

UNIVERSIDAD DEL MAR

Campus Puerto Escondido



EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON VAINA DE *Enterolobium cyclocarpum* Jacq. Griseb. EN LA GANANCIA DE PESO Y PRODUCCIÓN DE METANO EN OVINOS DE PELO

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Producción y Sanidad Animal

Presenta:

L.Z. Aldo Abraham Salazar Mendoza

Director de Tesis:

Dr. Serafín Jacobo López Garrido

Puerto Escondido, Oaxaca 2016

Puerto Escondido, Oaxaca, Abril 2016

DRA. MARÍA DEL ROSARIO ENRÍQUEZ ROSADO
JEFA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
DE LA UNIVERSIDAD DEL MAR
P R E S E N T E

Después de haber analizado y evaluado la tesis: **“EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON VAINA DE *Enterolobium cyclocarpum* Jacq. Griseb. EN LA GANANCIA DE PESO Y PRODUCCIÓN DE METANO EN OVINOS DE PELO”** que presenta el **Licenciado en Zootecnia Aldo Abraham Salazar Mendoza**.

Por este conducto, le comunicamos que la tesis si cumple con los requisitos académicos para que el citado tesista presente el correspondiente examen profesional.

Sin más por el momento, quedamos de Usted.

A t e n t a m e n t e

Dr. Narciso Ysac Ávila Serrano
Prof. Inv. Universidad del Mar
Revisor

Dr. Marco Antonio Camacho Escobar
Prof. Inv. Universidad del Mar
Revisor

Dr. Jaime Arroyo Ledezma
Prof. Inv. Universidad del Mar
Revisor

Dr. José Guadalupe Gamboa Alvarado
Universidad del Mar
Revisor

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

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a:

Mis padres, Alfonso Armando Salazar Estrada y Antonia Ever Mendoza Cirigo, por otorgarme su amor, confianza y alentarme a cumplir mis sueños, por forjar con paciencia, seguridad y sabiduría el hombre que soy ahora y por creer en el hombre que puedo llegar a ser.

A Fátima Rocha Ocampo, por ser mi complemento, dar la calma necesaria a mi vida y por permitirme vivir con el placer de recibir su amor.

A mis hermanos Alfonso, Nadia, Jasmin, Rebeca y Mercedes, por ser mis mejores amigos, y ofrecerme el apoyo necesario para salir adelante, por su cariño y consejos en todo momento y más importante por su cariño que me ha dado la fuerza necesaria para seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Serafín Jacobo López Garrido, a quien considero más que un amigo. Por orientarme, compartir su sabiduría en esta etapa de mi formación profesional y por enseñarme que con constancia, deseo, voluntad y actos no existe adversidad en la búsqueda de cumplir un sueño.

A Sandra Roselia Ramírez Ochoa, Sandra Ochoa Chabela, Abel Cristóbal Montaña Trujillo, Verónica Díaz Venegas, Mara Patricia Cruz Olmedo, por sus enseñanzas, cariño y permitirme ser parte de su familia.

A mis padrinos Rosa María Salazar Estrada, Heriberto por su cariño y apoyo incondicional, por ser parte esencial en mi vida.

A mis amigos LZ. Sergio Ayala Díaz, LZ. Ulises Cortes Gómez, LZ. Diego Arturo Ramos Ramos, Eduardo Salinas Cruz, Palmira Díaz Altamirano, Alejandra Pardo, por su amistad y su apoyo incondicional.

Al Dr. José Guadalupe Gamboa Alvarado, por su amistad y confianza, siempre es mejor una acción que una palabra, y de la convivencia laboral he aprendido la formalidad y el hábito de superarme día con día.

Al Dr. Marco Antonio Camacho Escobar, por sus enseñanzas, consejos y demostrarme que aquellas metas que más trabajo nos cuesta cumplir son las victorias más satisfactorias.

Al Dr. Narciso Ysacc Avila Serrano, por su amistad, enseñanzas, apoyo, consejos, y visión del trabajo grupal.

Al Dr. Jaime Arroyo Ledezma, por sus consejos y apoyo en la presente tesis.

A los profesores Dr. Edgar Iván Sánchez Bernal, Dra. Mónica Marcela, MC. Alejandra Buenrostro Silva, por sus enseñanzas y consejos a lo largo de esta etapa.

Resumen

Se evaluó el efecto de la vaina de *Enterolobium cyclocarpum* (parota), en la dieta de ovinos de pelo. La duración del estudio fue de 49 d con 15 d de adaptación. El experimento constó de dos etapas una *in vivo* y otra *in vitro*. Se utilizaron 15 corderos machos con peso vivo promedio de 16.0 ± 2 Kg alojados en jaulas individuales. Los tratamientos incluyeron dos niveles de vaina de parota molida en la dieta (en base a MS): Testigo (T1), 30 % de parota (T2), 40 % de parota (T3). Las variables medidas para la etapa *in vivo* fueron: ganancia diaria de peso (GDP), consumo de materia seca (CMS), conversión alimenticia (CA), eficiencia alimenticia (EFA), pH del líquido ruminal, ácidos grasos volátiles (AGV), concentración de bacterias totales, celulolíticas y protozoarios; se estimó la concentración de metano (CH_4) y bióxido de carbono (CO_2), a partir de los AGV. Para la segunda etapa las variables medidas fueron: concentración de AGV, CH_4 , CO_2 , y digestibilidad *in vitro* de la materia seca. Se usó un diseño completamente al azar con tres tratamientos y 5 repeticiones. La mayor producción de CH_4 , en ambas etapas se presentó en el T1, acompañada de mayor concentración de protozoarios ruminales y de acetato; menor concentración de propionato. No se observó efecto ($P > 0.05$) CSM, EA, GDP, EFA, pH, bacterias totales, celulolíticas y en concentración de AGV totales. Entre T2 y T3 no se observaron diferencias ($P > 0.05$) en la producción de CH_4 (*in vitro* e *in vivo*), en el número de bacterias celulolíticas, protozoarios, ni en concentraciones de AGV totales, acetato, propionato y butirato, sin embargo, la inclusión del 40 % de vaina de parota redujo en un 27 % la producción de CH_4 . Se concluye que la incorporación de vaina de parota en la dieta de ovinos, no afecta la eficiencia productiva, ni las variables microbiológicas con excepción de la población de protozoarios; mejora algunas variables fermentativas; tales como el aumento en la concentración de propionato y la disminución de CH_4 ruminal.

Palabras clave: Fermentación ruminal, metano, ovinos, parota.

Abstract

This research aimed to evaluate the effect of the sheath *Enterolobium cyclocarpum* (parota) in the diet of sheep hair. The study duration was 49 d 15 d with adaptation. The experiment consisted of two stages in vivo and in vitro another. 15 male lambs with average live weight of 16.0 ± 2 kg caged individually were used. The treatments included two levels of sheath parota ground in the diet (based on MS): Witness (T1), 30% of parota (T2), 40% of parota (T3). The variables measured for the in vivo stage were: average daily gain (GDP), DMI (CMS), feed conversion (CA), feed efficiency (EFA), pH of the rumen fluid, volatile fatty acids (VFA) concentration of total bacteria, cellulolytic and protozoa; the concentration of methane (CH₄) and carbon dioxide (CO₂) from the AGV was estimated. For the second stage variables measured were: VFA, CH₄, CO₂, and in vitro dry matter digestibility. a completely randomized design with three treatments and 5 replications was used. Increased production of CH₄, in both stages was presented at the T1, accompanied by greater concentration of rumen protozoa and ethyl; propionate lower concentration. No effect ($P > 0.05$) CSM, EA, GDP, EFA, pH, total bacteria, cellulolytic and VFA total concentrations. between T2 and T3 was observed no differences ($P > 0.05$) in the production of CH₄ were observed (in vitro and in vivo) in the number of cellulolytic bacteria, protozoa, or total concentrations of acetate, propionate and butyrate AGV, however the inclusion of 40% sheath parota reduced CH₄ production by 27%. It is concluded that the incorporation of sheath parota in the diet of sheep, does not affect production efficiency, and microbiological variables except the protozoan population; improves some fermentative variables; such as the increase in the concentration of propionate and decreased ruminal CH₄.

Keywords: Sheep, parota, methane, ruminal fermentation

Índice	página
Introducción.....	11
Antecedentes.....	14
Ganadería del trópico.....	14
Cambio climático.....	15
El metano y su participación en el efecto invernadero.....	16
Producción de metano por el rumiante.....	16
Estrategias para la reducción de la metanogénesis ruminal.....	17
Empleo de leguminosas.....	19
Metodologías para medir la producción de metano.....	21
Cromatografía de gases.....	23
Objetivos.....	24
Objetivo general.....	24
Objetivos específicos.....	24
Hipótesis.....	24
Materiales y Métodos.....	25
Localización geográfica.....	25
Etapa 1. Experimento <i>in vivo</i>	25
Animales experimentales.....	25
Dietas experimentales.....	26
Análisis químico de la dieta.....	27
Recolección de la vaina de parota.....	27
Tratamientos experimentales.....	27
Muestreo de líquido ruminal.....	27
Variables evaluadas.....	29

Etapa 2. Experimento <i>in vitro</i>	33
Tratamientos experimentales.....	33
Montaje del sistema de producción de gas <i>in vitro</i>	33
Inóculo ruminal.....	35
Acoplamiento de biodigestores y trampas de gas.....	35
Variables evaluadas.....	36
Diseño experimental y análisis estadístico.....	38
Resultados y Discusión	39
Consumo de materia seca	39
Ganancia de peso.....	40
Conversión alimenticia	42
Eficiencia alimenticia.....	43
Valores de pH y concentración de microorganismos ruminales.....	44
Concentración de AGV CH ₄ y CO ₂ en el ensayo <i>in vivo</i>	49
Concentración de AGV CH ₄ y CO ₂ en el ensayo <i>in vitro</i>	52
Conclusiones.....	56
Literatura citada.....	57

Índice de cuadros	Página
Cuadro 1. Pesos de los corderos al destete, distribuidos aleatoriamente en los diferentes tratamientos.....	26
Cuadro 2. Composición de las dietas Experimentales formuladas (g 100 g ⁻¹ Ms).....	28
Cuadro 3. Componentes del medio de cultivo para bacterias celulolíticas.....	32
Cuadro 4. Componentes del medio de cultivo glucosa, celobiosa, almidón y fluido ruminal (GCA-FR).....	34
Cuadro 5. Análisis químico (%) de las dietas experimentales.....	39
Cuadro 6. Consumo de materia seca (Kg animal ⁻¹ d ⁻¹) en corderos postdestete, alimentados con una dieta con diferentes proporciones de vaina de parota.....	40
Cuadro 7. Ganancia de peso vivo (g animal ⁻¹ d ⁻¹) en corderos postdestete, alimentados con una dieta con diferentes proporciones de vaina de parota.....	41
Cuadro 8. Conversión alimenticia en corderos postdestete alimentados con una dieta con diferentes proporciones de parota.....	43
Cuadro 9. Eficiencia alimenticia en corderos postdestete (kg día ⁻¹) alimentados con una dieta con diferentes proporciones de parota.....	44
Cuadro 10. Valores de pH y concentración de bacterias totales, bacterias celulolíticas y protozoarios (por mL ⁻¹ de fluido ruminal), en corderos alimentados con dietas con diferentes proporciones de parota...	47
Cuadro 11. Concentración de AGV, CH ₄ y CO ₂ de muestras de líquido ruminal (<i>in vivo</i>), en corderos alimentados con dietas con diferentes porciones de parota.....	51
Cuadro 12. Concentración de AGV, CH ₄ y CO ₂ durante una fermentación <i>in vitro</i> después de 72 h de incubación.....	53

Índice de figuras	Página
Figura 1. Jaulas individuales.....	26
Figura 2. Secado y molienda de la vaina de parota.....	27
Figura 3. Extracción de líquido ruminal.....	28
Figura 4. Recolección de alimento rechazado.....	29
Figura 5. Potenciómetro utilizado para medir pH.....	30
Figura 6. Acoplamiento del sistema de producción de gas.....	36
Figura 7. Biodigestores utilizados para la determinación de la degradabilidad ruminal.....	37

Introducción

En la actualidad el calentamiento global es un problema importante que enfrenta el planeta, se origina por la acumulación de gases de efecto invernadero (GEI), producto de las actividades humanas (Moss *et al.* 2000, Molano *et al.* 2008). Destaca la actividad agropecuaria que contribuye de forma importante a las emisiones de GEI, como bióxido de carbono (CO₂), metano (CH₄) y óxido nitroso (NO₂) (Gleik *et al.* 2010, Sejian *et al.* 2011, Naqvi & Sejian 2011). Es el CH₄ el que tiene mayor efecto sobre el calentamiento global al poseer un potencial de calentamiento de 21 a 30 veces mayor que el CO₂ (Moos *et al.* 2000).

Ahora se reconoce que las actividades pecuarias contribuyen con cerca de 9% del total de las emisiones de CO₂, 44 % de CH₄ y 65 % de NO₂ (FAO 2006, Gerber *et al.* 2013). Las emisiones globales de CH₄ por los rumiantes oscilan entre 80 y 100 millones de toneladas al año (Kumar *et al.* 2008). Se considera que estas emisiones se incrementarán por el constante crecimiento de la población ganadera (Patra 2013), debido al aumento de la demanda de proteína de origen animal por la humanidad, especialmente en países con un rápido desarrollo económico (Thornton 2010). De acuerdo a las proyecciones de la producción ganadera mundial, para el año 2030, se espera que las emisiones de CH₄ por los rumiantes domésticos se incrementen en un 60 %, mientras que para el año 2050 aumentará en 100% (FAO 2008).

