de 200 °C y la del detector de 250 °C, además se utilizó una rampa de temperatura en el horno de 95 °C a 160 °C con incrementos de 15 °C min<sup>-1</sup>, dando un tiempo total de corrida de 6.33 min. Con dichas condiciones se caracterizaron tres picos, con un tiempo de retención de 2.07, 2.55 y 3.27 min para los ácidos acético, propiónico y butírico.

La concentración de N-NH<sub>3</sub> a las 72 h de incubación se analizó con la técnica de McCullough (1967), de las muestras usadas para determinar AGV se tomaron alícuotas de 20 µL y se analizaron por medio de espectrofotometría a 630 nm, en un espectrofotómetro Perkin Elmer uv/vis, modelo Lambda 40.

#### **6.2.7. Diseño experimental y análisis estadístico**

Para el experimento se uso un diseño completamente al azar con nueve repeticiones por tratamiento. Las unidades experimentales fueron los biodigestores acoplado a las trampas de gas, las cuales se distribuyeron en forma aleatoria a los tratamientos. El modelo estadístico fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \delta_i + d_{ij} + t_k + (\delta t)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde:

$Y_{ijk}$  = variable de respuesta del el i-ésimo tratamiento, en la j-ésima repetición, en el k-ésimo periodo

$\mu$  = media general

$\delta_i$  = efecto fijo del i-ésimo tratamiento

$d_{ij}$  = efecto aleatorio asociado con el j-ésimo biodigestor en el i-ésimo tratamiento

$t_k$  = efecto fijo del k-ésimo periodo

$(\delta t)_{ij}$  = efecto fijo de la interacción del i-ésimo tratamiento en el k-ésimo periodo

$\varepsilon_{ijk}$  = error aleatorio con el j-ésimo biodigestor en el i-ésimo tratamiento al k-ésimo periodo.

Las variables pH, concentración de bacterias totales, concentración de AGV, y concentración de N-NH<sub>3</sub> se analizaron mediante el procedimiento GLM de SAS (1999) usando la prueba de Tukey (Steel y Torrie, 1988) para comparación de medias. La variable desplazamiento se analizó considerando el efecto del tiempo usando el procedimiento MIXED de SAS (1999), la estructura de la covarianza para los datos se puso a prueba (Littell *et al.*, 1998; Wang y Goonewardene, 2004) y para el análisis se consideró la opción UN.

### **6.3. Experimento III**

#### **6.3.1. Uso de fumarato para disminuir la metanogénesis en la fermentación *in vitro* de alfalfa**

La producción de CH<sub>4</sub> en el rumen puede disminuir al adicionar fumarato de sodio como aceptor de H<sub>2</sub>, lo cual puede favorecer la producción de ácido propiónico. Sin embargo, el efecto del fumarato puede confundirse cuando se usa como sustrato carbohidratos de rápida fermentación. Por éste motivo se evaluó mediante biodigestores acoplados a trampas de gas, el efecto de cinco dosis de fumarato de sodio (0, 22.3, 45.4, 67.7 y 90 % del sustrato) en la fermentación *in vitro* de alfalfa.

#### **6.3.2. Tratamientos**

Se evaluaron cinco tratamientos en el experimento: tratamiento testigo (Testigo); 45 mL de medio GCAFR + 1 g de alfalfa molida (criba de 2mm) + 5 mL de fluido ruminal fresco; tratamiento uno (T1), Testigo + 0.22 g de fumarato de sodio; tratamiento dos (T2), Testigo + 0.45 g de fumarato de sodio; tratamiento tres (T3), Testigo + 0.67 g de fumarato de sodio; tratamiento cuatro (T4), Testigo + 0.90 g de fumarato de sodio.

#### **6.3.3. Dosis usada**

La dosis de fumarato de sodio usada en el experimento se determinó considerando otras dosis usadas por algunos investigadores. Carro y Ranilla (2003) usaron 0, 4, 7 y 10 mmol por cada 50 mL de fluido ruminal (0 a 10 % del sustrato), Asanuma *et al* (1999) 20 y 30 mmol L<sup>-1</sup> de medio de cultivo (36 a 46 % del sustrato), y



Asanuma e Hino (2000) 30 mmol L<sup>-1</sup> de medio de cultivo (46 % del sustrato). Por lo anterior, en el experimento las dosis de fumarato de sodio evaluadas fueron; 0, 31, 63, 94 y 125 mmol L<sup>-1</sup> de medio GCAFR (0, 22.3, 45.4, 67.7 y 90 % del sustrato usado en los biodigestores).

#### **6.3.4. Biodigestores y trampas de gas**

Se implementaron 30 biodigestores con viales serológicos de vidrio de 100 mL, Se depositó 1 g de alfalfa molida (criba de 2mm) en cada uno, y se formaron cinco grupos de seis biodigestores. En el primer grupo, en cada biodigestor, se depositó 45 mL de medio GCAFR, en el segundo 45 mL de medio GCAFR con 0.22 g de fumarato de sodio (sal; C<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Na<sub>2</sub>, SIGMA), en el tercero 45 mL de medio GCAFR con 0.45 g de fumarato, en el cuarto 45 mL de medio GCAFR con 0.68 g de fumarato y en el quinto 45 mL de medio GCAFR con 0.90 g de fumarato. Los biodigestores fueron cerrados con tapones de goma y arillos de aluminio, esterilizados en autoclave 15 min a 121 °C, y se aplicó una prueba de esterilidad de 48 h a 39°C.

Las trampas se preparan con 30 viales serológicos de vidrio de 100 mL, y se formaron dos grupos de trampas, en el primero las trampas se llenaron con 100 mL de solución salina acida y en el segundo con solución de NaOH. El acoplamiento entre los biorreactores y las trampas de gas se realizó como se describe en el primer experimento.

### **6.3.5. Inóculo usado en el experimento**

El inóculo usado fue fluido ruminal fresco extraído de una vaca canulada en el rumen, la cual se alimentó 15 d en una pradera de alfalfa y pasto ovillo. El fluido se filtró con manta de cielo doblada en cuatro para eliminar partículas grandes, el pH fue 6.81 y la concentración total de bacterias  $8.4 \times 10^{11}$  bacterias mL<sup>-1</sup>, y se mantuvo con flujo de CO<sub>2</sub> a 39 °C hasta el momento de su aplicación. La dosis por cada biodigestor fue 5.0 mL y se aplicó mediante punción con jeringa hipodérmica.

### **6.3.6. Variables evaluadas**

El desplazamiento en las trampas de gas de los biodigestores se midió a las 0, 6, 12, 24, 48 y 72 h de incubación usando probetas de plástico. La producción de biogás se midió en las trampas de solución salina ácida y la producción de CH<sub>4</sub> en las trampas de solución de NaOH.

El pH se midió en los biodigestores a las 0 y 72 h usando un potenciómetro portátil marca Orion modelo 250A calibrado con estándares de pH 4 y 7.

La concentración de bacterias totales se midió a las 72 h, por diluciones en tubos de ensaye y para el conteo de bacterias se usó una cámara Petroff Hausser y un microscopio marca Olympus modelo BX51 equipado con objetivo de inmersión 1000X.

La concentración de AGV a las 72 h de incubación se midió por cromatografía de gases, siguiendo la metodología descrita en el segundo experimento.

La concentración de N-NH<sub>3</sub> en los biodigestores a las 72 h de incubación se midió por espectrofotometría, siguiendo la metodología propuesta por McCullough (1967).

La degradación de la materia seca (MS) se determinó por la diferencia entre el peso inicial y final del sustrato. Después de 72 h de incubación, de los biodigestores, se recuperó el sustrato no degradado por medio de filtración en papel Whatman No 541. Los filtros de papel con el residuo de los biodigestores se deshidrataron 24 h en una estufa a 60 °C, se dejaron en un desecador 24 h, y al final se pesaron en una balanza analítica. La diferencia entre el peso inicial y final sirvió para calcular el porcentaje de degradación de la MS en los biodigestores.

### **6.3.7. Diseño experimental**

El diseño experimental usado fue bloques al azar generalizado con tres repeticiones por tratamiento. Las unidades experimentales fueron los biorreactores acoplados a las trampas de gas, y se distribuyeron en dos bloques (Cuadro 6) considerando como criterio para su formación el tipo de solución interna usada en las trampas de gas (solución salina acida y solución de NaOH), y el modelo estadístico fue:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + \beta_j + T\beta_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde,

$Y_{ijk}$  = variable de respuesta del el i-ésimo tratamiento, en el j-ésimo bloque en la repetición k

$\mu$  = media general

$T_i$  = efecto fijo del i-ésimo tratamiento

$\beta_j$  = efecto del j-ésimo bloque

$T\beta_{ij}$  = efecto de la interacción del i-ésimo tratamiento y el j-ésimo bloque

$\varepsilon_{ijk}$  = error experimental.

Los resultados de pH, AGV, N-NH<sub>3</sub>, degradación de MS, CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> se analizaron con el procedimiento GLM de SAS (1999) y la comparación de medias se hizo mediante la prueba de Tukey (Steel y Torrie, 1988).

El desplazamiento de las trampas de gas se analizó por separado con el procedimiento MIXED de SAS (1999) y de acuerdo con lo propuesto por Littell *et al.* (1998) y Wang y Goonewardene (2004) se ajustó la estructura de la covarianza tomado en cuenta la opción CS para el análisis del desplazamiento en las trampas de NaOH y VC para el desplazamiento en las trampas de solución salina ácida.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. Experimento I

#### 7.1.1. Concentración de bacterias totales y pH en las combinaciones

El pH en los biodigestores (Cuadro 6) se mantuvo constante durante el experimento y no hubo diferencias ( $P>0.05$ ) entre los niveles de combinaciones de factores. El pH promedio de los biodigestores fue 6.69, lo cual indica que las condiciones fueron óptimas para la actividad de las bacterias celulolíticas y metanogénicas (Van Kessel y Rusell, 1996; Rusell, 1998; Rusell y Rychlik, 2000).

Cuadro 6. Concentración de bacterias y pH en las combinaciones del experimento I.

Factor A (Biodigestores)	Factor B (Trampas)	pH				Bacterias ( $10^{10}$ mL <sup>-1</sup> )
		Biodigestores		Trampas		
		Inicial	Final	Inicial	Final	
	Agua	6.79	6.76 <sup>a</sup>	<b>5.14<sup>b</sup></b>	<b>3.81<sup>b</sup></b>	5.87 <sup>a</sup>
Con alfalfa	NaOH	6.79	6.72 <sup>a</sup>	13.75 <sup>a</sup>	13.73 <sup>a</sup>	5.33 <sup>a</sup>
	Salina acida	6.79	6.71 <sup>a</sup>	2.0 <sup>c</sup>	2.0 <sup>c</sup>	5.20 <sup>a</sup>
Sin alfalfa	Agua	6.79	6.67 <sup>a</sup>	<b>5.13<sup>b</sup></b>	<b>3.79<sup>b</sup></b>	0.37 <sup>b</sup>
	NaOH	6.79	6.66 <sup>a</sup>	13.75 <sup>a</sup>	13.73 <sup>a</sup>	0.33 <sup>b</sup>
	Salina acida	6.79	6.62 <sup>a</sup>	2.0 <sup>c</sup>	2.0 <sup>c</sup>	0.33 <sup>b</sup>
EE			0.181	0.014	0.072	1.176

<sup>a, b, c</sup>; medias con distintas literales en la misma columna son diferentes ( $P\leq 0.05$ ).

EE; error estándar de la media.

En el pH de las trampas de gas no hubo interacción ( $P>0.05$ ) entre los niveles de los factores A y B. El pH de las trampas de gas siguió la misma tendencia en los biodigestores con y sin alfalfa. El mayor ( $P\leq 0.05$ ) pH se observó en las trampas de NaOH, seguido de las trampas de agua y solución salina ácida. Sin embargo, el pH de las trampas de agua disminuyó de 5.13 a 3.8 al final del experimento, lo cual se debió a la solubilidad parcial de  $\text{CO}_2$  en el agua (Reid y Prausnitz, 1987; Sander, 1999).

La concentración de bacterias totales fue mayor ( $P\leq 0.05$ ) en los biodigestores con alfalfa, lo cual se debió a que la limitada cantidad de sustrato disponible en los biodigestores sin alfalfa limitó el desarrollo *in vitro* de las bacterias (Cobos y Yokoyama, 1995).

### **7.1.2. Desplazamiento en las trampas y composición del biogás**

En el desplazamiento de las trampas de gas (Cuadro 7) hubo interacción ( $P\leq 0.05$ ) en las combinaciones de los niveles de los factores A y B, por lo tanto el desplazamiento de las trampas de gas no siguió la misma tendencia en los biodigestores con y sin alfalfa.

El mayor ( $P\leq 0.05$ ) desplazamiento se observó en las combinaciones; trampas de solución salina ácida y trampas de agua con biodigestores con alfalfa. En las combinaciones; trampas de solución de NaOH con biodigestores con alfalfa, trampas de solución salina ácida, agua y solución de NaOH con biodigestores sin alfalfa no hubo diferencias ( $P>0.05$ ) y se observó el menor ( $P\leq 0.05$ ) desplazamiento.

Esto se debió a que en los biodigestores con alfalfa se produjo más cantidad de biogás ( $P \leq 0.05$ ) que en los biodigestores sin alfalfa. Sin embargo, comparando el desplazamiento, en las trampas de los biodigestores con y sin alfalfa, numéricamente la tendencia fue similar observándose que el mayor desplazamiento fue en las trampas de solución salina ácida seguido de las trampas de agua y solución de NaOH.

Cuadro 7. Desplazamiento en las trampas y composición del biogás del experimento I.

Factor A (Biodigestores)	Factor B (Trampas)	Desplazamiento (mL)	Composición del biogás (%)	
			CO <sub>2</sub>	CH <sub>4</sub>
Con alfalfa	Agua	98.00 <sup>b</sup>	66.65 <sup>b</sup>	33.35 <sup>b</sup>
	NaOH	39.33 <sup>c</sup>	0.00 <sup>c</sup>	100.00 <sup>a</sup>
	Salina ácida	153.00 <sup>a</sup>	78.24 <sup>a</sup>	21.76 <sup>c</sup>
Sin alfalfa	Agua	38.67 <sup>c</sup>	71.99 <sup>b</sup>	28.01 <sup>b</sup>
	NaOH	28.00 <sup>c</sup>	0.00 <sup>c</sup>	100.00 <sup>a</sup>
	Salina ácida	59.34 <sup>c</sup>	80.25 <sup>a</sup>	19.75 <sup>c</sup>
EE		13.596	2.047	2.047

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

EE; error estándar de la media.

En la composición del biogás no hubo interacción ( $P > 0.05$ ) entre los niveles de los factores A y B, y el contenido de CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> de las trampas siguió la misma tendencia en los biodigestores con y sin alfalfa. El contenido de CO<sub>2</sub> fue mayor ( $P \leq 0.05$ ) en las trampas de solución salina ácida, seguido de las trampas de agua. En las trampas de NaOH no se detectó CO<sub>2</sub>, lo cual se debió a que este gas reacciona con

el NaOH para formar bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) eliminándose de esta forma el  $\text{CO}_2$  del biogás contenido en el espacio de cabeza (Jeon *et al.*, 2006; Lin y Chen, 2007; Vidal *et al.*, 2007; Dewil *et al.*, 2007; Chia-Chang y Bor-Chi, 2007; Stolaroff *et al.*, 2008).

En solución salina ácida, el  $\text{CO}_2$  y el  $\text{CH}_4$  son menos soluble que en agua (Krabill *et al.*, 1969; Williams y Shih, 1989; Lyberatos y Skiadas, 1999; Patel y Madamwar, 2000; Hardik y Madamwar; 2000; Dewil *et al.*, 2007; Smith y Stöckle, 2008), esto influyó para que en el espacio de cabeza de las trampas de agua hubiera mayor ( $P \leq 0.05$ ) proporción de  $\text{CH}_4$  y menor ( $P \leq 0.05$ ) de  $\text{CO}_2$  con respecto a las trampas de solución salina ácida.

La diferencia entre el desplazamiento de las trampas de agua y trampas de solución salina ácida en los biodigestores con alfalfa fue 35.95 % (65 mL), y en los biodigestores sin alfalfa fue 34.83 % (20.67 mL). Esta diferencia equivale a la cantidad de  $\text{CO}_2$  disuelta en las trampas de agua que no se disolvió en las trampas de solución salina ácida. Considerado esto, se calculó que en los biodigestores donde se agregó alfalfa, la producción promedio de  $\text{CO}_2$  y  $\text{CH}_4$  fue 113.67 mL (2.16 mol) y 39.33 mL (0.17 mol), en cambio en los biodigestores que tenían sólo medio GCAFR se produjo solamente 47.62 mL (0.90 mol) de  $\text{CO}_2$  y 28 mL (0.06 mol) de  $\text{CH}_4$ .

Considerando la temperatura en las trampas de 25 °C y 1 atm de presión, y los índices de solubilidad para el  $\text{CO}_2$  y  $\text{CH}_4$  de  $3.4 \times 10^{-2}$  y  $1.4 \times 10^{-3} \text{ mol atm}^{-1} \text{ L}^{-1}$  (Sander, 1999) se calculó que la cantidad de  $\text{CO}_2$  y  $\text{CH}_4$  disueltos en solución acuosa fue  $2.39 \times 10^{-3}$  y  $7.01 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  en las trampas de gas con biodigestores con alfalfa, y  $2.51 \times 10^{-2}$  y  $6.67 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  en las trampas de gas con biodigestores sin alfalfa.



## 7.2 Experimento II

### 7.2.1 Desplazamiento en las trampas de gas de los tratamientos

El desplazamiento en las trampas de NaOH durante el experimento dos (Cuadro 8) siguió la misma tendencia y no hubo diferencias ( $P>0.05$ ) entre los tratamientos. El desplazamiento promedio en las trampas después de 72 h fue  $26.74 \pm 0.55$  mL.

Cuadro 8. Desplazamiento (mL) acumulado en trampas de NaOH del experimento II.