La producción de CH₄ por los rumiantes se genera como producto secundario de la fermentación microbiana de los carbohidratos contenidos en el alimento, el cual se produce entre 87 y 90 % en el rumen y de 10 a 13 % en el intestino grueso (Murray *et al.* 1999, Dini *et al.* 2012), por microorganismos metanogénicos del grupo *Archaea* que usan el H₂ para reducir CO₂ y sintetizar ATP y CH₄ como productos finales (Russell & Richlik 2001); lo cual contribuye a mantener constante el pH del rumen (Lana *et al.* 1998). Sin embargo, la producción de CH₄ representa pérdidas de 12 a 15% de la energía consumida por los rumiantes (DeRamus *et al.* 2003).

Las alternativas para reducir las emisiones de CH₄ se basan principalmente en el manejo del animal y la manipulación de los microorganismos ruminales mediante los componentes de la dieta (Eckard *et al.* 2010). Desde un punto de vista práctico, el

manejo de la dieta de los rumiantes se considera como la alternativa más viable para disminuir la producción de CH₄ y las pérdidas energéticas en el animal (Santacoloma 2011). En condiciones de trópico, el manejo de la dieta resulta muy importante porque la mayoría de los sistemas de producción ganadera tienen bajos rendimientos debido a que las dietas son de baja calidad nutricional (Carmona *et al.* 2005).

Recientemente se han realizado diferentes estudios donde se ha propuesto el uso de árboles, arbustos, frutos o semillas para ser utilizadas como componentes de la dieta, dado su alto contenido de nutrientes, y con ello se busca mejorar el valor nutritivo de la ración (Galindo *et al.* 2003). Se han estudiado distintas especies como la morera (*Morus alba*), el quiebrabarriga (*Trichantera gigantea*) y el guácimo (*Guazuma ulmiflora*) entre otras; sin embargo son las leguminosas las que presentan el mayor potencial nutricional en condiciones tropicales (Carmona 2007).

Entre las leguminosas se encuentra *Enterolobium cyclocarpum*, conocida comúnmente con los nombres de parota, guanacastle, orejón, conacaste, sonaja, entre otros. Es una especie endémica del Continente Americano y distribuida en México en la vertiente del Golfo desde el sur de Tamaulipas hasta la península de Yucatán; en la costa del Pacífico se distribuye desde Sinaloa hasta Chiapas (Pennington & Sarukhan 2005), esta especie es propia de los bosques tropicales semi caducifolios (Rocha & Aguilar 2001). Esta leguminosa presenta una gran versatilidad y es una de las especies más importantes de México y del mundo por sus características, considerando su altura y diámetro, además de la gran cantidad de biomasa, así como por los múltiples usos entre los que destacan maderable, cortina rompe vientos, cerca viva, sombra, leña, es una fuente de néctar para la industria apícola; complemento proteínico y energético para la dieta de rumiantes (Gómez *et al.* 2006).

El uso de *Enterolobium cyclocarpum* en la alimentación de rumiantes se realiza en los agostaderos, debido a que esta especie crece en forma natural en los potreros y fructifica de enero a mayo, lo que coincide con la época de sequía cuando el forraje es poco abundante y de mala calidad, contribuyendo en forma importante como suplemento en la alimentación. Esta leguminosa arbórea tiene una producción anual de 725 Kg de vainas por árbol con la siguiente composición química: contenido de proteína

cruda 16.13%, grasa cruda 2.85%, fibra cruda 4.95%, cenizas 2.95% y extracto libre de nitrógeno 63.1%; así como la presencia de saponinas triterpénicas, las cuales poseen un efecto desfaunante y bactericida sobre los microorganismos ruminales (Serratos *et al.* 2008), lo cual puede ejercer una modificación en la fermentación ruminal, produciendo un incremento en la producción de propionato, el cual requiere de H₂ para su formación por lo que puede ser considerado como una forma competitiva en el uso del H₂ en el rumen (Carmona *et al.* 2005); lo cual puede causar una disminución en la producción de CH₄ (Busquet *et al.* 2006, Patra & Saxena 2010). Sin embargo la información generada sobre el uso de la parota en la alimentación de rumiantes aun es limitada, y los estudios disponibles se basan principalmente en la digestibilidad de la dieta y ganancias de peso de los rumiantes (Serratos *et al.* 2008). Por lo anterior, esta investigación se realizó con el propósito de evaluar la incorporación de las vainas de *Enterolobium cyclocarpum* en las dietas de ovinos en el trópico como un suplemento alternativo para evaluar las ganancias de peso, parámetros de fermentación ruminal y la producción de CH₄.

Antecedentes

Ganadería del trópico

Desde un punto de vista utilitario, los rumiantes son animales importantes para la especie humana, debido a que son una fuente de carne, leche o fibras; en algunos países son fundamentales como animales de trabajo, y en otros utilizados como recreo en forma de caza, rodeos y corridas (Church 1988). Su principal función es el aporte de alimento para la especie humana; el crecimiento poblacional y el fenómeno de urbanización son los eventos que originan una mayor demanda de alimentos de origen animal, por lo que es necesario un incremento en la producción (Mendoza-Martínez *et al.* 2008). Actualmente la población ovina nacional es de 8.1 millones de cabezas (SIAP 2010), de las cuales 55 % se encuentra en la zona centro, 23 % en la zona norte, 16 % en la zona sur 16 % y 6 % en el trópico (SIAP 2010). Sin embargo, esta producción no satisface la demanda interna, por lo que se importa 60% del consumo nacional, principalmente de Australia (61%), Nueva Zelanda (23%), Estados Unidos (1%), Chile (4%), y otros países (1%) (SIAP 2010), que debido a sus sistemas de producción, les permite llegar al mercado nacional a bajo precio. En forma alternativa la producción de ovinos en zonas tropicales se incrementó, en gran parte favorecido por la baja rentabilidad de los sistemas de producción de bovinos, tanto de leche como de carne, por lo que los ganaderos aprovechan el potencial de la región, porque han visto a la ovinocultura como una alternativa rentable (Cruz 1991), siendo las razas predominantes la Pelibuey, Blackbelly y recientemente razas especializadas para la producción de carne como la Dorper y la Katahdin (Ramírez *et al.* 2011). La ganadería del trópico se caracteriza por una alimentación basada en el pastoreo de agostaderos, en este sistema las especies forrajeras dominantes son gramíneas que tienen bajo contenido de nutrientes (Piñeiro-Vázquez *et al.* 2009), situación que no solo limita la producción pecuaria, si no que contribuye con el calentamiento global. Cuando los rumiantes son alimentados con dietas altas en forrajes, existe en el rumen una mayor cantidad de microorganismos metanogénicos (Bernalier *et al.* 1991, Ferry 1992, Breznak 1994, Baker 1999, Cheng *et al.* 2009), y por tanto una mayor producción de CH₄, gas de efecto invernadero, que daña la capa de ozono, reteniendo la radiación infrarroja,

incrementando el calentamiento del planeta y representa pérdidas de 15% de la energía consumida por los rumiantes (Anderson & Rasmussen 1998).

Una opción para reducir el costo de la alimentación de los ovinos y rumiantes en general en el trópico es mediante la incorporación de los frutos y follaje de árboles y arbustos en la ración (Ramírez *et al.* 2011), los cuales contienen cantidades aceptables de proteína y metabolitos secundarios, por lo que tienen buen potencial para ser empleadas en la alimentación ovina (Moscoso *et al.* 1995, Ramírez *et al.* 2011).

Cambio climático

El cambio climático es un fenómeno que se manifiesta en un aumento de la temperatura promedio del planeta, vinculada directamente con el incremento en la concentración de GEI, afectando la intensidad de los fenómenos del clima en todo el mundo (CMCC 2005, IPCC 2001).

Los cambios en el clima se dan por que la Tierra absorbe la radiación del sol, sobre todo en la superficie del planeta. Esta energía es redistribuida por las circulaciones atmosférica y oceánica; irradiada nuevamente al espacio en longitudes de onda infrarroja más largas. La temperatura media anual de la Tierra se equilibra entre la energía de la radiación solar que ingresa y la saliente de la superficie terrestre. Cualquier factor que altere, o influya en la redistribución de energía dentro y entre atmosfera, tierra y océano, puede afectar el balance y producir un cambio climático global (Ramírez 2010).

El incremento de la producción de GEI por las actividades humanas, se ha convertido en un importante tema de discusión debido al efecto que causan sobre la composición de la atmosfera terrestre, existen diferentes opiniones de la magnitud de este problema, se espera que un cambio en el clima resulte en un incremento de la temperatura global de entre 2 a 4% durante los próximos 50 años (Braswel 1997, Hasselman 1997, Lay *et al.* 1997, Weir 1998).

El metano y su participación en el efecto invernadero

El CH₄ tiene la propiedad de absorber la radiación infrarroja terrestre generada por el calor, lo cual contribuye al calentamiento global del planeta, este compuesto actúa en reacciones químicas que permiten la producción de ozono en la troposfera y vapor de agua en la estratosfera. Se estima que el potencial de calentamiento global que causará el CH₄ en los próximos veinte años, será 62 veces mayor que el causado por el CO₂ bióxido de carbono (Kerr 1997, Minami & Takata 1997).

La concentración media global de CH₄ en la atmosfera durante 1994 fue de 1,720 ppm, lo que representa un incremento de 145% en relación con la concentración existente en el periodo previo a la industrialización que fue de 700 ppm (IPCC 1996). En 1998, la concentración atmosférica era de 1745 ppm, con una tasa de cambio en la concentración de 7.0 partes por billón anual. El CH₄ tiene un tiempo de residencia de 12 años y es eliminado de la atmosfera por reacciones químicas. Se estima que de 60 a 80 % de las emisiones actuales de CH₄ provienen de las actividades antropogénicas, es por ello el reciente interés por reducir el calentamiento global a través del mejoramiento en el manejo de los sistemas extensivos de la producción de rumiantes (Mora 2001).

Producción de metano por el rumiante

La producción de CH₄ por los microorganismos del rumen se ha estimado que es entre 300 y 600 L⁻¹ al año en ganado adulto (González *et al.* 2006), esto representa alrededor de 80 a 110 millones de toneladas al año. El CH₄ es producido en el rumen exclusivamente por microorganismos metanogénicos del grupo *Archaea* cuya concentración en el rumen es de 10⁶ bacterias mL⁻¹ (McAllister *et al.* 1996), siendo las principales especies; *Methanobacterium formicum*, *Methanobacterium bryantii*, *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobrevibacter smithii*, *Methanomicrobium mobile*, *Methanosarcina barkeri* y *Methanoculleus olentangyi* (Sosa *et al.* 2007).

Las condiciones para el crecimiento de los microorganismos metanogénicos deben ser ambientes libres de oxígeno, con un potencial de óxido reducción menor a -330 mV y un pH de 7.0. A pesar de que la metanogénesis está ligada a la fermentación

anaeróbica, no es un proceso fermentativo, debido a que los microorganismos metanogénos no realizan fosforilación a nivel sustrato, siendo la fuente carbono en estas *Archeas* el CO₂, el cual se reduce por hidrogenación enzimática (Báez 2010).

En la ruta de la metanogénesis, inicialmente el CO₂ es reducido hasta nivel de formilo, por la enzima que contiene el metanofurano (MF), después el grupo formilo se une a una enzima que contiene metanopterina (MP) y posteriormente es deshidratado y reducido, en dos pasos distintos, a metileno y metilo. En seguida, el grupo metilo se transfiere de la MP a una enzima que contiene la coenzima M (CoM). Finalmente, el metil-CoM es reducido a CH₄ por la enzima metil reductasa, en la cual intervienen dos coenzimas la F₄₃₀ y la CoM. La coenzima F₄₃₀ elimina el grupo CH₃ del CH₃-CoM, formando un complejo Ni²⁺ - CH₃, después éste es reducido por los electrones de la coenzima B (CoB) y un complejo disulfuro de CoM y CoB (CoM-S – S-CoB) (Madigan *et al.* 2004). En la metanogénesis se da la síntesis de dos moléculas de adenosin trifosfato (ATP), uno acoplado a un gradiente de protones y el otro a un gradiente de sodio. El primero se produce en la reducción del complejo disulfido CoM-S – S-CoB, tras la separación de los grupos –SH, por un flavin adenín dinucleotido (FAD) que contenga heterodisulfito reductasa formándose un ATP por fuerza motriz de protones. El segundo se produce en la transferencia del grupo CH₃ del complejo CH₃-MP a CoM por un gradiente de sodio (Thauer 1998).

Estrategias para la reducción de la metanogénesis ruminal

Las estrategias para reducir las emisiones de CH₄ en rumen, se dividen en tres grandes grupos: de tipo fisiológico y de manejo animal; composición de la dieta; y manipulación ruminal (Eckard *et al.* 2010).

En el primer grupo se han utilizado tres diferentes estrategias: la forma de crianza, el sistema de producción animal, y la reducción directa de las emisiones de GEI por la cría de animales seleccionados genéticamente. Algunas investigaciones han comprobado que el ganado sometido a sistemas de producción intensivos produce menos CH₄ en relación a los animales criados en sistemas extensivos; además, desechar animales viejos y reducir los periodos de lactancia minimizan la emisión de GEI y mejoran la

rentabilidad del sistema de producción (Clements & Ahlgrim 2001). El mejoramiento genético es otra herramienta que se puede utilizar para reducir las emisiones de CH₄ (Cassandro *et al.* 2013), donde el potencial de mitigación sería el uso de la variación individual dentro de la selección de la raza para los animales con menor producción de gramos de CH₄ por cada kg de materia seca consumida (Cavanagh *et al.* 2008, Vlaming *et al.* 2008).

Los componentes de la dieta, especialmente los granos de cereales, son capaces de modificar el pH ruminal, lo cual altera la población microbiana existente (Calsamiglia *et al.* 2008). La producción de CH₄ en los rumiantes tiende a disminuir al suministrar en la ración forrajes de mayor calidad nutritiva. Una mayor concentración de ácido acético en el rumen es consecuencia de la fermentación de dietas con altas proporciones de forraje, como resultado se incrementa la producción de CH₄; en contraste, en dietas con alto contenido de concentrados se produce en rumen una mayor concentración de ácido propiónico y una menor concentración de CH₄ (Mizaei & Maheri 2011). Por lo tanto, el consumo de forrajes de mayor digestibilidad reducen las emisiones de CH₄ por parte de los rumiantes (Eckard *et al.* 2010).

El uso de distintos aditivos en la alimentación animal ha sido una técnica utilizada para inhibir la producción de CH₄ en el rumen (Itabashi *et al.* 2000). La adición de grasas a la ración ha sido una adecuada estrategia. Los ácidos grasos insaturados compiten con la metanogénesis por los equivalentes de reducción durante la biohidrogenación que realizan los microorganismos ruminales (Czerkawski *et al.* 1996). Los inhibidores más efectivos incluyen ácidos grasos como linoleico y ácido cis-oleico y algunos ácidos grasos saturados como behénico y estearico (Zawadzki 1986).

También existen otros métodos experimentales de mitigación de las emisiones de CH₄ en rumiantes, como la creación de rebaños aislados libres de protozoarios, la vacunación y generación de anticuerpos salivales específicos contra microorganismos metanogénos (Shu *et al.* 2001). Otras estrategias asociadas a la disminución de metanogénos del rumen han sido mediante el uso de productos químicos, como el cloroformo (Triet *et al.* 1972), tricloroacetamida, tricloroetil, bromoclorometano, ácido 2-bromoetanosulfonato (Dong *et al.* 1999). A pesar, que se ha producido una disminución

en la producción de CH₄ con estos compuestos químicos en la mayoría de los estudios, el dilema es que ejercen efectos negativos en el consumo de alimento, la digestión y la fermentación del rumen, cuando son adicionados en altas concentraciones para lograr mayor reducción en la producción de CH₄. Dentro de las técnicas de control biológico, aún existe poca información sobre el uso de bacteriófagos para disminuir la población de *Archeas* metanogénicas, este método parece ser una alternativa viable (Jansen & Kris 2008), dado que la concentración de bacteriófagos se ha estimado en alrededor de 10⁹-10¹⁰ partículas/mL de contenido ruminal (Swain *et al.* 1996), los cuales infectan y lisan bacterias de manera muy específica, de esta forma se reduciría a la población de *Archeas* metanogénicas sin afectar a las distintas especies bacterianas del rumen, sin embargo, por su complejidad aún no se han desarrollado totalmente estas técnicas para uso práctico.

Por su parte, Thornton & Herrero (2010) mencionan que para resolver el problema de la producción de CH₄, más que intentar disminuir su producción, se deben identificar las causas que predisponen a la emisión en los sistemas de producción de rumiantes, en la mayoría de los casos se relaciona con el tipo y la frecuencia de alimentación, la especie y las características químicas del alimento, su digestibilidad, así como el sistema de pastoreo de los animales (Beauchemin & McGinn 2005).

Empleo de leguminosas

En distintas investigaciones se ha comprobado que el uso de plantas leguminosas son fuentes valiosas de proteínas, minerales y vitaminas, requeridas por los microorganismos ruminales para su crecimiento y actividad enzimática; además de contener algunos compuestos químicos que modifican la fermentación ruminal, con lo cual se reduce la formación de CH₄ (Cardoso 2005). Algunas plantas o sus extractos pueden contener metabolitos secundarios con potente actividad defaunante que tendrán efecto en la reducción de la producción de CH₄. Dentro de los metabolitos secundarios de estas leguminosas se incluyen los taninos, saponinas y aceites esenciales, los cuales pueden afectar el desarrollo de las poblaciones microbianas del rumen (Busquet *et al.* 2006, Calsamiglia *et al.* 2008, Mao *et al.* 2010, Goel & Makkar,

2012). En las regiones tropicales los follajes y vainas de los árboles y arbustos contienen éstos metabolitos que pueden contribuir a reducir las emisiones de CH₄ en los sistemas de producción de rumiantes. Hess *et al.* (2003), reportaron que las vainas completas de parota, poseen 19.0 mg de saponinas g⁻¹ de materia seca, que pueden disminuir la concentración de los protozoarios (Koenig *et al.* 2007). Se ha considerado que los protozoarios ejercen una importante función en la producción de CH₄ debido a la estrecha relación con las *Archeas* metanogénicas, debido principalmente al fenómeno de transferencia interespecífica de H₂ (Johnson & Johnson 1995, Moss *et al.* 2000); se ha estimado que esta asociación es la responsable de la producción de 9 a 27% de CH₄ en el rumen (Moss *et al.* 2000). En algunos estudios se ha determinado que la remoción de los protozoarios del rumen o defaunación, puede disminuir la producción de metano hasta en 50% (Moss *et al.* 2000, McAllister 1996).

En la mayoría de los estudios se ha reportado que el uso de los aditivos inhibidores disminuyen la producción de CH₄; sin embargo, estos aditivos a menudo ejercen efectos adversos en el consumo de alimento, la digestión y la fermentación del rumen al ser adicionados en concentraciones altas para reducir de forma significativa la producción de CH₄, y cuando éstos son agregados en concentraciones bajas a las dietas de los rumiantes tienen poco efecto en la disminución de CH₄ (Patra 2012).

Una alternativa muy viable y poco estudiada en las regiones tropicales para disminuir la producción de metano en rumiantes, la constituye el uso de las vainas de parota como componentes de la ración. En algunas investigaciones se ha reportado su uso con éxito al incluirlas en la ración de los ovinos en el trópico en concentraciones de 25 hasta 35%, obteniendo buenas ganancias de peso (Moscoso *et al.* 1995). En un estudio realizado por Amaro *et al.* (1993), se reportó que el consumo voluntario y la digestibilidad en dietas isoproteínicas con 0%, 12%, 24%, 36%, 48% y 60% de inclusión de vaina de parota en la dieta, no afectaron las ganancias de peso y conversión alimenticia; aunque, se ha observado que niveles del 75% o mayores provocan toxicidad en los animales (Negrón *et al.* 1993); originando una dermatitis serosa severa, así como linfocitosis. Por lo anterior, se ha establecido como límite máximo en la dieta un nivel de inclusión de 48% de vaina de parota, lo cual permite consumos elevados de

MS; aunque se han reportado efectos negativos en la digestibilidad de la dieta (González *et al.* 1989). En otro estudio, se evaluó la digestibilidad y los patrones de fermentación ruminal en borregos criollos, donde se utilizaron niveles de 15.55% y 31.11% de vaina de parota en la ración y se concluyó que niveles de 31% de parota, permiten consumos elevados de MS, pero, la digestibilidad de la dieta disminuye con niveles superiores (Álvarez *et al.* 2003). En estudios más recientes se ha reportado la misma tendencia, al incluir las vainas de parota en la dieta de los rumiantes; Briceño-Poot *et al.* (2012), evaluaron la digestibilidad, el consumo de materia seca y la producción de CH₄ al incluir vaina de parota en la ración de ovinos, y encontraron que no afectó el consumo de MS; sin embargo, la digestibilidad disminuyó en comparación con la dieta testigo. La producción de CH₄ no mostró una reducción al incluir la vaina de parota; empero, fue calculada por estimación estequiométrica; no obstante, esta metodología asume que todo el exceso de H₂ es convertido en CH₄ y no hay hidrógeno asociado con la síntesis de microorganismos ruminales, y también supone que la fermentación de los sustratos que no son carbohidratos no producen AGV. De tal manera que cuando los microorganismos ruminales son incluidas en la estequiometría de la fermentación, las estimaciones de la producción de CH₄ pueden disminuir (Carmona *et al.* 2005).

Metodologías para medir la producción de metano

Un problema muy frecuente, para evaluar la producción de CH₄ en los rumiantes, es la disponibilidad de técnicas para medirlo. Las técnicas *in vivo* para la determinación de CH₄ en rumen requieren equipos sofisticados, instalaciones especiales o animales entrenados (DeRamus *et al.* 2003); por otra parte, las técnicas *in vitro*, que únicamente simulan la fermentación de los alimentos en biodigestores, son efectivas y eficientes por su rapidez y bajo costo de operación (Ramírez 2010); además, permiten determinar la extensión y la cinética de la degradación del alimento a través del volumen de gas producido durante el proceso fermentativo, bajo condiciones controladas (Posada *et al.* 2006).

Autores como Wolin (1960) han determinado mediante estequiometria la estimación de CH₄ y CO₂ con relación a la distribución molar de los AGV. En donde se estima que 57.5 moles de glucosa producen 65 moles de acético + 20 moles de propiónico + 15 moles de butírico + Y moles de CO₂ + Z moles de CH₄. Para calcular la producción de CO₂ y CH₄ (Y y Z) se usan las siguientes ecuaciones.

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

Dónde:

Y = moles de CO₂

Ma = proporción molar de ácido acético

Mp = proporción molar de ácido propiónico

Mb = proporción molar de ácido butírico

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

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

Dónde:

Z = moles de CH₄

Y = moles de CO₂

Ma = proporción molar de ácido acético

Mb = proporción molar de ácido butírico

Las características químicas del alimento también se usan para calcular la producción de metano. La ecuación de Blaxter & Claperton (1969), consideró inicialmente las características químicas del alimento y es la base en la cual la mayoría de los estimativos de producción de metano se han derivado. Otra ecuación fue propuesta por

Moe & Tyrrel (1979), la cual incorpora las características del alimento. Se deriva de mediciones realizadas en ganado con raciones diarias de alta calidad y su relación con residuos solubles, como la hemicelulosa y celulosa en la producción de metano (Johnson & Johnson 1995). Esta se determina como sigue:

$$\text{CH}_4 = 3.406 + 0.510 (\text{residuo soluble}) + 1.736 (\text{hemicelulosa}) + 2.648 (\text{celulosa})$$

Donde el CH₄ está en MJ día⁻¹ y los residuos solubles, hemicelulosa y celulosa en kg/d.

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

Cromatografía de gases

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

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

Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto de la incorporación de vaina de *Enterolobium cyclocarpum* en la ganancia de peso y producción de metano en ovinos de pelo.

Objetivos específicos

- Determinar el efecto de la incorporación de la vaina de parota durante la fermentación ruminal *in vitro*, en la producción de metano (CH₄), dióxido de carbono (CO₂), ácidos grasos volátiles (AGV) y potencial de hidrógeno (pH) en dietas para ovinos.
- Evaluar el consumo voluntario, ganancias de peso, conversión alimenticia, y las principales variables fermentativas (AGV y pH) y microbiológicas del rumen (bacterias totales, bacterias celulolíticas y protozoarios) al incorporar vaina de parota en la dieta de corderos destetados.
- Estimar el efecto de la incorporación de la vaina de parota durante la fermentación ruminal *in vivo*, sobre la producción de metano a partir de los parámetros de fermentación ruminal.

Hipótesis

La adición de 30 y 40 % de vaina de parota como componente de la ración en ovinos de pelo en el trópico, mejora las variables productivas (ganancias de peso, consumo voluntario, conversión y eficiencia alimenticia) y reduce la producción de metano.

Materiales y Métodos

Localización geográfica

El estudio se realizó en el Campo Experimental de la Universidad del Mar, Campus Puerto Escondido, en el área de Corrales de Ensayos Metabólicos para Ovinos y en los Laboratorios de Microbiología, Bioquímica y Nutrición, de los laboratorios de la Licenciatura en Zootecnia, el cual se encuentra ubicado en la comunidad de Bajos de Chila, localizado en el Kilómetro 128.1 de la carretera Federal Pinotepa Nacional-Puerto Escondido. El clima de la región se ubica entre los climas A(c) w2 y Aw0, con dos estaciones bien diferenciadas (secas y lluvias), con una precipitación media anual entre 839.1 y 1587.1 mm y una temperatura media anual entre los 24 y 27.2°C (Serrano-Altamirano *et al.* 2005). Los análisis químicos (AGV, CH₄ y CO₂) de las muestras se realizaron en el laboratorio de Microbiología Ruminal y Genética Microbiana, del Colegio de Postgraduados, ubicado en Montecillo, Texcoco, Estado de México.

Etapas 1. Experimento *in vivo*

Animales experimentales

Se utilizaron 15 ovinos machos criollos de pelo destetados, de aproximadamente 3 meses de edad, con un peso promedio de 12.88±0.48 Kg, provenientes de partos dobles y distribuidos al azar a cada uno de tres tratamientos (homogenizando las unidades experimentales entre y dentro de tratamientos) (Cuadro 1). Los animales fueron alojados en jaulas individuales de 1 m de ancho por 1.96 m de longitud, provistas con comederos y bebederos (Figura 1).

Los corderos tuvieron un periodo de adaptación de 15 d a las dietas experimentales. Durante este periodo los animales se desparasitaron; internamente con fenbendazol (Panacur® suspensión al 10%; Intervet) y a los 15 d con closantel (closantil suspensión al 5%, Laboratorio Chioin); externamente con ivermectina (Virbamec®L.A. Virbac); se administraron vitaminas (A, D y E Vigantol, Bayer); se vacunaron con la bacterina toxoide (Triangle 8V®, Fort Dodge).

Cuadro 1. Pesos de los corderos al destete, distribuidos aleatoriamente en los diferentes tratamientos.

	Tratamientos		
	T1	T2	T3
	12.96 ± 0.45 ^a	12.84 ± 0.48 ^a	12.84 ± 0.51 ^a
CV	7.75	8.27	8.83

CV coeficiente de variación.

T1: Testigo 0% de parota.

T2: Inclusión de 30 % de vaina de parota.

T3: Inclusión de 40 % de vaina de parota.