Tratamientos	Tiempo de incubación (h)					
	0	6	12	24	48	72
Testigo	0.22 <sup>a</sup>	2.78 <sup>a</sup>	10.78 <sup>a</sup>	13.95 <sup>a</sup>	24.66 <sup>a</sup>	27.38 <sup>a</sup>
T1: Yea Sacc	0.88 <sup>a</sup>	3.78 <sup>a</sup>	12.33 <sup>a</sup>	16.99 <sup>a</sup>	24.99 <sup>a</sup>	26.82 <sup>a</sup>
T2: Procreatin 7	0.77 <sup>a</sup>	4.11 <sup>a</sup>	12.78 <sup>a</sup>	16.89 <sup>a</sup>	24.88 <sup>a</sup>	26.71 <sup>a</sup>
T3: Diamond V XP	0.88 <sup>a</sup>	3.66 <sup>a</sup>	12.00 <sup>a</sup>	16.44 <sup>a</sup>	24.43 <sup>a</sup>	26.04 <sup>a</sup>
EEM	0.276	0.76	1.343	1.684	1.269	1.188

Tratamientos: Testigo= 45 mL de medio GCAFR + 1 g de alfalfa molida + 5 ml de fluido ruminal, T1; Testigo + 2 mg Yea Sacc<sup>®</sup>, T2; Testigo + 5 mg Procreatin 7<sup>®</sup>, T3; testigo + 10 mg Diamond V XP<sup>®</sup>.

<sup>a</sup>; Medias con distintas literales en una misma columna son diferentes ( $P\leq 0.05$ ).

EEM; error estándar de la media.

En contraste con este resultado Lila *et al.* (2004) reporta que *in vitro* usando como sustrato almidón de maíz, almidón de papa y heno de pasto sudan, con fluido ruminal como inoculo, la producción de biogás aumentó ( $P>0.05$ ) en forma lineal al

agregar dosis de 0 a 1.3 g L<sup>-1</sup> *S. cerevisiae*. Sin embargo, estos investigadores usaron una cepa experimental de *S. cerevisiae* y en cambio en el presente experimento se usaron productos comerciales a base de *S. cerevisiae*.

### 7.2.2. Producción de CH<sub>4</sub>, pH y concentración de bacterias en los tratamientos

En el pH y concentración de bacterias (Cuadro 9) no hubo diferencias en los tratamientos ( $P>0.05$ ). El pH promedio fue 6.44, lo cual indica que el medio de cultivo mantuvo su capacidad amortiguadora (Kohn y Dunlap, 1998) permitiendo de esta forma la actividad de las bacterias celulolíticas y metanogénicas (Russell, 1998).

Cuadro 9. Producción de CH<sub>4</sub>, pH y concentración de bacterias en el experimento II.

Tratamiento	CH <sub>4</sub> (mol)	pH	Bacterias (10 <sup>10</sup> ml <sup>-1</sup> )
Testigo	0.621 <sup>a</sup>	6.31 <sup>a</sup>	6.13 <sup>a</sup>
T1: Yea Sacc	0.607 <sup>a</sup>	6.48 <sup>a</sup>	4.84 <sup>a</sup>
T2: Procreatin 7	0.660 <sup>a</sup>	6.49 <sup>a</sup>	4.22 <sup>a</sup>
T3: Diamond V XP	0.649 <sup>a</sup>	6.48 <sup>a</sup>	3.24 <sup>a</sup>
EEM	0.082	0.069	0.22

CH<sub>4</sub>; se usó la ley de los gases ideales, el volumen de CH<sub>4</sub> fue equivalente al desplazamiento en trampas, la presión y temperatura fue 0.97 atm y 25 °C. Los valores se ajustaron sumando la cantidad de CH<sub>4</sub> disuelto en solución acuosa (Sander, 1999).

<sup>a</sup>; medias con distintas literales en una misma columna son diferentes ( $P\leq 0.05$ ).

EEM; error estándar de la media.

En la concentración de bacterias totales los resultados obtenidos no coinciden con lo que reportan varios investigadores (Offer, 1990; Martin y Nisbet, 1992; Dawson y Girad, 1997; Chaucheyras y Fonty, 2001; Lila *et al.*, 2004) quienes encontraron que *S. cerevisiae* favorece el desarrollo de las bacterias del rumen. Algunos factores que pudieron influir para este resultado son, las cepas y la dosis de *S. cerevisiae* usadas para elaborar los aditivos. Al respecto Newbold *et al.* (1995b) reporta que en un experimento *in vitro* con cinco cepas de levaduras, sólo tres estimularon ( $P \leq 0.05$ ) el crecimiento de bacterias ruminales. En lo que se refiere a la dosis, Lila *et al.* (2004) reporta que aplicando cuatro dosis de *S. cerevisiae* (0.33, 0.66, 0.99 y 1.32 g L<sup>-1</sup>) aumento ( $P \leq 0.05$ ) linealmente la concentración de bacterias conforme la dosis de *S. cerevisiae* se incrementó. Sin embargo, la dosis que estos investigadores emplearon fue hasta seis veces mayor a la usada en el presente experimento.

En la producción de CH<sub>4</sub> después de 72 h de incubación, no hubo diferencia ( $P > 0.05$ ) en los tratamientos. A este respecto, los resultados que se publican no son consistentes; Lynch y Martin (2002) coinciden y reportan que usando alfalfa y pasto bermuda y dos cepas de *S. cerevisiae* con dosis de 0.35 y 0.73 g L<sup>-1</sup> no hay diferencias ( $P > 0.05$ ) en la producción de CH<sub>4</sub>. Sin embargo, Sullivan y Martin (1999) previamente reportaron que usando alfalfa como sustrato y dosis de *S. cerevisiae* de 0 a 0.73 g L<sup>-1</sup>, la producción de CH<sub>4</sub> aumentó ( $P \leq 0.05$ ) hasta 33 %. En cambio Lila *et al.* (2004) usando tres dosis (0.66, 0.99 y 1.32 g L<sup>-1</sup>) de una misma cepa de *S. cerevisiae* con heno de pasto sudan como sustrato encontraron que la producción de CH<sub>4</sub> disminuyó ( $P \leq 0.05$ ) hasta 9.7 %.

### 7.2.3. Concentración de AGV y N-NH<sub>3</sub> en los tratamientos

En la variable N-NH<sub>3</sub> (Cuadro 10) no hubo diferencia ( $P>0.05$ ) entre los tratamientos, por lo que *S. cerevisiae* no favoreció la degradación de la proteína de la alfalfa. A pesar de esto numéricamente el tratamiento testigo presentó concentración de N-NH<sub>3</sub> y bacterias totales ligeramente mayor a los demás tratamientos. Este resultado coincide con lo que reporta Sullivan y Martin (1999), y Lila *et al.* (2004) quienes usando almidón de maíz, almidón de papa, alfalfa y pasto bermuda en combinación con diferentes dosis de *S. cerevisiae* no encontraron diferencias en la producción de N-NH<sub>3</sub> después de 24 h de incubación.

Cuadro 10. Concentración de AGV y N-NH<sub>3</sub> en el experimento II.

Tratamientos	AGV (mmol L <sup>-1</sup> )				NH <sub>3</sub> (mg dL <sup>-1</sup> )
	Total	Acético	Propiónico	Butírico	
Testigo	173.35 <sup>a</sup>	108.17 <sup>ab</sup>	37.57 <sup>a</sup>	27.62 <sup>a</sup>	93.12 <sup>a</sup>
T1: Yea Sacc	175.92 <sup>a</sup>	110.73 <sup>a</sup>	37.70 <sup>a</sup>	27.49 <sup>a</sup>	86.06 <sup>a</sup>
T2: Procreatin 7	173.76 <sup>a</sup>	108.28 <sup>ab</sup>	37.86 <sup>a</sup>	27.62 <sup>a</sup>	86.41 <sup>a</sup>
T3: Diamond V XP	171.09 <sup>a</sup>	105.82 <sup>b</sup>	37.04 <sup>a</sup>	28.23 <sup>a</sup>	88.04 <sup>a</sup>
EEM	2.557	1.448	0.871	0.716	3.49

<sup>a,b</sup>; medias con distintas literales en una misma columna son diferentes ( $P\leq 0.05$ )

EEM; error estándar de la media.

En la concentración de AGV, no hubo diferencias ( $P>0.05$ ) entre los tratamientos para la producción total y la concentración de ácido propiónico y butírico. Sin embargo,

en la concentración de ácido acético el tratamiento con Diamond VXP® fue menor ( $P \leq 0.05$ ) al tratamiento con Yea Sacc® pero no fue diferente ( $P > 0.05$ ) a los demás tratamientos.

Este resultado coincide con algunos autores (Lynch y Martin 2002; Miller-Webster *et al.*, 2002; Bauchemin *et al.*, 2003; Lila *et al.*, 2004) quienes reportan que *S. cerevisiae* no favoreció la producción de AGV cuando se utilizaron sólo forrajes como sustrato. Sin embargo, cuando se emplean carbohidratos de rápida fermentación con adición de *S. cerevisiae* se reporta un efecto ( $P \leq 0.05$ ) positivo sobre la concentración molar de ácido propiónico (Newbold *et al.*, 1995b; Callaway y Martin, 1997; Sullivan y Martin, 1999; Miller-Webster *et al.*, 2002; Lila *et al.*, 2004), lo cual podría deberse a la población de microorganismo que se desarrollan con este tipo de sustrato y no a la adición de *S. cerevisiae*.

### 7.3. Experimento III

#### 7.3.1. Desplazamiento en trampas de solución salina ácida del primer bloque

El desplazamiento en las trampas de solución salina ácida (Cuadro 11) fue mayor ( $P \leq 0.05$ ) en los tratamientos con 22 y 45 % de fumarato. En los tratamientos testigo, con 67 y 90 % de fumarato no hubo diferencias ( $P > 0.05$ ), por lo cual las dosis más altas de fumarato no favorecieron la producción de biogás.

Cuadro 11. Desplazamiento (mL) en las trampas de solución salina del experimento III.

Tratamientos (% fumarato)	Tiempo de incubación (h)					
	0	6	12	24	48	72
Testigo	14.67 <sup>a</sup>	50.00 <sup>a</sup>	80.67 <sup>a</sup>	128.33 <sup>b</sup>	152.67 <sup>b</sup>	187.67 <sup>b</sup>
T1 (22)	17.33 <sup>a</sup>	67.67 <sup>a</sup>	105.67 <sup>a</sup>	<b>177.33<sup>ab</sup></b>	<b>214.33<sup>a</sup></b>	<b>236.33<sup>a</sup></b>
T2 (45)	17.00 <sup>a</sup>	57.33 <sup>a</sup>	103.33 <sup>a</sup>	<b>184.00<sup>a</sup></b>	<b>228.67<sup>a</sup></b>	<b>261.00<sup>a</sup></b>
T3 (67)	13.67 <sup>a</sup>	52.67 <sup>a</sup>	95.67 <sup>a</sup>	132.00 <sup>b</sup>	141.67 <sup>b</sup>	166.00 <sup>b</sup>
T4 (90)	13.33 <sup>a</sup>	42.33 <sup>a</sup>	85.00 <sup>a</sup>	134.33 <sup>b</sup>	157.33 <sup>b</sup>	165.00 <sup>b</sup>
EE	13.516	13.516	13.516	13.516	13.516	13.516

Tratamientos: Testigo= 45 mL de medio GCAFR + 1 g de alfalfa + 5 mL de fluido ruminal, T1; Testigo + 0.22 g de fumarato, T2; Testigo + 0.45 g de fumarato, T3; Testigo + 0.67 g de fumarato, T4; Testigo + 0.90 g de fumarato.

<sup>a, b</sup>; medias con diferentes literales en una columna son diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

EE; Error estándar de la media.

Este resultado es diferente de lo que reporta Carro y Ranilla (2003), quienes no observaron diferencia ( $P>0.05$ ) en producción de biogás con dosis de 0 a 10% de fumarato usando como sustrato maíz, trigo, sorgo y canola. Sin embargo, el periodo de incubación que usaron estos investigadores fue de sólo 17 h y las dosis fueron menores a las usadas en el presente experimento.

### 7.3.2. Desplazamiento en las trampas de NaOH del segundo bloque

En el desplazamiento de las trampas de NaOH (Cuadro 12), el tratamiento testigo fue el mayor ( $P\leq 0.05$ ), y el menor ( $P\leq 0.05$ ) desplazamiento fue en los tratamientos con 67 y 90 % de fumarato.

Cuadro 12. Desplazamiento (mL) en trampas de NaOH del experimento III.

Tratamiento (% fumarato)	Tiempo de incubación (h)					
	0	6	12	24	48	72
Testigo	2.00 <sup>a</sup>	11.33 <sup>a</sup>	18.67 <sup>a</sup>	32.33 <sup>a</sup>	37.00 <sup>a</sup>	<b>47.67<sup>a</sup></b>
T1 (22)	2.00 <sup>a</sup>	5.33 <sup>b</sup>	11.33 <sup>b</sup>	16.67 <sup>b</sup>	20.00 <sup>b</sup>	23.67 <sup>b</sup>
T2 (45)	2.33 <sup>a</sup>	5.00 <sup>b</sup>	10.00 <sup>b</sup>	17.33 <sup>b</sup>	19.33 <sup>b</sup>	21.67 <sup>bc</sup>
T3 (67)	2.33 <sup>a</sup>	5.67 <sup>b</sup>	11.00 <sup>b</sup>	16.00 <sup>b</sup>	<b>17.33<sup>b</sup></b>	<b>18.33<sup>c</sup></b>
T4 (90)	2.33 <sup>a</sup>	7.33 <sup>ab</sup>	10.67 <sup>b</sup>	14.33 <sup>b</sup>	<b>17.67<sup>b</sup></b>	<b>18.33<sup>c</sup></b>
EE	2.258	2.258	2.258	2.258	2.258	2.258

<sup>a, b, c</sup>; medias con diferentes literales en una columna son diferentes ( $P\leq 0.05$ ).

EE; Error estándar de la media.

El desplazamiento en el testigo (tratamiento sin fumarato) fue el doble del que se observó en los tratamientos con 22 y 45 % de fumarato. El coeficiente de correlación entre las dosis de fumarato en los tratamientos y el desplazamiento en las trampas de NaOH fue significativo ( $P \leq 0.05$ ) con un valor de -0.799, por lo cual al aumentar la dosis de fumarato el desplazamiento trampas disminuyó proporcionalmente.

Carro y Ranilla (2003) coinciden con este resultado, y reportan que con dosis de 4.4 a 10 % de fumarato de sodio usando maíz, trigo, sorgo y canola como sustrato disminuyó ( $P \leq 0.05$ ) linealmente la producción de CH<sub>4</sub>. Al respecto Ungerfeld *et al.* (2007) reporta que *in vitro*, usando dosis de 3.3 a 45 % de fumarato en alimento para ovinos, la producción de CH<sub>4</sub> disminuyó ( $P \leq 0.05$ ) 0.037  $\mu\text{mol } \mu\text{mol}^{-1}$  de fumarato adicionado.

### **7.3.3. Producción de CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> en los tratamientos**

En el testigo (tratamiento sin fumarato) la producción de CH<sub>4</sub> (Cuadro 13) fue mayor ( $P \leq 0.05$ ) que en los demás tratamientos. La diferencia entre la producción promedio de CH<sub>4</sub> de los tratamientos con 22, 45, 67 y 90 % de fumarato, y el tratamiento sin fumarato fue 0.41 mmol, lo cual indica que reducción en la producción de CH<sub>4</sub> fue hasta de 0.066 mmol mmol<sup>-1</sup> de fumarato adicionado.

Al respecto Ungerfeld *et al.* (2007) mencionan que en el rumen los microorganismos con capacidad de reducir el fumarato pueden competir con las bacterias metanogénicas por el H<sub>2</sub> en función de la cantidad de fumarato disponible.



Cuadro 13. Desplazamiento en trampas de gas y producción de CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> en el experimento III.

Tratamiento (% fumarato)	Desplazamiento en trampas (mL)		CO <sub>2</sub> (mmol)	CH <sub>4</sub> (mmol)
	NaOH	Salina-acida		
Testigo	47.67 <sup>a</sup>	187.67 <sup>b</sup>	4.153 <sup>b</sup>	<b>0.492<sup>a</sup></b>
T1 (22)	23.67 <sup>b</sup>	<b>236.33<sup>a</sup></b>	<b>7.585<sup>a</sup></b>	0.095 <sup>b</sup>
T2 (45)	21.67 <sup>bc</sup>	<b>261.00<sup>a</sup></b>	<b>8.697<sup>a</sup></b>	0.072 <sup>b</sup>
T3 (67)	<b>18.33<sup>c</sup></b>	166.00 <sup>b</sup>	5.206 <sup>b</sup>	0.081 <sup>b</sup>
T4 (90)	<b>18.33<sup>c</sup></b>	165.00 <sup>b</sup>	5.167 <sup>b</sup>	0.081 <sup>b</sup>
EE	2.258	13.516	0.801	0.053

CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub>: se uso la ley de los gases ideales, la presión del biogás fue 0.97 atm, la temperatura 25 °C y sumó la fracción disuelta en solución acuosa (Sander, 1999).

<sup>a, b</sup>; medias con diferentes literales en una columna son diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

EE; Error estándar de la media.

La producción de CO<sub>2</sub> en los tratamientos con 22 y 45 % de fumarato fue mayor ( $P \leq 0.05$ ) que en los demás tratamientos, esto no se esperaba ya que en el tratamiento sin fumarato fue donde se observó el mayor ( $P \leq 0.05$ ) desplazamiento. Sin embargo, para disminuir 25 % la producción de CH<sub>4</sub> en el rumen, teóricamente se requiere 1 mol de fumarato porque la reducción de fumarato en propionato requiere un H<sub>2</sub> y se necesitan 4 H<sub>2</sub> para producir un CH<sub>4</sub> ( $\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$ ). De esta forma, al aumentar la reducción de fumarato la cantidad de CO<sub>2</sub> libre en el medio debe aumentar también. En este sentido Newbold *et al.* (2005) mencionan que teóricamente para que

una vaca que produce 500 L d<sup>-1</sup> de CH<sub>4</sub> disminuya 10 % la producción de este gas, se requiere que ingiera un mínimo de 1.4 kg d<sup>-1</sup> de fumarato de sodio (8.92 mol).

#### 7.3.4. Concentración de bacterias, pH, N-NH<sub>3</sub> y degradación de MS en los tratamientos

En las variables degradación de MS, pH, N-NH<sub>3</sub> y concentración de bacterias totales no hubo interacción ( $P > 0.05$ ) entre tratamientos y bloques. Por lo tanto, los tratamientos siguieron la misma tendencia en cada bloque, y solamente se observaron diferencias ( $P \leq 0.05$ ) entre los tratamientos (Cuadro 14).

Cuadro 14. Concentración de bacterias, pH y N-NH<sub>3</sub> y degradación de MS en el experimento III.