Figura 1. Jaulas individuales

Dietas experimentales

Las dietas se formularon con el programa Nutrion[®] (Nutrion 2002) de acuerdo con los requerimientos nutritivos establecidos en tablas del NRC (1985) para ovinos machos enteros con un peso promedio de 16 kg y una ganancia diaria de peso de 200 g (Cuadro 2).

Análisis químico de la dieta

A las dietas experimentales se les determinó el contenido de materia seca, cenizas, nitrógeno total por el método Microkjeldahl (AOAC 1990); fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) de acuerdo a la metodología descrita por Van Soest *et al.* (1991).

Recolección de la vaina de parota

La recolección de la vaina de parota se realizó durante los meses de abril y mayo de 2014; en la ciudad de Puerto Escondido, y las comunidades de Bajos de chila y Pochutla; se obtuvieron 450 kg los cuales se secaron bajo la sombra, y se molieron en un molino de martillo a un tamaño de partícula de 3 mm (Figura 2).



Figura 2. Secado y molienda de la vaina de parota.

Tratamientos experimentales

Para los tratamientos (T) evaluados, se formularon dietas con un contenido nutricional isoprotéico (16 % PC) e isoenergético (2.8 Mcal EM/Kg MS) (Cuadro 2). Los ovinos fueron alimentados diariamente a las 06:00 y 16:00 h a libre acceso.

Muestreo de líquido ruminal

Las muestras de líquido ruminal (100 mL animal⁻¹) se colectaron vía esofágica por medio de una sonda (Figura 3), 2 h después de la alimentación de las 06:00 h, para lo cual se muestrearon los 5 animales de cada tratamiento a los 49 días de haber iniciado el experimento.

En las muestras de líquido ruminal se midieron las variables fermentativas del rumen (pH y AGV) y microbiológicas (concentración de bacterias totales, bacterias celulíticas y protozoarios).



Figura 3. Extracción de líquido ruminal.

Cuadro 2. Composición de las dietas experimentales (g 100 g⁻¹ MS).

Ingredientes	Tratamientos		
	T1	T2	T3
Rastrojo de cacahuete	11.4	11.7	12.0
Heno de alfalfa	66.6	50.3	42.0
Maíz	0.0	6.0	4.0
Concentrado comercial	20.0	0.0	0.0
Vaina de parota	0.0	30.0	40.0
Premezcla mineral	2	2	2
Total	100	100	100
PT (%)	16.6	16.6	16.6
EM, Mcal kg ⁻¹	2.80	2.80	2.80

T1: Testigo 0% de parota.

T2: Inclusión de 30 % de vaina de parota.

T3: Inclusión de 40 % de vaina de parota.

Variables evaluadas

Consumo y rechazo de alimento

Se cuantificó diariamente el alimento consumido, registrando la cantidad ofrecida y la cantidad rechazada, el consumo voluntario se obtuvo por la diferencia entre ambos valores (g d^{-1}).



Figura 4. Recolección de alimento rechazado.

Cambios de peso vivo

Los ovinos fueron pesados al inicio del experimento y posteriormente cada 15 d, antes de ofrecer el alimento (06:00 h). La ganancia diaria de peso (GDP, en kg), se calculó por diferencia entre el peso final menos el peso inicial de cada animal, dividido entre los días transcurridos en el periodo evaluado.

Eficiencia alimenticia

Se obtuvo dividiendo la GDP (kg), entre el consumo de materia seca del alimento (kg).

Conversión alimenticia

Se obtuvo dividiendo la GP (kg) total por periodo, entre el consumo de materia seca total por perdido.

Determinación del pH ruminal

Se midió inmediatamente después de recolectar el líquido ruminal con un potenciómetro portátil (Thermo Orion® modelo 290), calibrado a dos niveles de pH (4.0 y 7.0).



Figura 5. Potenciómetro utilizado para medir pH.

Concentración de AGV.

La concentración de AGV, se determinó a los 49 d de haber iniciado el experimento, por medio de cromatografía de gases; se transfirieron 1 mL de cada una de las muestras en tubos Eppendorf de 2.0 mL que contenían 0.25 mL de ácido metafosfórico al 25 %. En una centrifuga (Eppendorf 5810R) se centrifugaron a 11 000 rpm por 10 min a 4°C. Posteriormente, se tomó el sobrenadante y se colocó en viales para cromatografía. La concentración de AGV se determinó en un cromatógrafo de Gases Perkin Elmer modelo Clarus 500 con automuestreador y una columna capilar Elite FFAP. Las condiciones usadas fueron: velocidad del gas acarreador nitrógeno, 15 mL min⁻¹; volumen de inyección, 1µL de muestra; temperaturas de inyector, detector y horno, 200, 250 y 140 °C, respectivamente, tiempo de retención del acetato 2.19 min, propionato 2.62 min, butirato 3.14 min y un tiempo total de corrida de 5 min (Pérez 2006).

Concentración de bacterias ruminales totales

La determinación de la concentración de bacterias ruminales se realizó a los 49 d de haber iniciado el experimento, por método directo en una cámara Neubauer-improved y un microscopio óptico (MOTIC®, modelo DMB3), tiñendo la última dilución con 1 gota de azul de metileno y observando a una magnificación total de 40X, el procedimiento se realizó de acuerdo a lo descrito en el manual de operación SIGMA (1990). La concentración de bacterias mL⁻¹ de fluido ruminal se estimó de acuerdo con la siguiente fórmula:

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

Dónde:

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

FD: Factor de dilución.

25: Número de cuadros en la cuadrícula central.

50000: Constante de la cámara.

Concentración de bacterias celulolíticas ruminales

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

Concentración de protozoarios ruminales

La concentración de protozoarios se determinó a los 49 d de haber iniciado el experimento. Se cuantificó por método directo en una cámara Neubauer-improved y microscopio óptico, a una magnificación total de 40X (Stewart *et al.* 1997), para mantener la integridad de las células microbianas se fijaron 5 mL de líquido ruminal en 5 mL de solución para conteo de protozoarios (5 mL solución mineral I + 5 mL solución mineral II + 3 mL formaldehído al 3% aforadas a 87 mL con agua destilada) (Dehority 2003); se contó el número de protozoarios en 5 cuadros con un área de 1mm^2 y una profundidad de 0.1 mm. El número de protozoarios mL^{-1} se estimó de acuerdo con la siguiente fórmula:

Protozoos por mL = NP x FD x 50000

Dónde:

NP: Número de protozoarios contados.

FD: Factor de dilución.

50000: Constante de la cámara.

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

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

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

² Solución mineral 1: 6 g de K₂HPO₄ por cada 1000 ml de agua destilada.

³ Solución mineral 2: 6 g de KH₂PO₄; 6 g (NH₄)₂SO₄; 12 g NaCl; 2,45 g MgSO₄ y 1,6 g de CaCl₂ H₂O; por cada 1000 ml de agua destilada.

⁴ Solución de sulfato-cisteína: Agregar 2.5 g de L-cisteína en 50 ml de agua destilada, ajustar el pH a 10 con solución de NaOH al 10 % (4 N), añadir 2.5 g de Na₂S-10H₂O y aforar a 200 ml. Pasar la mezcla a un matraz de bola, calentar con flujo de CO₂ y se esteriliza 15 min a 121°C.

Cobos & Yokoyama (1995).

Estimación de la producción de CH₄ y CO₂

La estimación de la producción de metano se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Wolin (1960), mediante las siguientes formulas:

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

Donde:

Y = moles de CO₂

Ma = proporción molar de ácido acético

Mp = proporción molar de ácido propiónico

Mb = proporción molar de ácido butírico

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

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

Donde:

Z = moles de CH₄

Y = moles de CO₂

Ma = proporción molar de ácido acético

Mb = proporción molar de ácido butírico

Etapa 2. Experimento *in vitro*

Tratamientos experimentales

Se evaluaron mediante fermentación ruminal *in vitro* las tres dietas experimentales; T1, dieta testigo; T2, inclusión de 30 % de vaina de parota; T3, inclusión de 40 % de vaina de parota.

Montaje del sistema de producción de gas *in vitro*

Para medir la producción de biogás total se utilizaron 15 viales serológicos de vidrio de 100 mL, como biodigestores, los cuales se dividieron en 3 grupos de 5 biodigestores; de forma aleatoria a cada grupo de 5 viales se les asignaron los tratamientos respectivos, cada vial fue identificado con el número del animal, del cual se extrajo el inóculo.

Después de agregar las dietas, y bajo condiciones de anaerobiosis se adicionaron 45 ml de medio de cultivo GCAFR (Cuadro 2). Los viales fueron sellados con tapones de goma y arillos de aluminio. Se esterizaron a 121°C y 1.5 atm durante 15 min en Autoclave (LAB-MED), posteriormente fueron sometidos a prueba de esterilidad en una incubadora (RIOSSA, modelo E-71D), a una temperatura de 39 °C por 48 h.

Cuadro 4. Componentes del medio de cultivo glucosa, celobiosa, almidón y fluido ruminal (GCA-FR).

Ingrediente	Cantidad en 100 mL
Agua destilada	56.2
Fluido ruminal clarificado ¹	30.0
Solución mineral I ²	5.0
Solución mineral II ³	5.0
Resazurina al 0.1%	0.1
Trypticase peptona	0.20 g
Extracto de levadura	0.10 g
Glucosa	0.06 g
Celobiosa	0.06 g
Almidón	0.06 g
Carbonato de sodio 8%	5.0
Solución de sulfato cisteína ⁴	2.0

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

² Solución mineral 1: 6 g de K₂HPO₄ por cada 1000 ml de agua destilada.

³ Solución mineral 2: 6 g de KH₂PO₄; 6 g (NH₄)₂SO₄; 12 g NaCl; 2,45 g MgSO₄ y 1,6 g de CaCl₂ H₂O; por cada 1000 ml de agua destilada.

⁴ Solución de sulfato-cisteína: Agregar 2.5 g de L-cisteína en 50 ml de agua destilada, ajustar el pH a 10 con solución de NaOH al 10 % (4 N), añadir 2.5 g de Na₂S-10H₂O y aforar a 200 ml. Pasar la mezcla a un matraz de bola, calentar con flujo de CO₂ y se esteriliza 15 min a 121°C.

Cobos & Yokoyama (1995).

Para las trampas de biogás total se utilizaron 15 viales de 100 mL, a los cuales se les agregó solución salina ácida (400 g L⁻¹ de NaCl + HCl 2 N hasta disminuir el pH a 2.0; además, se agregó 0.5 % de anaranjado de metilo como indicador de pH), hasta su

llenado total; posteriormente, todos los viales fueron sellados con tapones de goma y arillos de aluminio.

Inóculo ruminal

El inóculo ruminal se obtuvo a partir de los ovinos alimentados con las dietas elaboradas para cada tratamiento, a los 49 d de haber iniciado el experimento. El fluido ruminal se colectó vía esofágica por medio de una sonda (Figura. 3), 2 h después de la alimentación de las 06:00 h, para lo cual se muestrearon los 5 animales de cada tratamiento, el contenido se filtró en manta de cielo a cuatro capas con la finalidad de eliminar las impurezas y se depositó en frascos cerrados herméticamente, los cuales fueron identificados por cada animal, se cubrieron para evitar su exposición a la luz del sol hasta su traslado al laboratorio. El fluido ruminal de cada animal experimental fue depositado en un matraz con flujo de CO₂ a 39 °C. El tiempo transcurrido entre la extracción del fluido y su inoculación en los biodigestores fue de 30 min.

Acoplamiento de biodigestores y trampas de gas

Los biodigestores fueron colocados en un baño maría (RIOSSA modelo BMME), hasta que se estabilizó la temperatura a 39 °C. Posteriormente los biodigestores fueron inoculados con 5.0 ml de fluido ruminal fresco con jeringas estériles desechables de 10 mL, en una campana de flujo laminar (Tecni-lab modelo LMGE7CM), bajo flama de mechero. En cada biodigestor se acopló una trampa de gas por medio de mangueras de Taygon® de 45 cm de largo (diámetro externo e interno de 3.63 x 2.38 mm), a las cuales se les colocaron en sus extremos agujas hipodérmicas (Nipro 20G x 31.8 mm). La manguera Taygon® fue asegurada con una pinza para evitar pérdidas de gas antes del montaje del sistema de producción de gas *in vitro*.

Las trampas contaron con una válvula de alivio (aguja hipodérmica 20G x 31.8 mm) para igualar la presión atmosférica. Finalmente, la trampa de gas fue colocada en forma invertida sobre una probeta de plástico de 50 ml, para medir el desplazamiento de la solución interna en la trampa de gas. Con la finalidad de evitar el estrangulamiento de la manguera, las probetas se adaptaron recortando en forma de triángulo la parte superior; el sistema de producción de gas *in vitro* fue cubierto con un lienzo de tela oscuro para evitar la entrada de luz (Figura 6).



Figura 6. Acoplamiento del sistema de producción de gas.

Variables evaluadas

Concentración de AGV

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

Producción de CH₄ y CO₂

Se registró el volumen de solución salina desplazada a diferentes tiempos, a las 0, 6, 12, 24, 48 y 72 h de incubación (Rodríguez 2009). Posteriormente, las trampas salinas

se almacenaron en refrigeración a 4°C hasta su posterior análisis. Las tapas de las trampas fueron cubiertas con parafilm, para evitar la pérdida de biogas. El gas capturado en las trampas de solución salina fue sometido a conductividad térmica por Cromatografía de Gases para determinar el porcentaje de CH₄ y CO₂ de cada una de las muestras. Se utilizó un cromatógrafo de gases (Perkin Elmer® modelo Clarus 500), con detector de conductividad térmica (TCD) y una columna PE 6'x1/8 ODSS: Propak 080/100. Se inyectó 0.1 ml de muestra de forma manual. Las características y condiciones del método fueron: a) temperatura de la rampa en el horno de inicio 28 °C min⁻¹, rampa 2.5°C min⁻¹, final 80°C 0.5 min⁻¹; b) temperatura del inyector TCD 130 °C; c) volumen de inyección 0.1 ml, d) flujo del gas acarreador (helio) 23.5 ml min⁻¹, y e) tiempo de retención fue: CH₄ 1 min ± 0.05 y CO₂ 2 min ± 0.05.