Tratamiento (% fumarato)	pH	Bacterias (10 <sup>10</sup> mL <sup>-1</sup> )	N-NH <sub>3</sub> (mg dL <sup>-1</sup> )	Degradación de MS (%)
Testigo	6.71 <sup>a</sup>	2.074 <sup>a</sup>	42.84 <sup>b</sup>	58.53 <sup>b</sup>
T1 (22)	6.72 <sup>a</sup>	2.050 <sup>a</sup>	<b>47.41<sup>a</sup></b>	<b>63.33<sup>a</sup></b>
T2 (45)	6.75 <sup>a</sup>	1.755 <sup>a</sup>	<b>49.78<sup>a</sup></b>	<b>63.98<sup>a</sup></b>
T3 (67)	6.71 <sup>a</sup>	1.719 <sup>a</sup>	41.69 <sup>b</sup>	56.55 <sup>bc</sup>
T4 (90)	6.69 <sup>a</sup>	1.569 <sup>a</sup>	41.98 <sup>b</sup>	54.29 <sup>c</sup>
EE	0.150	0.139	1.512	1.577

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

EE; Error estándar de la media.

En la variable degradación de MS los tratamientos con 22 y 45 % de fumarato fueron mayores ( $P \leq 0.05$ ) a los tratamientos con 0, 67 y 90 % de fumarato. En el pH de los biodigestores no hubo diferencia ( $P > 0.05$ ) en los tratamientos y se mantuvo en 6.7, en la variable N-NH<sub>3</sub> los tratamientos con 22 y 45 % de fumarato fueron los mayores ( $P \leq 0.05$ ), y en la concentración de bacterias no hubo diferencia ( $P > 0.05$ ) en los tratamientos.

Sólo en los tratamientos con 22 y 47 % de fumarato fue mayor ( $P \leq 0.05$ ) la degradación de MS y concentración de N-NH<sub>3</sub>. Este resultado contrasta con lo que reportan otros investigadores (McGinn *et al.*, 2004; Beauchemin y McGinn, 2006) que en experimentos con novillos alimentados con dietas altas en forraje (75 %) y dosis de ácido fumarico de 180 y 175 g d<sup>-1</sup> no encontraron diferencia ( $P > 0.05$ ) en la concentración de N-NH<sub>3</sub> y digestibilidad de MS.

A éste respecto Carro y Ranilla (2003) reportan que *in vitro* usando maíz, cebada, trigo, sorgo y canola con dosis de fumarato de sodio de 4.4 a 10 %, no aumentó ( $P > 0.05$ ) la concentración de N-NH<sub>3</sub> y la degradación de MS. Sin embargo, García-Martínez *et al.* (2005) reporta que *in vitro* usando fluido ruminal de ovinos alimentados con dietas con 80, 50 y 20 % de forrajes, al usar dosis de 4.4 y 8.5 % de fumarato se incrementó ( $P \leq 0.05$ ) la digestibilidad de la MS pero disminuyó ( $P \leq 0.01$ ) la concentración de N-NH<sub>3</sub>.

Estos resultados no coinciden con los del presente experimento. Una posible explicación al aumento en la degradación de la MS y concentración de N-NH<sub>3</sub> podría

ser las dosis de fumarato usada en el experimento. Sin embargo, sólo las dosis de 22 y 45 % de fumarato favorecieron para este efecto.

### 7.3.5. Concentración de AGV en los tratamientos

En la concentración total de AGV, acético, propiónico, butírico y relación acético: propiónico no hubo diferencia ( $P>0.05$ ) entre bloques y tampoco interacción ( $P>0.05$ ) entre tratamientos y bloques, por lo tanto los tratamientos siguieron la misma tendencia dentro de cada bloque y solo se observaron diferencias ( $P\leq 0.05$ ) entre los tratamientos (Cuadro 15).

Cuadro 15. Concentración de AGV en los tratamientos del experimento III.

Tratamiento (% fumarato)	Concentración de AGV (mmol L <sup>-1</sup> )				Acético: propiónico
	Total	Acético	Propiónico	Butírico	
Testigo	129.88 <sup>e</sup>	74.00 <sup>d</sup>	39.17 <sup>d</sup>	13.7 <sup>a</sup>	1.89 <sup>a</sup>
T1 (22)	169.17 <sup>d</sup>	85.67 <sup>c</sup>	70.85 <sup>c</sup>	12.65 <sup>ab</sup>	1.21 <sup>b</sup>
T2 (45)	201.44 <sup>c</sup>	98.74 <sup>b</sup>	89.83 <sup>b</sup>	12.87 <sup>ab</sup>	1.10 <sup>c</sup>
T3 (67)	220.52 <sup>b</sup>	102.19 <sup>b</sup>	<b>106.54<sup>a</sup></b>	11.79 <sup>b</sup>	<b>0.97<sup>d</sup></b>
T4 (90)	<b>227.57<sup>a</sup></b>	<b>106.36<sup>a</sup></b>	<b>109.59<sup>a</sup></b>	11.63 <sup>b</sup>	<b>0.96<sup>d</sup></b>
EE	3.163	2.108	2.573	0.765	0.057
Correlación	0.961	0.953	0.958	-0.676	-0.850

Correlación: coeficiente de correlación entre la dosis de fumarato y los AGV.

<sup>a, b, c</sup>; medias con diferentes literales en una columna son diferentes ( $P\leq 0.05$ ).

EE; Error estándar de la media.

La producción total de AGV y el acético fueron mayores ( $P \leq 0.05$ ) en el tratamiento con 90 % de fumarato seguido de los tratamientos con 67, 45 y 22 %. En el propiónico los tratamientos con 67 y 90 % tuvieron la mayor ( $P \leq 0.05$ ) concentración seguidos de los tratamientos con 45 y 22 %. En el butírico el testigo (tratamiento sin fumarato) fue el mayor ( $P \leq 0.05$ ), y la relación acético: propiónico en los tratamientos con 67 y 90 % fue mayor ( $P \leq 0.05$ ) que los tratamientos con 45 y 22 %.

En general la adición de fumarato favoreció la producción total de AGV, acetato y propionato con respecto al testigo (tratamiento sin fumarato); mientras que la producción de butírico sólo aumentó en los tratamientos con la concentración más alta de fumarato (67 y 90 %).

Algunos investigadores (Carro y Ranilla 2003; Ungerfeld *et al.*, 2007) coinciden en reportar que al incrementar la dosis de fumarato aumenta ( $P \leq 0.05$ ) la concentración molar de ácido propiónico y disminuye ( $P \leq 0.05$ ) la relación acético/propiónico. A este respecto, Russell y Wallace (1997) describen que en la ruta para producción de ácido propiónico el fumarato actúa como aceptor de electrones ( $2H$ ) en la reducción de succinato a propionato. Sin embargo, otros autores (Asanuma *et al.*, 1999; Asanuma y Hino, 2000) reportan que las bacterias ruminales además de usar el fumarato en la producción de propionato, pueden usar este compuesto para la formación de malato y producir ácido acético (Figura 4).

En el presente experimento, no se esperaba que aumentará ( $P \leq 0.05$ ) la concentración molar de acético, porque teóricamente 1 mol de fumarato debería aumentar la concentración molar de propionato y disminuir la producción de  $CH_4$ . Al

respecto Ungerfeld *et al.* (2007) reporta que *in vitro* con dosis de 3.3 a 45 % de fumarato, la máxima conversión en propionato fue  $0.68 \mu\text{mol } \mu\text{mol}^{-1}$  de fumarato adicionado. Sin embargo, por cada  $\mu\text{mol}$  de fumarato también se incrementó ( $P \leq 0.05$ ) la producción de acetato en  $0.020 \mu\text{mol}$ . Esto coincide con el presente experimento, y por cada  $\text{mmol}$  de fumarato en promedio aumentó la concentración de ácido acético  $0.26 \text{ mmol}$ .

## 8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Con base en los resultados obtenidos en el experimento uno se concluye que; en la fermentación *in vitro* de alfalfa y medio GCAFR, cuando se usan biodigestores acoplados a trampas de gas con solución salina ácida y solución de NaOH, se puede medir la producción de biogás, y contenido de CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub>. Sin embargo, no se recomienda usar trampas de gas con agua como solución interna, porque se solubiliza de 35 a 36 % del total de CO<sub>2</sub> producido, lo cual genera evaluaciones erróneas de la producción de gases.

En las condiciones experimentales descritas para el experimento dos y con base en los resultados obtenidos se concluye que; en la fermentación *in vitro* de alfalfa Yea sacc®, Procreatin 7® y Diamond VXP® (elaboran a base de *S. cerevisiae*) no tienen efecto en las variables concentración de AGV, bacterias totales, N-NH<sub>3</sub>, pH y producción de CH<sub>4</sub>. Por lo tanto, no se recomienda su uso para disminuir metanogénesis en rumiantes alimentados con forrajes.

De acuerdo con los resultados del tercer experimento y en las condiciones descritas se concluye que; la adición de fumarato de sodio en la fermentación *in vitro* de alfalfa disminuyó la producción de CH<sub>4</sub>, aumentó la concentración molar de ácido propiónico, acético y N-NH<sub>3</sub>, disminuyó la relación acético/propiónico, y favoreció la degradación de MS sin afectar el pH y la concentración de bacterias totales. Por lo cual, el fumarato de sodio no tiene efectos tóxicos para los microorganismos que habitan en el rumen y se recomienda su uso para disminuir la metanogénesis en

rumiantes alimentados con forrajes, previo a un estudio *in vivo*, que compruebe los resultados obtenidos en esta investigación.