Degradabilidad *in vitro* de la materia seca

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



Figura 7. Biodigestores utilizados para la determinación de la degradabilidad ruminal.

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

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

Donde:

DIV %= Degradabilidad in vitro en porcentaje

MSi = Materia seca inicial (muestra)

PS = Peso constante del papel

DB = Degradabilidad de los blancos

PMS = Peso del papel más el residuo de la muestra

Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente aleatorio, teniendo como fuente de variación al tratamiento considerando el tipo de dieta. Para todas las variables evaluadas se realizó un análisis de varianza por medio del procedimiento PROC GLM del paquete estadístico SAS (SAS 2003) y la comparación de medias a través del estadístico de prueba Tukey (Daniel 2012). La concentración de bacterias celulolíticas se analizó mediante intervalos de confianza descritos por Harrigan & McCance (1979).

El modelo estadístico fue el siguiente:

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

Y_{ij} = Variable respuesta.

μ = Media general.

T_j = Efecto del j -ésimo tratamiento.

E_{ij} = Error experimental.

Resultados y Discusión

La composición química (MS, PC, FDN, FDA y su contenido de cenizas) de las dietas fue similar entre tratamientos (Cuadro 5).

Cuadro 5. Análisis químico (%) de las dietas experimentales.

Compuesto	T1	T2	T3
Materia seca	89.17	87.50	86.90
Proteína cruda	16.50	17.53	16.42
FDN	32.95	31.28	29.34
FDA	22.38	24.87	25.44
Cenizas	9.25	8.39	7.32

T1: Dieta Testigo.

T2: Dieta con la Inclusión de 30 % de vaina de parota.

T3: Dieta con la Inclusión de 40 % de vaina de parota.

Consumo de materia seca

El consumo de MS fue similar ($P > 0.05$) entre tratamientos, entre periodos de tiempo y en el promedio general (Cuadro 6). La inclusión de la vaina de parota en las dietas 2 y 3, no afectó negativamente el consumo de materia seca (CMS) por parte de los ovinos de los distintos tratamientos.

Se ha determinado que el consumo voluntario máximo de MS de vaina de parota en MS se encuentra en un porcentaje de inclusión en la ración del 31 al 48 (González *et al.* 1989, Amaro *et al.* 1993); los valores anteriores son similares a los utilizados en este experimento. El consumo voluntario reportado en el presente estudio coincide con los reportes de Briceño *et al.* (2012), quienes no encontraron diferencias en el consumo voluntario al incluir vaina de parota en 45% en la dieta de ovinos pelibuey, comparado con una dieta testigo; de igual manera Esquivel-Mimenza *et al.* (2010), no encontraron diferencias al incluir en la dieta 20, 30, 40 y 50% de vaina de parota, esta tendencia también fue reportada por Peralta *et al.* (2004). Por otra parte, Francis *et al.* 2002 reportan un aumento en el consumo de materia seca al incrementar la cantidad de parota en la ración, afirmando que las saponinas tienen efectos positivos sobre el consumo voluntario; además, este aumento disminuye la cantidad de FDN, FDA, y

también ejerce un efecto importante en los microorganismos del rumen, favoreciendo la degradación de la fibra.

Cuadro 6. Consumo de materia seca ($\text{kg animal}^{-1} \text{d}^{-1}$) en corderos postdestete, alimentados con una dieta con diferentes proporciones de vaina de parota.

Periodos de tiempo	Tratamientos			Significancia
	T1	T2	T3	
Días				
7	0.908±0.054	0.877±0.079	0.992±0.035	NS
14	1.087± 0.035	0.983±0.082	1.140±0.025	NS
21	1.182± 0.039	1.104±0.074	1.270±0.051	NS
28	1.298± 0.047	1.251±0.086	1.309±0.072	NS
35	1.355± 0.048	1.318±0.083	1.368±0.068	NS
42	1.360± 0.049	1.326±0.074	1.369±0.071	NS
49	1.431±0.043	1.438±0.064	1.495±0.058	NS
MEDIA	1.23±0.03	1.19±0.04	1.27±0.03	NS

NS = Medias en misma hilera son estadísticamente iguales ($P>0.05$).

T1: Testigo 0% de parota.

T2: Inclusión de 30 % de vaina de parota.

T3: Inclusión de 40 % de vaina de parota.

Ganancia de peso

La ganancia diaria de peso (GDP) fue similar ($P>0.05$) entre tratamientos y en los diferentes periodos de tiempo (Cuadro 7).

Las dietas experimentales se formularon para obtener una GDP de 200 a 250 $\text{g animal}^{-1} \text{d}^{-1}$; sin embargo, las GDP obtenidas fueron menores en los distintos tratamientos; para la dieta testigo fue de $123 \pm 11.72 \text{ g animal}^{-1} \text{d}^{-1}$, para la dieta que contenía de 30 % de vaina de parota fue de $108.57 \pm 12.14 \text{ g animal}^{-1} \text{d}^{-1}$ y para la dieta que contenía 40 % de vaina de parota fue de $133.06 \pm 12.28 \text{ g animal}^{-1} \text{d}^{-1}$. A pesar de ello, las GDP de los ovinos del presente experimento, se encuentran en el rango óptimo para ovinos de pelo en México, el cual va de 90 a 181 $\text{g animal}^{-1} \text{d}^{-1}$ (Reséndiz 2011).

Cuadro 7. Ganancia de peso vivo ($\text{g animal}^{-1} \text{d}^{-1}$) en corderos postdestete, alimentados con una dieta con diferentes proporciones de vaina de parota

Periodo de tiempo	Tratamientos			Significancia
	T1	T2	T3	
Días				
7	102.86±14.57	80.00±16.66	131.43±19.38	NS
14	102.86±17.14	97.14±11.43	131.43±19.38	NS
21	137.14±24.58	137.14±22.86	154.29±17.14	NS
28	131.43±19.38	102.86±11.43	120.00±14.00	NS
35	114.28±28.57	108.29±20.20	108.57±10.69	NS
42	131.43±07.00	114.29±70.00	137.14±14.00	NS
49	142.86±20.20	120.16±70.00	148.57±22.85	NS
MEDIA	123.27±11.72	108.57±12.14	133.06±12.28	NS

NS = Medias en misma hilera son estadísticamente iguales ($P>0.05$).

T1: Testigo 0% de parota.

T2: Inclusión de 30 % de vaina de parota.

T3: Inclusión de 40 % de vaina de parota.

Las GDP obtenidas en el presente experimento coinciden con los reportes de Moscoso *et al.* 1995, Álvarez *et al.* 2003, Peralta *et al.* 2004, Briceño *et al.* (2012), quienes no encontraron diferencias en las ganancias diarias de peso al incluir distintas proporciones de vaina de parota en la ración. Sosa *et al.* (2004), reportaron GDP de 120 g d^{-1} al incluir *Guazuma ulmifolia* en la ración para ovinos; por su parte, Moscoso *et al.* (1995), al incluir 36 % de parota en la ración como sustituto de grano de sorgo y pasta de algodón en borregos Katahdin, Black Belly y sus cruza, obtuvieron valores promedio de 223 g d^{-1} , los cuales fueron superiores a los obtenidos en el presente

estudio; sin embargo, esta diferencia puede ser explicada por las características genéticas de razas utilizadas. En otro estudio realizado por Peralta *et al.* (2004), al incluir 10, 20 y 30% de harina de parota en sustitución del grano de maíz en dietas para ovinos de la raza pelibuey de 3.5 meses de edad, reportaron GDP de 168, 160 y 125 g d⁻¹ respectivamente. Álvarez *et al.* (2003), obtuvieron GDP de 86.74 g d⁻¹, al incluir 30 % de vaina de parota en la dieta de ovinos hembras de 2 meses de edad, las menores GDP en este experimento pueden ser atribuidas a la variable sexo.

Conversión alimenticia

La conversión alimenticia fue similar ($P>0.05$) entre tratamientos, considerando los diferentes periodos de tiempo y el promedio general (Cuadro 8). Los resultados de esta investigación coinciden con los datos reportados por Álvarez *et al.* (2003) y Peralta *et al.* (2004), quienes no encontraron diferencias en la conversión alimenticia al incluir 30 % de vaina de parota en una dieta de ovinos.

Los índices de conversión alimenticia que se obtuvieron en el presente estudio son superiores a los encontrados en otros estudios en condiciones similares. Álvarez *et al.* (2003), reportaron un índice de conversión alimenticia de 7.5; Peralta *et al.* (2004), reportaron una conversión alimenticia de 3.9; Pérez *et al.* (2010), al utilizar follaje de *G. ulmifolia*, obtuvieron índices de conversión alimenticia de 5.8; en contraste, Bonilla (1999), reporta valores de conversión alimenticia de 9 al incluir 48 % de harina de vaina de parota; de igual manera González-Garduño *et al.* (2011), reportaron para ovinos de pelo valores de conversión alimenticia de 9; los datos antes mencionados son muy similares a los reportados en el presente experimento. La variación de la conversión alimenticia entre las distintas investigaciones y los resultados obtenidos en el presente estudio, pueden deberse al efecto de la raza, la edad y sexo de los corderos, las anteriores variables afectan la conversión alimenticia de acuerdo a las diferentes condiciones en que se realizó cada uno de los diferentes estudios (Avendaño *et al.* 2004).

Cuadro 8. Conversión alimenticia en corderos postdestete alimentados con una dieta con diferentes proporciones de parota.

Periodo de tiempo	Tratamientos			Significancia
	T1	T2	T3	
Días				
7	9.37±0.96	12.08±1.67	8.19±1.20	NS
14	11.91±2.13	10.46±0.97	9.42±1.34	NS
21	9.46±1.25	8.68±0.94	8.80 ± 1.30	NS
28	10.50±1.09	12.49±1.46	11.59 ± 1.60	NS
35	13.68±1.88	12.15±0.49	13.09 ±1.39	NS
42	10.46±0.68	11.58±0.97	10.68±1.76	NS
49	7.70±0.10	10.08±1.62	8.04±1.46	NS
MEDIA	10.44±0.60	11.07±0.52	9.97±1.18	NS

NS = Medias en misma hilera son estadísticamente iguales ($P>0.05$).

T1: Testigo 0% de parota.

T2: Inclusión de 30 % de vaina de parota.

T3: Inclusión de 40 % de vaina de parota.

Eficiencia alimenticia

La eficiencia alimenticia fue similar ($P>0.05$) entre tratamientos en los diferentes periodos de tiempo y en el promedio general (Cuadro 9). Los resultados del presente experimento coinciden con los reportes de Álvarez *et al.* (2003), quienes al incluir 30 % de vaina de parota en la dieta para corderas de la raza pelibuey de 60 d de edad, no encontraron diferencias con relación a una dieta testigo; aunque el índice de eficiencia alimenticia fue ligeramente mayor (147 g d^{-1}), esto puede ser debido a la edad de las corderas al iniciar el experimento. Por su parte Jaramillo *et al.* (2008), obtuvieron una eficiencia alimenticia de 125 g para ovinos de pelo, siendo similar al obtenido en el presente experimento. Moscoso *et al.* (1995), reportaron un índice de eficiencia alimenticia de 138 g d^{-1} , en corderos de la raza Katahdin, Blackbelly y sus cruza al incluir 36 % de vaina de parota en la dieta; por otra parte, Pérez *et al.* (2011), obtuvieron un índice de eficiencia alimenticia de 177 g d^{-1} , para ovinos de pelo con diferentes grado de encaste de las razas Pelibuey, Dorper y Katahdin de tres meses de

edad. El menor índice de eficiencia alimenticia obtenido en el presente experimento puede ser explicado por el tipo racial de los ovinos, puesto que las características genéticas del animal y la composición química de la dieta son los principales factores que afectan la eficiencia alimenticia (Lanza *et al.* 2003).

Cuadro 9. Eficiencia alimenticia en corderos postdestete (kg día^{-1}) alimentados con una dieta con diferentes proporciones de parota.

Periodo de tiempo	Tratamientos			Significancia
	T1	T2	T3	
Días				
7	0.111±0.011	0.091±0.015	0.133±0.020	NS
14	0.094±0.016	0.098±0.007	0.116±0.018	NS
21	0.115±0.018	0.121±0.013	0.124±0.039	NS
28	0.100±0.011	0.082±0.007	0.093±0.012	NS
35	0.083±0.018	0.083±0.004	0.081±0.010	NS
42	0.097±0.006	0.089±0.008	0.102±0.014	NS
49	0.099±0.012	0.078±0.011	0.100±0.017	NS
MEDIA	0.100±0.007	0.090±0.004	0.106±0.012	NS

NS = Medias en misma hilera son estadísticamente iguales ($P>0.05$)

T1: Dieta Testigo.

T2: Dieta con la Inclusión de 30 % de vaina de parota.

T3: Dieta con la Inclusión de 40 % de vaina de parota.

En otras investigaciones, Peralta *et al.* (2004), incluyeron 30 % de vaina de parota en una dieta para ovinos y obtuvieron un índice de eficiencia alimenticia de 214 g d^{-1} , lo anterior se puede explicar por el bajo porcentaje de forraje utilizado en la dieta (20 %), con lo cual disminuyó el contenido de FDN e incrementó la cantidad de carbohidratos de fácil fermentación y con ello aumentó la energía disponible para mantenimiento y ganancia de peso (Gill & Oldham 1993).