## 9. LITERATURA CITADA

- Angelidaki, I., L. Ellegaard, B. K. Ahring. 1998. A comprehensive model of anaerobic bioconversion of complex substrates to biogas. *Biotech. Bioeng.* 63(3): 363-372.
- Arderson, R. C., M. A. Rasmussen. 1998. Use of a novel nitrotoxin-metabolizing bacterium to reduce ruminal methane production. *Bioresource Technol.* 64: 89-95.
- Asanuma, N., M. Iwamoto, T. Hino. 1998. Formate metabolism by ruminal microorganisms in relation to methanogenesis. *Anim. Sci. Technol.* 69: 576-584.
- Asanuma, N., T. Hino. 2000. Activity and properties of fumarate reductase in ruminal bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 46: 119-125.
- Baker, S. K., N. L. Chamberlain, A. Kicic, L. Klein, A. Munyard. 1998. How many rumen methanogens are there? *Anim. Prod. Aust.* 22: 350-359
- Baker, S. K. 1999. Rumen methanogens, and inhibition of methanogenesis. *Aust. J. Agric. Res.* 50: 1293-1298.
- Banerjee, R., S. W. Ragsdale. 2003. The many faces of vitamin B12: catalysis by cobalamin-dependent enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* 72: 209-247.
- Beever, D. E. 1993. Rumen function. In: Forbes, J. M. and J. France (editors). *Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism.* CAB International, Wallingford, UK. Pp: 187-215.
- Beuvink, J. M. W., S. F. Spoeltra. 1992. Interactions between substrate, fermentation end-products, buffering system and gas production upon fermentation of different

- carbohydrates by mixed rumen microorganism *in vitro*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37: 505-509.
- Beauchemin, K. A., W. Z. Yang, D. P. Morgavit, G. R. Ghorbani, W. Kautz, J. A. Z. Leedle. 2003. Effects of bacterial direct-fed microbials and yeast on site and extent of digestion, blood chemistry and subclinical ruminal acidosis in feedlot cattle. J. Anim. Sci. 81: 1628-1640.
- Beauchemin, K. A., S. M. McGinn. 2006. Methane emissions from effects of fumaric acid, essential oil, and canola. J. Anim. Sci. 84: 1489-1496.
- Blümmel, M., E. R. Ørskov. 1993. Comparison of *in vitro* gas production and nylon bag degradability of roughages in predicting feed intake in cattle. Anim. Feed, Sci. Technol. 40: 109-119.
- Callaway, E. S., S. A. Martin. 1997. Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose. J. Dairy Sci. 80: 2035-2044.
- Carro, M. D. and M. J. Ranilla. 2003. Influence of different concentrations of disodium fumarate on methane production and fermentation of concentrate feeds by rumen micro-organisms *in vitro*. Br. J. Nutr. 90: 617-623.
- Calsamiglia, S., M. Buquet, P. W. Cardozo, L. Castillejos, A. Ferret. 2007. Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. J. Dairy Sci. 90: 2580-2595.
- CE. 2003. Health and Consumer protection European Commission. Registro comunitario de aditivos para alimentación animal de conformidad con el reglamento (CE) No 1831/2003. Dirección de salud y bienestar de los animales,

bienestar y alimentación animal. Disponible en:

<http://ec.europa.eu/comm/food/food/animalnutrition/feedadditives/registeradditives> (consultada el 16 de septiembre de 2009).

Chaucheyras, F., G. Fonty, G. Bertin, P. Gouet. 1995. In vitro H<sub>2</sub> utilization by ruminal acetogenic bacteria cultivated alone or in association with an archaea methanogen is stimulated by a probiotic strain of *Sacharomyces cerevisiae*. Appl. Environ. Microbiol. 61: 3466-3467.

Chaucheyras, F., G. Fonty. 2001. Establishment of cellulolytic bacteria and development of fermentative activities in the rumen of gnotobiotically-reared lambs receiving the microbial additives *Sacharomyces cerevisiae* CNCM I-1077. Reprod. Nutr. Dev. 41: 57-68.

Chia-Chang, L., C. Bor-Chi. 2007. Carbon dioxide absorption into NaOH solution in a cross-flow rotating packer bed. J. Ind. Chem. 13(7): 1083-1090.

Christophersen, T. C., A-D. G. Wright, P. E. Vercoe. 2007. In vitro methane emission and acetate: propionate ratio are decreased when artificial simulation on the rumen wall is combined with increasing grain diets in sheep. J. Anim. Sci. 86: 384-389.

Cobos, P. M.A. and M. T. Yokoyama. 1995. *Clostridium paratrificum* var. *ruminantium*: Colonization and degradation of shrimp carapaces in vitro observed by scanning electron microscopy. In Wallace R. J. and Lahlou-Kassi. Rumen ecology research planning. Proceedings of a Workshop held at International Livestock Research Institute (ILRI), Addis Ababa, Ethiopia. 151-161.

- Cobos, P. M. A. 2007. Interacción entre microorganismos ruminales. *In: Microbiología agrícola hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico y planta-microorganismo*. R. Ferrera-Cerrato, A. Alarcon (Eds.) Trillas, México. p: 498-516.
- Cone, J. W., A. H. Gelder, G. J. Van Visscher, 1996. Influence of rumen fluid and substrate concentration on fermentation kinetics measure with a fully automated time released gas production apparatus. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 61: 113-128.
- Crutzen, J. P., 1991. Methane's links & sources. *Nature.* 350: 380-381.
- Dawson, K., I. D. Girard. 1997. Biochemical and physiological basis for stimulation effects of yeast preparations on rumen bacteria. *In: Lyons, T. P., K. A. Jacques (ed). Biotechnology in the Feed Industry.* Alltech Technical Publications, Nicholasville, K.Y. Pp: 293-304.
- Demeyer, D. I, M. K. Henderickx. 1967. Competitive inhibition of *in vitro* methane production by mixed rumen bacteria. *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 75: 157-159.
- Demeyer, D. I., V. Fievez. 2000. Ruminants and environment: methanogenesis. *Ann Zootech. INRA, EDP. Sci.* 49: 95-112.
- Deppenmeir, U., V. Müller, G. Gottschalk. 1996. Pathway of energy conservation in methanogenic archea. *Arch. Microbiol.* 165: 149-163.
- DeRamus, H. A., T. C. Clement, D. D. Giampaola, P. C. Dickinson. 2003. Methane emission of beff cattle on forages: efficiency of grazing management systems. *J. Environ. Qual.* 32: 269-277.
- Dewil, R., L. Appels, J. Baeyens, J. Degreve. 2007. Peroxidation enhances the biogas production in the anaerobic digestion of biosolid. *J. Hazard. Mat.* 146: 577-581.

- Dong, X., C. M. Plugge, A. J. M. Stams. 1994. Anaerobic degradation of propionate by a mesophilic acetogenic bacteria in coculture and triculture with different methanogenos. *App. Environm. Microbiol.* 2834-2838.
- D'Mello, F. P. J., 2000. *Farm animal metabolism and nutrition*. CABI publishing. NY, USA. Pp: 121-140.
- Ellis, L. J., E. Kebreab, N. E. Odongo, B. W. McBride, E. K. Okine, J. France. 2007. Prediction of methane production from dairy and beef cattle. *J. Dairy. Sci.* 90: 3456-3467.
- Erasmus, L. J., P. M. Botha, A. Kistner. 1992. Effect of yeast culture supplement on production, rumen fermentation, and duodenal nitrogen flow in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 75: 3056-3065.
- Eun, J. S., V. Feller, M. L. Gumpertz. 2004. Methane production by mixed ruminal cultures incubation indual-flow fermentors. *J. Dairy Sci.* 87:112-121.
- Finlay, B. J. T. Fenchel. 1993. Methanogens and other bacteria as symbionts of free-living anaerobic ciliates. *Symbiosis.* 14: 375-390.
- Fonty, G., K. Joblin, M. Chavarot, R. Roux, G. Naylor, F. Michallon. 2007. Establishment and development of ruminal hydrogenotrophs in methanogen-free lambs. *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (20): 6391-6403.
- France, J., M. S. Dhanoa, M. K Theodorou, S. J. Lister, D. R. Davies, D. Isac. 1993. A model to interpret gas accumulation profiles associated with *in vitro* degradation of ruminant feeds. *J. Theory. Biol.* 163: 99-111.
- García-López, M. P., L. Kung Jr., J. M. Odom. 1996. *In vitro* inhibition of microbial methane production by 9,10-antraquinone. *J. Anim. Sci.* 74: 22276-2284.

- Gaviria, A. M. L., A. P. Hernández, V. G. N. Moorillón, N. R. Seijas, H. M. P. Varaldo. 2003. Comparación de dos sistemas anaerobios acoplados para la biometanización de la fracción orgánica de residuos sólidos urbanos. *Interciencia*. 28 (8): 436-442.
- García-Martínez, R., M. J. Ranilla, M. L. Tejido, M. D. Carro. 2005. Effects of disodium fumarate on *in vitro* rumen microbial growth, methane production and fermentation of diets differing in their forage: concentrate ratio. *Br. J. Nutr.* 94(1): 71-77.
- Getachew, G., M. Blümmel, H. P. S. Makkar, K. Becker. 1998. *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 72: 261-281.
- Hanson, S. 1992. Distribution in nature of reduced one carbon compounds and microbes that utilize them. *In: Murrell J. C. Dalton H. (Eds), Methane and Methanol utilizers*, Plenum Press, New York. p 1-22.
- Hardik, P., D. Madamwar. 2000. Biomethanation of pH petrochemical wastewater using up-flow fixed-film anaerobic bioreactors. *World. J. Microb. Biotechnol.* 16: 69-75.
- Hegarty, R. S. 1999. Reducing rumen methane emissions through elimination of rumen protozoa. *Aust. J Agric.* 50: 1321-1327.
- Hindrichsen, I. K., H. R. Wettstein, A. Machmüller, C. R. Soliva, K. E. Bach Knudsen, M. Kreuzer. 2004. Effects of feed carbohydrates with contrasting properties on rumen fermentation and methane release *in vitro*. *Can. J. Anim. Sci.* 84: 265-276.