Valores de pH y concentración de microorganismos ruminales

En los valores de pH obtenidos (Cuadro 10) no se encontraron diferencias significativas ($P>0.05$) entre los distintos tratamientos, se mantuvieron dentro del rango de 6.2 a 7.2,

lo cual indica que se presentaron las condiciones adecuadas para la actividad de los microorganismos ruminales.

El comportamiento del pH del medio ruminal en el presente estudio vario entre 6.87 ± 0.06 y 7.20 ± 0.04 , encontrándose dentro del rango de pH óptimo para la actividad y desarrollo de la microbiota ruminal (Yokoyama & Johnson 1988); los resultados del presente experimento coinciden con los valores obtenidos por Negron *et al.* (1993), quienes reportaron un pH de 6.8, al incluir el 50 % de vaina de parota; de igual manera Hess *et al.* (2003), al incluir 20 % de parota en la dieta obtuvieron un valor de pH de 6.80; al respecto Patra & Saxena (2009a), mencionaron que los efectos de los diferentes metabolitos de plantas se encuentran regulados por el pH ruminal; mostrando mayor actividad antimicrobiana a pH ácidos (Li *et al.* 2009).

En la concentración de bacterias totales no se encontraron diferencias significativas ($P>0.05$) entre los distintos tratamientos (Cuadro 10), sus valores están en el rango normal de 10^9 - 10^{12} bacterias por mL^{-1} de fluido ruminal. Los resultados obtenidos coinciden con los datos reportados por Hess *et al.* (2003), quienes mediante estudios *in vitro* evaluaron la inclusión de 20% de parota en una dieta como fuente de saponinas y no encontraron diferencias en la concentración de las bacterias totales del rumen. De igual manera Sliwinski *et al.* (2002), no reportaron algún efecto en la concentración de bacterias totales al agregar en condiciones *in vitro*, concentraciones de saponinas bajas, medias y altas. Aunque, se ha mencionado que la incorporación de saponinas en la dieta disminuye la concentración de bacterias ruminales, debido a su actividad antibacteriana sobre todo contra las bacterias Gram positivas (Patra & Saxena 2009a), los efectos son variables; y pueden ser potencializados por el pH ruminal que tiende hacia la acidez; Li *et al.* (2009), han demostrado que las saponinas de té (tipo triterpenoides) mostraron una mejor actividad antimicrobiana *in vitro* a un pH menor a 6.2. Por otra parte, Sen *et al.* (1998), mencionaron que la población microbiana del rumen se puede mejorar con un bajo suministro de saponinas; sin embargo, se reduce cuando las dosis llegan a ser excesivas (Wallace *et al.* 1994, Cheeke 1996, Sen *et al.* 1998). Considerando lo anterior y tomando en cuenta que la concentración de saponinas en la vaina de parota son relativamente bajas (Babayemi 2006), y teniendo

en cuenta que se obtuvo pH mayor a 6.3 en los tratamientos del presente experimento, ello pudo ser la causa de que no existiera una disminución en la concentración de bacterias totales al incluir la vaina de parota en la dieta de ovinos de pelo.

La concentración de bacterias celulolíticas (Cuadro 10) no presentó diferencias significativas ($P > 0.05$), en los distintos tratamientos; las concentraciones estimadas de este tipo de microorganismos ruminales fueron de 10^5 mL^{-1} de fluido ruminal, las cuales se encuentran dentro del rango óptimo de una adecuada fermentación ruminal. Estos resultados coinciden con los reportados por Galindo *et al.* (2001), quienes al evaluar en condiciones *in vitro* follaje de parota, no encontraron diferencias en la concentración de bacterias celulolíticas. Aunque, las investigaciones sobre el efecto en las concentraciones de bacterias celulolíticas del rumen utilizando vaina de parota en la dieta de rumiantes, aun son escasas; algunos autores mencionaron que las saponinas ejercen un efecto inhibitorio en la concentración de las bacterias celulíticas (Wallace *et al.* 1994, Babayemi *et al.* 2004, Zhou *et al.* 2011). Wallace *et al.* (1994) reportaron que el extracto de saponinas de yuca, inhibe el crecimiento de *Butyrivibrio fibrisolvens* y *Streptococcus bovis* y estimulan el crecimiento de *Prevotella ruminicola*. En estudios realizados por Zhou *et al.* (2011), al evaluar saponinas extraídas de té (*Camellia sinensis*) observaron una disminución en la concentración de *Ruminococcus flavefaciens* y *Fibrobacter succinogenes*, de igual manera Wang *et al.* (2000), mencionaron que la actividad de *Fibrobacter succinogenes* no se vio afectada, pero si las poblaciones de *Ruminococcus albus* y *Ruminococcus flavefaciens*; estos estudios sugieren claramente que existen efectos sobre algunas especies específicas sensibles a las saponinas, lo que podría ofrecer una manipulación selectiva del metabolismo ruminal (Patra & Saxena 2009a). Patra & Yu (2013), observaron que la adición de dosis bajas de saponina combinada con nitrato, aumentan la población de *Fibrobacter succinogenes*, mientras que al utilizar dosis altas se provoca su reducción. En contraste, al utilizar parota en la dieta se ha reportado un incremento en la concentración de bacterias celulolíticas (Newbold *et al.* 1997), al respecto Wang *et al.* (2000) reportan que las saponinas de *Yucca schidigera* alteran la pared celular de bacterias no celulolíticas; en tanto, Russell & Rychlik (2001), mencionaron que al incluir saponinas en las dietas con alto porcentaje de concentrado se puede reducir la

incidencia de acidosis al inhibir el crecimiento de *Streptococcus bovis*. También se ha mencionado que las leguminosas forrajeras como componentes de la ración son adecuadas fuentes de proteína, lo cual propicia mayor disponibilidad de compuestos como amoniaco, aminoácidos, péptidos, así como ácidos grasos de cadena corta ramificados (Hoover & Stokes 1991, Galindo *et al.* 2009), sustancias que incrementan el crecimiento microbiano, en particular de las bacterias celulolíticas; por tanto, favorecen la degradación de la fibra (Hoover & Stokes 1991); además, la concentración de FDN y FDA fue similar en los tratamientos, lo que podría explicar por qué no existieron diferencias significativas en los tratamientos evaluados.

Cuadro 10. Valores de pH y concentración de bacterias totales, bacterias celulolíticas y protozoarios (por mL⁻¹ de fluido ruminal), en corderos alimentados con dietas con diferentes proporciones de parota.

Parámetros	Tratamientos		
	T1	T2	T3
pH	7.12±0.25 ^a	7.20±0.14 ^a	6.87±0.06 ^a
Bacterias totales 10 ¹⁰ mL ⁻¹	1.76±0.260 ^a	1.83±0.174 ^a	1.27±3.02 ^a
Bacterias celulolíticas 10 ⁵ mL ⁻¹	9.26 ^a	7.48 ^a	3.92 ^a
Protozoarios 10 ⁶ mL ⁻¹	11.16±0.234 ^a	5.93±0.331 ^{ab}	4.56±1.058 ^b

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

T1: Dieta Testigo.

T2: Dieta con la Inclusión de 30 % de vaina de parota.

T3: Dieta con la Inclusión de 40 % de vaina de parota.

Por otra parte, la concentración de protozoarios (Cuadro 10), fue mayor (P<0.05) en el T1, la concentración de protozoarios del T2 fue similar a los T1 y T3; en contraste, al incrementar el porcentaje de vaina de parota, disminuyo la concentración de protozoarios.

Se ha demostrado que el pH del líquido ruminal ejerce un efecto en el crecimiento de las poblaciones de protozoarios, por lo que un pH mayor de 7.8 o menor de 5.5 puede provocar una disminución significativa en la concentración de protozoarios (Dehority

2003); sin embargo, en el presente experimento, el pH se mantuvo en el intervalo de 6.87 a 7.20, por lo que la disminución en la concentración de protozoarios no puede ser atribuido a esta variable; probablemente fue causada por el contenido de saponinas presentes en la vaina de parota incluida en la dieta.

La reducción de la concentración de protozoarios en el rumen de ovinos, debido a la inclusión de parota en la dieta, se ha reportado en numerosos estudios (Leng *et al.* 1992; Navas-Camacho *et al.* 1992, Chaudhary *et al.* 1997); lo cual coincide con los resultados obtenidos en el presente estudio. Ivan *et al.* (2004), al incluir 16.6 % de follaje de parota en la dieta observaron una reducción en la concentración de protozoarios; por su parte, Zhou *et al.* (2011), observaron una reducción en la población de protozoarios con el suministro de saponinas de té verde (*Camellia sinensis*) en la dieta de ovinos. Hu *et al.* (2005), reportaron una disminución en la concentración de protozoarios al incluir diferentes niveles de concentrados de saponinas; Navas-Camacho *et al.* (1992), indicaron que el follaje de parota y *Sapindus saponaria* presentan un efecto defaunante debido a la presencia de sustancias detergentes, como las saponinas. Al respecto Moss *et al.* (2000), mencionaron que las saponinas son tóxicas para los protozoarios del rumen, cuyo efecto parece estar mediado por su capacidad para formar complejos con los esteroides de las membranas celulares, produciendo grandes poros en las mismas, lo cual altera su permeabilidad provocando la lisis celular (Francis *et al.* 2002), lo que traería como consecuencia la reducción de la producción de CH₄. Debido a que existe una endosimbiosis entre protozoarios y *Archeas* metanogénicas, que ejercen un efecto importante en la disminución de la metanogénesis, consecuentemente animales defaunados tienden a reducir la emisión entérica de CH₄. Debido al incremento en la relación acetato/propionato y en el flujo de células microbianas desde el rumen, ambos eventos considerados sumideros de electrones (Leng 2014). Sin embargo, el efecto antiprotozoario de las saponinas puede ser transitorio (Koenig *et al.* 2007) y no es siempre acompañado por una disminución en la producción de CH₄ (Goel *et al.* 2008). Guo *et al.* (2008) mencionaron que con saponinas de hojas de té de saponinas disminuyó la población de protozoarios en 50 %, sin afectar la población de metanogenos pero redujo la metanogenesis en un 8%.

Concentración de AGV CH₄ y CO₂ en el ensayo *in vivo*

La producción de los distintos AGV en el rumen se considerada como uno de los principales índices de fermentación ruminal, y representan el patrón de fermentación ruminal y la eficiencia de la degradabilidad de los nutrientes del alimento, la concentración total se encuentra en el intervalo de 30 – 200 mol L⁻¹ (Dijkstra *et al.* 2005), y su producción tanto como sus proporciones individuales están influenciadas por la composición de la materia orgánica de la dieta, del tipo y concentración de carbohidratos en la dieta fermentada, así como del consumo de materia seca (Calsamiglia & Ferret 2002). La producción total de AGV en el presente experimento fue mayor (P<0.05) en T1, en comparación con T2; pero similar (P>0.05) a T3 (Cuadro 11). La concentración de acetato fue mayor (P<0.05) en T1, presentándose la menor concentración (P<0.05) en los tratamientos T2 y T3. La concentración de ácido propiónico fue mayor en los tratamientos donde se incluyó vaina de parota (P<0.05); en contraste, la menor concentración (P<0.05) fue obtenida en el T1. La concentración de butirato fue similar (P>0.05) entre los distintos tratamientos.

Los resultados de distintos estudios *in vivo* acerca de la concentración de los AGV en el líquido ruminal al incorporar vaina de parota en la alimentación de rumiantes aún son escasos (Patra & Saxena 2009a, Castro-Montoya *et al.* 2011). Por otra parte existe mayor información sobre las saponinas, metabolitos secundarios contenidos en la vaina de parota, por su parte Malecky *et al.* (2009), al utilizar compuestos terpenoides, encontraron una ligera disminución en la concentración de AGV totales, lo cual coincide con los resultados obtenidos en el presente estudio, donde se muestra una disminución en la concentración total de AGV al incorporar vaina de parota en la dieta; sin embargo, contrasta con los resultados obtenidos por Hess *et al.* (2003), al utilizar 20% de vaina de parota y Koenig *et al.* (2007), al agregar 20% de forraje de parota; en ambos estudios no se encontraron diferencias en la concentración total de AGV, ni en el porcentaje de acetato, además, reportaron un menor porcentaje de propionato, lo cual puede ser explicado por la baja concentración utilizada, y con ello escaso efecto de las saponinas sobre los microorganismos ruminales o por su adaptación a estos compuestos. Hussain & Cheeke (1995), encontraron en estudios *in vivo* una menor concentración de propionato, al utilizar 75 ppm de saponinas de yuca; sin embargo,

Valdez *et al.* (1986) y Wu *et al.* (1994), no observaron cambios significativos en la concentración de propionato en estudios *in vivo* al agregar saponinas en concentración de 77 y 125 ppm respectivamente, lo que sugiere que la respuesta de las saponinas en la producción de AGV del rumen es variable (Hess *et al.* 2003; Beauchemin *et al.* 2008; Guo *et al.* 2008) y no solo dependen de la concentración existente, sino también depende de su interacción con la dieta (Patra & Saxena 2009b).

La disminución en la concentración de acetato por efecto de las saponinas en el presente estudio es consistente con lo reportado en distintas investigaciones (Lila *et al.* 2003, Santoso *et al.* 2004, Devant *et al.* 2007, Guo *et al.* 2008, Holtshausen *et al.* 2009), aunque este efecto ha sido relacionado con dietas altas en grano y en particular a pH de 5.5 a 6.0 (Hess *et al.* 2003); en la presente investigación los niveles de pH se mantuvieron entre 6.8 a 7.1; por lo tanto, la disminución de acetato puede ser explicada por la disminución en la concentración de protozoarios ruminales. Williams & Coleman (1997), mencionan al respecto que el acetato es uno de los principales productos de desecho de la degradación de azúcar por parte de los protozoarios ruminales; aunado a ello, algunas especies de bacterias celulolíticas (*R. albus* y *R. flavefaciens*), y ciertas especies de hongos ruminales (*Neocallimastix frontalis* y *Piromyces rhizinflata*) están relacionados con una mayor producción de acetato, los cuales son inhibidos por la presencia de saponinas (Patra & Saxena 2009a), lo que origina una menor concentración de acetato.

También se ha reportado que las saponinas estimulan el crecimiento de *Selenomonas ruminantium* (Wang 2000), microorganismo responsable de la producción de propionato en el rumen (Wolin 1997). El incremento de la concentración de propionato se traduce en una mayor eficiencia de utilización de la energía por el animal; por su parte, Goodrich *et al.* (1984) y Weimer (1998), mencionan que en la engorda de ganado, es recomendable una menor proporción de ácido acético y una mayor concentración de ácido propiónico, esta situación se presentó en la presente investigación.

Se ha estimado que la contribución de CH₄, por parte del ganado ovino, se encuentra en el rango de 2.5 a 4.0% del CH₄ total producido por las actividades pecuarias (Crutzen *et al.* 1986). En el presente estudio, la mayor concentración de CH₄ se

determinó en T1, que consistió en la dieta testigo ($P < 0.05$), en relación a los tratamientos T1 y T2 donde se incluyó vaina de parota en las dietas; los resultados obtenidos en esta investigación difieren con los estudios reportados por Briceño *et al.* (2012), donde incorporaron 45% de vaina de parota, y no encontraron diferencias en la concentración de metano estimado; sin embargo, en este estudio no midieron la concentración de AGV, los cuales fueron estimados a partir de la cantidad de almidón y celulosa aportada en la dieta, razón que explica el por qué sus resultados varían con los obtenidos en la presente investigación. Por su parte, Zhou *et al.* (2011), en un estudio *in vivo* reportaron una reducción de la producción de CH_4 , en ovinos de la raza Hu, alimentados con saponinas de plantas de té, atribuyendo esta reducción al efecto negativo que las saponinas ejercen sobre los protozoarios ruminales.

Cuadro 11. Concentración de AGV, CH_4 y CO_2 en muestras de líquido ruminal (*in vivo*), en corderos alimentados con dietas con diferentes proporciones de parota

Parámetros	Tratamientos		
	T1	T2	T3
Total AGV mol L ⁻¹	210.44 ± 5.03 ^a	198.58 ± 5.17 ^{ab}	188.58 ± 2.03 ^b
Acetato %	50.58 ± 0.95 ^a	47.29 ± 0.26 ^b	45.99 ± 0.70 ^b
Propionato %	32.65 ± 0.51 ^b	36.86 ± 1.08 ^a	39.27 ± 0.59 ^a
Butirato %	16.76 ± 0.50 ^a	15.85 ± 1.08 ^a	14.72 ± 0.77 ^a
* CO_2 mol L ⁻¹	58.60 ± 0.61 ^a	56.63 ± 1.34 ^a	54.90 ± 0.86 ^a
* CH_4 mol L ⁻¹	25.51 ± 0.38 ^a	22.35 ± 0.81 ^b	20.53 ± 0.44 ^b

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

*estimado a partir de fórmulas (Wolin 1960).

T1: Dieta Testigo.

T2: Dieta con la Inclusión de 30 % de vaina de parota.

T3: Dieta con la Inclusión de 40 % de vaina de parota.

Se ha estimado que la relación simbiótica entre los protozoarios y metanógenos del rumen es responsable de la producción de 9 a 25% del CH_4 total (Newbold *et al.* 1995),

lo cual coincide con los resultados del presente estudio en donde la concentración de protozoarios disminuyó al agregar vaina de parota, teniendo la menor concentración en el T3; además, el porcentaje de propionato aumentó. Se ha propuesto que las saponinas favorecen la producción de propionato en el rumen, un factor que puede además reducir la formación de CH₄, ya que este AGV puede servir como un receptor de H₂ (Lila *et al.* 2003, Wina *et al.* 2005; Pen *et al.* 2006). La producción estimada de CO₂ en los distintos tratamientos no presentó diferencias (P>0.05).

Concentración de AGV CH₄ y CO₂ en el ensayo *in vitro*

La producción total de AGV en el ensayo *in vitro* no mostró diferencias significativas (P>0.05) entre los tratamientos (Cuadro 12). La menor concentración de acetato se obtuvo (P<0.05) en T3, el cual fue similar al T2; presentándose la mayor concentración (P<0.05) en T1. La concentración de ácido propiónico fue mayor en T2 y T3 donde se incluyó la vaina de parota (P<0.05); en tanto que, la menor concentración (P<0.05) se obtuvo en T1, el cual fue similar al T2; La concentración de butirato no presentó diferencias significativas (P>0.05) entre los tratamientos. La producción de CO₂ determinada mediante cromatografía de gases a partir de las trampas de gas, fue mayor (P<0.05) en T3. La mayor concentración de CH₄ se encontró en T1 (P<0.05), en tanto que la menor producción de CH₄ se obtuvo en T2 y T3, en donde se incluyó vaina de parota.

Wang *et al.* (2000), no encontraron diferencias significativas en la concentración total de AGV, al agregar extracto de *Yucca schidigera*, en un sistema *in vitro*; por su parte, Anugara *et al.* (2014), al realizar un meta-análisis del efecto de las saponinas, mencionó que se presentó un incremento en la concentración de propionato y una disminución en las concentraciones de acetato, así como en la concentración de protozoarios, acompañado también de reducción en la población de hongos, bacterias celulolíticas y concentración de CH₄, lo cual coincide con lo encontrado en el presente estudio; sin embargo, difiere de lo reportado por Wei-Lian *et al.* (2005), quienes al agregar 13-26 mg de saponinas de hojas de té, no encontraron diferencias en la concentración individual y total de AGV pero si en la concentración de CH₄.

Cuadro 12. Concentración de AGV, CH₄ y CO₂, DVIM durante una fermentación *in vitro* después de 72 h de incubación.

Parámetros	Tratamientos		
	T1	T2	T3
Total AGV mol L ⁻¹	67.84±5.72 ^a	80.02±5.23 ^a	81.86±4.12 ^a
Acetato %	75.52±0.95 ^a	73.23±1.95 ^{ab}	68.52±0.20 ^b
Propionato %	15.04±0.98 ^b	16.67±1.60 ^{ab}	20.71±0.55 ^a
Butirato %	9.42±0.12 ^a	10.10±0.42 ^a	10.76±0.69 ^a
CO ₂ %	88.07±0.75 ^b	89.54±0.64 ^{ab}	91.40±0.66 ^a
CH ₄ %	11.93±0.75 ^a	10.46±0.64 ^{ab}	8.60±0.66 ^b
DIVM %	52.48±1.46 ^a	49.63±1.04 ^{ab}	47.86±0.83 ^b

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

T1: Dieta Testigo.

T2: Dieta con la Inclusión de 30 % de vaina de parota.

T3: Dieta con la Inclusión de 40 % de vaina de parota.

En diversos estudios en condiciones *in vitro* (Kita *et al.* 1996, Hess *et al.* 2003, Koenig *et al.* 2007, Holtshausen *et al.* 2009), se ha señalado que la incorporación de parota o saponinas en la dieta de rumiantes disminuye la degradabilidad de la materia seca en 4.0 %, afectando sobre todo la degradación de la FDN y de la proteína en más de 10.0 %, (Patra 2010). Makkar & Becker (1997), reportaron una disminución en la digestibilidad *in vitro* al incluir saponinas de *Quillaja saponaria*; de igual manera Hess *et al.* (2003) observaron una reducción en la degradación de celulosa, cuando incluyeron fruto de *S. saponaria* en un sistema *in vitro*, lo cual coincide con los resultados encontrados en el presente estudio. Por otra parte, en estudios *in vivo* la tendencia es la misma, Navas-Camacho *et al.* (1993), observaron una disminución en la degradabilidad al incluir follaje de parota en la dieta. Wina *et al.* (2006) mencionaron al respecto, que el incremento de saponinas en la dieta de rumiantes puede disminuir la degradabilidad de

la proteína; Yogiando *et al.* (2014), reportaron una disminución en las concentraciones de nitrógeno amoniacal al incluir una fuente de saponinas, lo cual refleja una disminución en la degradabilidad de la proteína, que puede ser causada de manera directa por la formación del complejo saponina-proteína impidiendo su degradabilidad a pH neutros o ligeramente ácidos (Potter *et al.* 1993). Esta situación está presente en el rumen; y de manera indirecta se afecta la degradación de proteína, por el efecto negativo sobre los protozoarios (Van Soest 1994). También disminuye la degradabilidad de la fibra cuando las saponinas afectan el crecimiento de las bacterias celulolíticas y hongos ruminales (Delmas *et al.* 2000, Wang *et al.* 2000) así como la disminución de las enzimas xilanas y celulasa (Francis *et al.* 2002); aunque en este estudio no se encontraron diferencias, sí se observó una tendencia negativa al incrementar el nivel de parota en la dieta.

Es importante señalar que la disminución de la degradabilidad en el rumen, no influye sobre la digestibilidad total en el tubo digestivo (Wina *et al.* 2006), por lo que autores como Wina *et al.* (2006), Yogiando *et al.* (2014), consideran que la disminución de la degradabilidad en el rumen puede ser compensada por la degradación y fermentación microbiana que ocurre en el ciego del intestino grueso.

La disminución en la concentración de metano puede ser explicada por la degradación parcial de las saponinas, que dejan libre el azúcar ligada a los terpenos (Wina *et al.* 2005), para después ser fermentada para la producción de AGV, dirigiéndose hacia la producción de propionato, siendo necesario para ello la presencia de H⁺ y por tanto, compitiendo de ésta manera con un precursor fundamental para la producción de CH₄ (Moss *et al.* 2000).

Tanto en el estudio *in vivo* como *in vitro*, se presentó una mayor concentración de propionato, una menor concentración de acetato y CH₄ al incluir 40% de vaina de parota en la dieta; aunque no fue el objetivo de este estudio comparar el estudio *in vivo* e *in vitro*, se observa una tendencia similar en ambos experimentos. Hatewa *et al.* (2015), mencionaron al respecto que existe una falta de comparación directa entre los estudios realizados en condiciones *in vitro* y en condiciones *in vivo*, que puedan dar sustentabilidad a los primeros, por la razón de que generalmente los dos tipos de

estudios se realizan por separado, en diferentes condiciones y en distintos tiempos, por lo cual, los resultados obtenidos en la presente investigación representan una clara evidencia para demostrar la robustez o la eficacia y utilidad de la técnica de simulación de fermentación *in vitro* utilizada.

Conclusiones

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

La inclusión de 30 y 40% de vaina de parota en la dieta de ovinos de pelo después del destete en el trópico, no tuvo impactos negativos en el consumo de materia seca, ganancias de peso, conversión alimenticia y eficiencia alimenticia.

La inclusión de vaina de parota en las dietas de ovinos redujo la concentración de protozoarios; no afectó la concentración de bacterias totales, bacterias celulolíticas y los valores de pH; por otra parte, tuvo efectos en la disminución de la concentración de AGV totales, particularmente se presentó una disminución en la concentración de acetato y un incremento la concentración de propionato.

En el experimento en condiciones *in vitro*, la incorporación de vaina de parota disminuyó la degradabilidad de la materia seca, no afectó la concentración de AGV totales, se presentó una disminución en la concentración de acetato y un incremento en la concentración de propionato.

La incorporación de 40% de vaina de parota en la dieta, redujo la concentración de protozoarios del rumen, produjo una disminución en la concentración de acetato, aumento en la concentración de propionato; todo lo cual se tradujo en disminución de 27% de la producción de metano tanto en el experimento en condiciones *in vivo*, como en el experimento en condiciones *in vitro*.

Con base a los resultados obtenidos en el presente estudio en condiciones *in vivo* e *in vitro*, se recomienda la incorporación de 40% de vaina de parota en las dietas para ovinos de pelo en condiciones en el trópico, desde el destete hasta alcanzar el peso para el abasto; con el propósito de evaluar las ganancias de peso, la producción de metano ruminal, así como la posible presencia de algunos trastornos metabólicos que pudieran presentarse durante periodos de tiempo más prolongados de suministro de la vaina de parota.

Literatura citada

- Álvarez M. G., V. L. Melgarejo & N. Y. Castañeda. 2003. Ganancia de peso, conversión y eficiencia alimentaria en ovinos alimentados con fruto (semilla con vaina) de parota (*Enterolobium cyclocarpum*) y pollinaza. *Veterinaria México*. 1: 40-46.
- Anderson R. C. & M. A. Rasmussen. 1998. Use of a novel nitrotoxinmetabolizing bacterium to reduce ruminal methane production. *Bioresource Technology*. 64: 89-95.
- Amaro G. R., J. A. Bonilla & L. G. Llamas. 1993. Consumo voluntario y digestibilidad in vivo de dietas con inclusión de vaina de guanacastle en ovinos. Reunión Nacional de Investigación Pecuaria; 1993 octubre 10 y 11, Guadalajara (Jal), México. México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Especialistas en Bovinos, A.C. 130-132.
- Avendaño R. L., V. F. D. Álvarez, R. L. Molina, Q. J. S. Saucedo, C. A. Correa, O. R. S. Vejar, B. J. Escobar & V. J. Bernal. 2004. Engorda de borregos pelibuey y sus cruza con dorper y katahdin bajo condiciones de estrés calórico: Resultados preliminares. Morelia Michoacán: XXVIII Congreso Nacional de Buiatría. 12-14 de agosto.
- Babayemi O. J. 2006 Antinutritional Factors, Nutritive Value and in vitro Gas Production of Foliage and Fruit of *Enterolobium cyclocarpum*. *World Journal of Zoology*. 1 (2): 113-117.
- Babayemi, O. J., D. Demeyer & V. Fievez, 2004. *In vitro* fermentation of tropical browse seeds in relation to their content of secondary metabolites. *J. Anim. Feed Sci.* 13 (1): 31-34.
- Báez J. L. 2010. Uso de levaduras y fumarato para disminuir la metanogénesis en la fermentación de alfalfa. Tesis de doctorado. Colegio de Postgraduados.
- Baird C. 2001. Química ambiental. Reverté. Barcelona, España. 648.