- Hungate, R. E. 1966. The rumen and its microbes. Academic Press, N. Y. 533p. *In*: Hobson, P. N. (editor). 1988. The rumen microbial ecosystem. Elsevier Applied Scienci. 527p.
- IPPC. 2006. Chapter 10. Emissions from livestock and manure management.(Autores) Hogmin Don (China), Joe Mangino (USA), T. A. McAllister (Canada), J. L. Hatfield (USA), D. E. Johnson (USA), K. R. Lassey (Nueva Zelanda), M. A. De Lima (Brazil), A. Romanovskaya (Rusia). disponible <http://www.ipcc-nggip.iges.or.jp/public/2006gl/pdf/4> (23 de junio de 2008)
- Jawed, M., V. Tare. 1999. Microbial composition assessment of anaerobic biomass through methanogenic activity tests. *Water SA*. 25(3): 345-350.
- Jeon, Y., N. Kim, W. Chun, S. Lim, C. Kim, B. Hur. 2006. A study of the kinetic characteristics of natural gas hydrate. *J. Ind. Eng. Chem*. 12(5): 733-738.
- Johnson, K. A., D. E. Johnson. 1995. Methane emission from cattle. *J. Anim. Sci*. 73: 2483-2492.
- Kinsman, R., F. D. Sauer, H. A. Jackson, M. S. Wolynetz. 1995. Methane and carbon dioxide emissions from cows in full lactation monitored over a six-month period. *J. Dairy Sci*. 78(12): 2760-2766.
- Krabill, L. F., W. S. Alhassan, L. D. Satter. 1969. Manipulation of the ruminal fermentation. II. Effect of sodium sulfite on bovine digestion and fermentation. *J. Dairy Sci*. 52(11): 1812-1816.
- Kohn R, A. and T. F. Dunlap. 1998. Calculation of buffering capacity of bicarbonate in the rumen and *in vitro*. *J. Anim. Sci*. 1998. 76:1702-1709.

- Kurihara, M., T. Magner, R. A. Hunter, G. J. McCrabb. 1999. Methane production and energy partition of cattle in the tropics. *Br. J. Nutr.* 81: 227-239.
- Lana, P. R., J. B. Russell, M. E. Van Amburgh. 1998. The role of pH in regulation ruminal methane and ammonia production. *J. Anim. Sci.* 76: 2190-2196.
- Lila, A. Z., N. Mohammed, T. Yasui, Y. Kurokawa, S. Kanda y H. Itabashi. 2004. Effect of a twin strain of *Saccharomyces cerevisiae* live cells on mixed ruminal microorganism fermentation *in vitro*. *J. Anim. Sci.* 82:1847-1854.
- Lila, Z. A., M. Nazimuddin, T. Tsuyoshi, T. Masahiko, Y. Takashi, K. Mitsunori, K. Shuhei, I. Hisao. 2006. Increase of ruminal fiber digestion by cellobiose and twin strain of *Saccharomyces cerevisiae* live cell *in vitro*. *J. Anim, Sci.* 77: 407-505.
- Lin, C., L. Raskin, D. A. Stahl. 1997. Microbial community structure in gastrointestinal tracts of domestic animals: comparative analysis using rRNA-targeted oligonucleotide probes. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 22: 281-294.
- Lin, C. C., B. C. Chen. 2007. Carbon dioxide absorption into NaOH solution in a cross-flow rotating packed bed. *J. Ind. Eng. Chem.* 13(7): 1083-1090.
- Littell, R. C., P. R. Henry, C. B. Ammerman. 1998. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. *J. Anim. Sci.* 76: 1216-1231.
- López, S., F. M. McIntosh, R. J. Wallace, C. J. Newbold. 1999. Effect of adding acetogenic bacteria on methane production by mixed rumen microorganisms. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 78: 1-9.
- Lyberatos, G., I. V. Skiadas. 1999. Modelling of anarobic digestion: a review. *Global Nest: The Int. J.* 1(2): 63-76.



- Lynch, H. A., S. A. Martin. 2002. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* culture and *Saccharomyces cerevisiae* live cells on in vitro mixed ruminal microorganism fermentation. J. Dairy sci. 85:2603-2608.
- MacCaughen, W. P., K. Wittenberg, D. Corrigan. 1997. Methane production by steers on pasture. Can. J. Anim. Sci. 77: 519-524.
- Madigan, M. T., J. M. Martiniko, J. Parker. 2002. Biología de los microorganismos. Editorial Pearson-Prentice Hall, 8a edición. Madrid, España. 986p.
- Marchain, U. 1992. Biogas processes for sustainable development. Bull.FAO Agric. Services, Rome. 95: 165-193.
- Martin, S. A., D. J. Nisbet. 1992. Effects of direct-fed microbials on rumen microbial fermentation. J. Dairy Sci. 75: 1736-1744.
- Martin, S. A. 1998. Manipulation of ruminal fermentation with organic acids.a review. J. Anim. Sci. 76: 3123-3132.
- McCullough, H. 1967. The determination of ammonia in whole blood by direct colorimetric method. Clin. Chem. 17:297-304.
- McAllister, T. A., E. K. Okine, G. W. Mathison G.W, K. J. Cheng. 1996. Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. Can. J. Anim. Sci., 76: 231 – 243.
- McGinn, M. S., T. K. Flesch, L. A. Harper, K. A. Beauchemin. 2006. An approach for measuring methane emission from whole farms. J. Environ. Qual. 35: 14-20.
- McGinn, M. S., K. A. Beauchemin, T. Coates, D. Colombatto. 2004. Methane emissions from beef cattle: Effects of monensin, sunflower oil, enzymes, yeast, and fumarico acid. J. Anim. Sci. 82: 3346-3356.

- Menke, K. H., L. Raab, A. Salewski, H. Steingass, D. Fritz, W. Schneider. 1979. The estimation of digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor *in vitro*. J. Agric. Sci. 93: 217-222.
- Menke, K. H., H. Steingass. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. Anim. Res Develop. 28: 7-55.
- Miller, T. L., M. J. Wollin, Z. Hongxue, M. P. Bryant. 1986. Characteristics of methanogens isolated from bovine rumen. Appl. Environm. Microbiol. 51(1): 201-202.
- Miller-Webster, T., W. H. Hoover, M. Holt, J. E. Nocek. 2002. Influence of yeast culture on ruminal microbial metabolism in continued culture. J. Dairy Sci. 85: 2009-2014.
- Moss, A. J., D. I. Givens. 2002. The effect of supplementing grass silage with soya bean meal on digestibility, *in Sacco* degradability rumen fermentation and methane production in sheep. Anim. Feed Sci. Technol. 97: 127-143.
- Moss, A. R., J. P. Jouany, J. Newbold. 2000. Methane production by ruminants its contribution to global warming. INRA, EDP Sciences, Ann. Zootech. 49:231-253.
- Mutsvangwa, T., I. E. Edwards, J. H. Topps, G. F. M. Paterson. 1992. The effect of dietary inclusion of yeast culture (Yea-Sacc) on patterns of rumen fermentation, food intake and growth of intensively fed bulls. Anim. Prod. 55:35-40.
- Nafikov, A. F., D. C. Beitz. 2007. Carbohydrate and lipid metabolism in farm animals. J. Nutr. 137: 702-705.

- Newbold, C. J., B. Lassalas, P. J. Jouany. 1995. The importance of methanogens associated with ciliates protozoa in ruminal methane production *in vitro*. Letters Appli.. Microbiol. 21: 230-234.
- Newbold, C. J., R. J. Wallace, X. B. Chen, F. M. McIntosh. 1995. Different strains of *Saccharomyces cerevisiae* differ in their effects on ruminal bacterial numbers in vitro and in sheep. J. Anim Sci. 73: 1811-1818.
- Newbold, C. J., S. López, N. Nelson, J. O. Ouda, R. J. Wallace, A. R. Moss. 2005. Propionate precursors and other metabolic intermediates as possible alternative electron acceptors to methanogenesis in ruminal fermentation *in vitro*. Br. J. Nutr. 94: 27-35.
- Nollet, L., L. Mbanzamihiago, D. Demeyer, W. Verstrate. 1998. Effect of addition of *Peptostreptococcus productus* 35244 on reductive acetogenesis in the ruminal ecosystem after inhibition of methanogenesis by cell-free supernatant of *Lactobacillus plantarum* 80. Anim. Feed. Sci. Technol. 41: 49-66.
- NRC, 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7<sup>th</sup> ed. National Academy Press. Washinton. D.C. p. 34-40.
- Offer, N. W. 1990. Maximising fiber digestion in the rumen: the role of the yeast culture. *In*: Lyons, T. P. (ed). Biotechnology in the Feed Industry. Alltech Technical Publications. Nicholasville, KY. p: 79-96.
- Patel, H., D. Madamwar. 2000. Biomethanation of low pH petrochemical wastewater using up-flow fixed-film anaerobic bioreactors. World. J. Microb. Biotechnol. 16: 69-75.

- Pell, A. N., P. Shofield. 1993. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. J. Dairy. Sci. 76: 1063-1073.
- Pinos, R. J. M, P. H. Robinson, M. E. Ortega, S. L. Berry, G. Mendoza, R. Barcena. 2008. Performance and rumen fermentation of dairy calves supplemented with *Sacharomyces cereviciae*1077 or *Saccharomyces boulardii*10979. Anim. Feed. Sci. Technol. 140: 223-232.
- Protocolo de Kyoto, 1997. Protocolo de Kyoto de la convención marco de las Naciones Unidas sobre el cambio climático. Versión en español, pp:1.31. Kyoto, Japón (Depositario: ONU). [http://unfccc.int/kyoto\\_protocol/items/2830.php](http://unfccc.int/kyoto_protocol/items/2830.php)
- Rafael, A. N., Donald C. B. 2007. Carbohydrate and lipid metabolism in farm animals. J Nutr. 137: 702-705.
- Raynaud, D., J. Chappellaz, J. M. Barnola, Y. S. Korotkevich, C. Lorius. 1988. Climatic and CH<sub>4</sub> cycle implications of glacial-interglacial CH<sub>4</sub> change in the vostock ice core. Nature. 333:655-657.
- Reid, C. R., J. M. Prausnitz. 1987. The properties of gases and liquids. 4th ed. McGraw-Hill. Boston, U.S.A. p. 125-134.
- Rusell, J. B., J. Wallace. 1997. Energy-yielding and energy consuming reactions. *In* The Rumen Microbial Ecosystem. Hobson P. N., C. S. Stewart. (ed) Blackie Academic and Professional, London U.K.. p: 246-269.
- Russell, J. B. 1998. The importance of pH in the regulation of ruminal acetate to propionate ratio and methane production *in vitro*. J. Dairy Sci. 81: 3222-3230.
- Rusell, J. B., H. J. Strobel. 1989. Effect of ionophores on ruminal fermentation: minireview. Appl. Environ. Microbiol. 55(1):1-6.

- Rusell, J. B., L. J. Richlik. 2001. Factors that alter rumen microbial ecology. *Science*. 292(5519): 1119-1122.
- Sander, R. 1999. Compilation of Henry's law constants for inorganic and organic species of potential importance in environmental chemistry. Disponible en <http://www.mpch-mainz.mpg.de/sander/res/henry.html> (Consultada el 24 de agosto de 2008).
- SAS. 1999. User's Guide: Statistics. SAS Institute, Cary, NC, USA.
- Seliger L. B., C. W. Forsberg, K. J. Cheng. 1996. The rumen: a unique source of enzymes for enhancing livestock production. *Anaerobe*. 2: 263-284.
- Schofield, P., A. N. Pell. 1995. Validity of using accumulative gas pressure readings to measure forage digestion *in vitro* a comparison involving three forages. *J. Dairy Sci*. 78: 2230-2238.
- Schils, M. L. R., J. E. Olesen, A. del Prado, J. F. Soussana. 2007. A review of farm level modelling approaches for mitigating greenhouse gas emission from ruminant livestock system. *Livestock Sci*. 112: 240-251.
- Schingoether, D. J., K. N. Linke, K. F. Kalscheur, A. R. Hippen, D. R. Rennich, I. Yoon. 2004. Feed efficiency of mid-lactation dairy cows fed yeast culture during summer. *J. Dairy Sci*. 87: 4178-4181.
- Shima, S., E. Warkentin, R. K. Thauer, U. Ermler. 2002. Review: structure and function of enzymes involved in the methanogenic pathway utilizing carbon dioxide and molecular hydrogen. *J. Biosci. Bioeng*. 93(6): 519-530.
- Shimada, M. A. 2009. *Nutrición animal*. 2a edición. Trillas. DF, México. Pp: 96-121.

- Smith, P., D. Matino, Z. Cai, D. Gwary, H. Janzen, P. Kurmar, B. McCarl, S. Ogle, F. O'Mara, C. Rice, B. Scholes, O. Sirotenko, M. Howden, T. McAllister, G. Pan, V. Romanenkov, U. Schneider, S. Towprayoon, M. Wattenbach, J. Smith. 2008. Greenhouse gas mitigation in agricultura. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 363: 789-813.
- Smith, A. S., C. O. Stöckle. 2008. A biogas meter with adjustable resolution and minimal back-pressure. *Biores. Technol.* 99: 8537-8539.
- Steel, R. G., J. H. Torrie. 1988. *Bioestadística. Principios y procedimientos.* 2ª edición. McGraw Hill, México. 622 p.
- Stolaroff, K. J., D.W. Keith, G. V. Lowry. 2008. Carbon dioxide capture from atmospheric air using sodium hydroxide pray. *Environm. Sci. Technol.* 42(8): 2728-2735.
- Sullivan, H. M., S. A. Matin. 1999. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* culture on *in vitro* ruminal microorganism fermentation. *J. Dairy Sci.* 82:2011-2016.
- Tamminga, S. 1996. A review on environmental impacts of nutritional strategies in ruminants. *J. Anim. Sci.* 74: 3112-3124.
- Thauer, K. R. 1998. Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. *SGM Microbiol.* 144: 2377-2406.
- Theodorou, M. K., B. A. Williams, M. S. Dhanoa, A. B. McAlllan, J. France. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Anim. Feed. Sci. Technol.* 48: 185-197.
- Tedeschi, L. O., D. G. Fox, T. P. Tylutki. 2003 Potential environmental benefits of ionophores in ruminant diets. *J. Environm. Qual.* 32:1591-1602

- Tokura, M., K. Ushida, K. Miyazaki, Y. Komjima. 1997. Methanogens associated with rumen ciliates. *FEMS Microbol. Ecol.* 22: 137-143.
- Ushida, K., M. Tokura, A. Takenaka, H. Itabasho. 1997. Ciliate protozoa and ruminal methanogenesis. *In* "Rumen microbes and digestive physiology in ruminants. R. Onodera, H. Itabashi, K. Ushida, H. Yan, Y. Sasaki (eds). Japan Scientific Societies Press Tokio, Japan. Pp 209-220.
- Ungerfeld, M. E., R. A. Kohn, R. J. Wallace, C. J. Newbold. 2007. A meta-analysis of fumarate effects on methane production in ruminal batch cultures. *J. Anim. Sci.* 85: 2556-2563.
- Van Kesel, S. A. J., J. B. Russell. 1996. The effect of pH of ruminal methanogenesis. *FEMS. Microbiol. Ecol.* 20: 205-210.
- Van Soest, J. P. 1982. *Nutritional Ecology of the Rumen.* Comstock publishing Ass. Cornell University Press. Pp. 160-169.
- Vidal, G., J. Becerra, V. Hernández, J. Decap, C. R. Xavier. 2007. Anaerobic biodegradation of sterols contained in kraft mill effluents. *J. Biosci. Bioeng.* 104(6): 476-480.
- Vogels, D. G., W. F. Hoppe, C. K. Stumm. 1980. Association of methanogenic bacteria with ciliates. *Appl. Environm. Microbiol.* 40(3): 608-612.
- Wallace, R. J., 1994. Ruminal microbiology, biotechnology, and ruminant nutrition progress and problems. *J. Anim. Sci.* 72:2992-3003.
- Wang, Z., and L. A. Goonewardene. 2004. The use of MIXED models in the analysis of animal experiments with repeated measures data. *Can J. Anim. Sci.* 84: 1-11.

- Watson, R. T., F. Meira, L. G. Sanhueza. 1992. Sources and Links *in*: Houston J. T. B. A. Callander. Climate Change, Cambridge University Press. p 139-144.
- Weber, H., K. D. Kulbe, H. Chimiel, W. Trösch. 1984. Microbial acetate conversion to methane kinetics, yield and pathway in a two-step digestion process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19: 224-228.
- Weimer, P. J. 1998. Manipulating ruminal fermentation: a microbial ecological perspective. *J. Anim. Sci.* 76: 3114-3122.
- Williams, C. M., J. C. Shih. 1989. Enumeration of some microbial groups in thermophilic poultry waste digesters and enrichment of a feather-degrading culture. *J. Appl. Bacteriol.* 67: 25-35.
- Williams, E. P., C. A. Tait, G. M. Innes, C. J. Newbold. 1991. Effects of the inclusion of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae* plus growth medium) in the diet of dairy cows on milk yield and forage degradation and fermentation patterns in the rumen of steers. *J. Anim. Sci.* 69: 3016-3026.
- Wolin, M. J., 1960. A theoretical rumen fermentation balance. *J. Dairy. Sci.* 43: 1452-1459.
- Wolin, M. J., L. T. Miller, S. C. Stewart. 1997. Microbe-microbe interaction. *In* The Rumen Microbial Ecosystem. Hobson P. N. & Stewart C. S. (Eds). Chapman and Hall, London UK. pp 467-491.
- Wright, G. A. D., A. J. Williams, B. Winder, C. T. Christophersen, S. L. Rodgers, K. D. Smith. 2004. Molecular diversity of rumen methanogens from sheep in western Australia. *Appl. Environm. Microbiol.* 70(3): 1263-1270.



Zeikus, G. J. 1977. The biology of methanogenic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 41(2): 514-541.