- Baker S. K. 1999. Rumen methanogens, and inhibition of methanogenesis. *Austrian Journals of Agricultural Research*. 50: 1293-1298.
- Beauchemin K., Mcginn, S. 2005. Methane emissions from cattle fed barley or corn diets. *J. Anim. Sci.* 83: 653-661.
- Benchaar C., J. Rivest, C. Pomar & J. Chiquette. 1998. Prediction of methane production from dairy cows using existing mechanism model and regressions Equations. *J. Anim. Sci.* 33:94-99.
- Bernalier A., G. Fonty, & P. Gouet. 1991. Cellulose degradation by two anaerobic fungi in monoculture in co-culture with rumen bacteria. *Anim. Feed Sci. Technol.* 32: 131-136.
- Blaxter K. L. & J. L. Clapperton. 1965. Prediction of the amount of methane produced by ruminants. *Br. J. Nutr.* 19: 511-522.
- Bonilla C. J. A. 1999. Uso de vaina de parota en dietas para finalización de ovinos. En 500 Tecnologías Llave en Mano. Primera Edición. SAGAR - INIFAP. México, D.F. p. 20.
- Braswell B.H., D.S. Scimel, E. Linder & B. More. 1997. The response of global terrestrial ecosystem to interannual temperature variability. *Sci.* 278: 870-872.
- Breznak J. A. 1994. Role of microorganism in the digestion of lignocelluloses by termites. *Annals Reviews Entomological*. 39: 453-487.
- Briceño-Poot E. G., A. Ruiz-González, A. J. Chay-Canul, A. J. Ayala-Burgos, C. F. Aguilar-Pérez, F. J. Solorio-Sánchez & J. C. Ku-Vera. 2012. Voluntary intake, apparent digestibility and prediction of methane production by rumen stoichiometry in sheep fed pods of tropical legumes. *Anim. Feed Sci. Technol.* 176: 117-122.
- Busquet M., S. Calsamiglia, A. Ferret & C. Kamel. 2006. Plant extracts affect *in vitro* rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 89: 761-771.

- Calsamiglia S. & A. Ferret. 2002. Fisiología ruminal relacionada con la patología digestiva: acidos y meteorismo. Memorias del XVIII curso de especialización FEDNA, 4 y % de Noviembre. Barcelona España.
- Calsamiglia S., M. Busquet, P. W. Cardozo, L. Castillejos, &A. Ferret. 2008. Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 90: 2580-2595.
- Cardoso P. W. 2005. Efectos de los extractos de las plantas sobre las características de fermentación microbiana ruminal en sistemas in Vitro e in vivo. Tesis doctoral. Barcenola, 163 p.
- Carmona J. C. 2007. Efecto de la utilización de arbóreas y arbustivas forrajeras sobre la dinámica digestiva en bovinos. *Revista Lasallista de investigación.* 4(1): 40-50.
- Carmona J.C., D.M. Bolívar & L.A. Giraldo. 2005. El gas metano en la producción ganadera. Alternativas para medir sus emisiones y aminorar su impacto a nivel ambiental y productivo. *Rev. Coloma. Cienc. Pec.*18: 49.
- Cassandro M., M. Mele & B. Stefanon.2013. Genetic aspects of enteric methane emission in livestock ruminants. *Italian Journal of Animal Science.*12: 450-458.
- Castro-Montoya J., H. Makkar & K. Becker. 2011. Chemical composition of rumen microbial fraction and fermentation parameters as affected by tannins and saponins using an in vitro rumen fermentation system. *Can. J. Anim. Sci.* 91: 433-448.
- Cavanagh A., L. McNaughton, H. Clark, J. M. Greaves, J. M. Gowan & C. Pinares-Patino. 2008. Methane Emissions from Grazing Jersey x Friesian Dairy Cows in Mid Lactation. *Australian Journal of Experimental Agriculture.* 48: 230-233.
- Chaudhary U. B., J. L. Ogra & S. B. N. Rao. 1997. Effect of feeding different quantity of dry and fresh enterolobium leaves on ciliate population in goat rumen. *Indian J. Anim. Sci.* 67: 732-733.
- Cheeke P. R. 1996. Biological effects of feed and forage saponins and their impacts on animal production.*Adv. Exp. Biol.* 405: 377-385.

- Cheng Y. F., E. E. Joan, G. A. Gordon, W. Zhu, & K. T. Michael. 2009. Diversity and activity of enriched ruminal cultures of anaerobic fungi and methanogens grown together on lignocellulose in consecutive batch cultura. *Bioresource Technology*. 100 (20): 4821-4828.
- Church D. C. 1988. Clasificación e importancia de los animales rumiantes. Pp 1-14. In: C.D. Church (ed.), *El Rumiante: Fisiología Digestiva y Nutrición*. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España.
- Clemens J. & H.J. Ahlgrim. 2001. Greenhouse gases from animal husbandry: mitigation options. *Nutr.Cycl.Agroecosys*. 60: 287-300.
- Cobos M.A. & T. Yokoyama. 1995. *Clostridium paratrificum* var. *ruminantium*: colonization and degradation of shrimp carapaces in vitro observed by scanning electron microscopy. In Wallace R. J. & Lahlou-kassi. *Rumen ecology research planning. Proceedings of a workshop held at international livestock research institute (ILRI), Addis Ababa, Ethiopia*. 151-161.
- Convención Marco sobre el Cambio Climático. 2005. Cuidar el clima guía de la convención Marco sobre el cambio climático y el protocolo de Kioto. Editores Joana Depledge y Robert Lamb. UNFCCC, Alemania, 43.
- Crutzen P. J., I. Aselmann & W. Seiler. 1986. Methane Production by Domestic Animals, Wild Ruminants, Other Herbivorous Fauna, and Humans. *Tellus*. 38: 271-284.
- Cruz C. 1991. Engorda de los borregos pelibuey en condiciones tropicales. Memorias de la tercera reunión de producción animal tropical. CIEEG T-UNAM. Martínez de la Torre, Veracruz. México. 75.
- Czerkawski J. W., K. L. Blaxter & F. W. Wainman. 1996. The metabolism of oleic, linoleic and linolenic acids by sheep with reference to their effects on methane production. *Br. J. Nutr.* 20: 349-362.
- Dehority B. A. 2003. *Rumen microbiology*. Nottingham University Press. Thrumptom, Nottingham. UK. 372.

- Delmas F., C. Di Giorgio, R. Elias, M. Gasquet, N. Azas, V. Mshvildadze, G. Dekanosidze, E. Kemertelidze & P. Timon-David. 2000. Antileishmanial activity of three saponins isolated from ivy, alpha-hederin, beta-hederin and hederacolchiside A(1), as compared with their action on mammalian cells cultured *in vitro*. *Planta Medica* 66: 343-347.
- DeRamus H.A., T.C. Clement, D.D. Giampaola & P.C. Dickinson. 2003. Methane emission of beef cattle on forages: efficiency of grazing management systems. *J. Environ. Qual.* 32: 269-277.
- M. Devant, A. Anglada & A. Bach .2007. Effects of plant extract supplementation on rumen fermentation and metabolism in young Holstein bulls consuming high levels of concentrate. *Anim Feed Sci. Technol.* 137 (1): 46-57.
- Dini Y., J. Gere, C. Briano, M. Manetti, P. Juliarena & V. Picasso.2012. Methane Emission and Milk Production of Dairy Cows Grazing Pastures Rich in Legumes or Rich in Grasses in Uruguay. *Animals*.2: 288-300.
- Dong Y., H. D. Bae, T. A. MaAllister, G. W. Mathison & K. J. Cheng. 1999. Effects of exogenous fibrilic enzymes. 2-bromoethanesulfonate and monensin on fermentation in rumen simulation (RUSITEC) system. *Canadian Journal of Animal Science.* 79: 491-498.
- Eckard J. R., C. Grainger & C.A.M. de Klein. 2010. Options for the abatement of methane and nitrous oxide from ruminant production: a review. *Livestock Sci.* 130: 47-56.
- Esquivel-Mimenza H., V. A. Piñeiro, G. J. Bazán, B. A. Ayala, H. J. Espinoza & V. J. Ku. 2010. Integration of *Enterolobium cyclocarpum* Jacq. Griseb tree with hair sheep production in the dry tropics. *Adv. Anim. Biosci.* 444–1445.
- FAO. 2006. *Livestock, Long Shadow. Environmental issues and options.* H. Steinfeld, P. Gerber, T. Wassenaar, V. Castel, M. Rosales & C. de Haan (Eds). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma, Italia. 307 p.

- FAO. 2008. The estate of food insecurity in the world. Consultado el 06/Octubre/2013: <http://www.fao.org/docrep/011/i0291e/i0291e00.htm>.
- Ferry G. J. 1992. Biochemistry of methanogenesis. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 27: 473-503.
- Francis G., Z. Kerem, H. Makkar, P. Sand & K. Becker. 2002. The biological action of saponins in animal systems: a review. *British Journal of Nutrition*. 88: 587-605.
- Galindo J., González N., Aldama A. I. & Marrero Y. 2001. Effect of *Enterolobium cyclocarpum* on rumen microbial population and its activity under in vitro conditions. *Rev. Cubana de Ciencia Agrícola*. 35: 229.
- Galindo J., Y. Marrero, N. González & A. I. Aldama. 2003. Efecto del follaje de dos árboles tropicales (*Brosimum allicastrum* y *Leucaena leucocephala*) en la población microbiana ruminal en condiciones in vitro. *Rev. Cubana de Ciencia Agrícola*. 37(4): 395-401.
- Galindo J., Y. Marrero, T. E. Ruiz, N. González, A. Díaz, A. I. Aldama, O. Moreira, J. L. Hernández, V. Torres & L. Sarduy. 2009. Efecto de una mezcla múltiple de leguminosas herbáceas y *Leucaena leucocephala* en la población. *Rev. Cubana de Ciencia Agrícola*. 43 (3): 259-264.
- Gerber P.J., H. Steinfeld, B. Henderson, A. Mottet, C. Opio, J. Dijkman, A. Falcucci & G. Tempio. 2013. Tackling climate change through livestock a global assessment of emissions and mitigation opportunities. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome.
- Gill M. & J. D. Oldham. 1993. Growth. In: quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism. Forbes. J. M. and J. France (ed). CAB. International. Oxon, UK. 383-403.
- Gleik P.H., R.M. Adams & R.M. Amasino. 2010. Climate change and the integrity of science. *Sci*. 328: 689-691.

- Goel G, H. P. S. Makkar & K. Becker. 2008. Changes in microbial community structure, methanogenesis and rumen fermentation in response to saponin-rich fractions from different plant materials. *Journal of Applied Microbiology*. 105: 770-777.
- Goel G. & H. P. Makkar. 2012. Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins. *Trop. Anim. Health Prod.* 44: 729–739.
- Gómez C., H. J. Nahed, A. Tewolde, R. Pinto & J. López. 2006. Áreas con potencial para el establecimiento de árboles forrajeros en el centro de Chiapas. *Técnica Pecuaria en México*. 44: 219-230.
- González N., J. Galindo, R. González, A. Sosa, O. Moreira, D. Delgado, E. Martín & C. Sanabria, 2006. Utilización de la técnica de PCR en tiempo real y de la producción de gas in vitro para determinar el efecto del ácido bromoetano sulfónico en la metanogénesis y la población microbiana ruminal. *Rev. Cubana de Ciencia Agrícola*. 40 (2): 183-189.
- González S. A., S. Ariceaga, G. Altamirano & M. Huerta. 1989. Evaluación del valor nutritivo de la parota (*Enterolobium cyclocarpum*) en la alimentación de los ovinos Memorias del 2° Congreso Nacional de Producción Ovina; 1989 marzo 9-11; SLP México (DF): Asociación Mexicana de Especialistas en Ovinocultura, A.C. 113-115.
- González-Garduño R., G. Torres-Hernández & J. Arece-García. 2011. Ganancia de peso de ovinos alimentados con pasto Taiwán (*Pennisetum purpureum*) suplementados con diversas fuentes de proteína. *Avances en Investigación Agropecuaria*. 15 (3): 3-20.
- Goodrich R. D., J. E. Garret, D. R. Gast & D. A. Larson, 1984. Influence of monensin on the performance of cattle. *Journal of Animal Science*. 58: 1484-1498.
- Guo YQ, J .X. Liu, Y. Lu, W. Y. Zhu, S. E. Denman & C. S. McSweeney. 2008. Effect of tea saponin on methanogenesis, microbial community structure and expression of mcrA gene, in cultures of rumen micro-organisms. *Letters in Applied Microbiology*. 47: 421–426.

Harrigan W.F. & E.M. McCance.1979. Métodos de laboratorio en microbiología de alimentos y productos lácteos. Ed. Academia. León, España. 361-366 pp.

Hasselman K. 1997. Are we seeing global change. *Sci.* 276: 914-915.

Hatewa B., J. W. Conea, W. F. Pellikaana, S. C. Podestaa, A. Bannink, W. H. Hendriks & J. Dijkstra.2015. Relationship between in vitro and in vivo methane production measured simultaneously with different dietary starch sources and starch levels in dairy cattle.*Anim Feed Sci Technol.*202:20-31.

Hess H. D., M. Kreuzer, T. E. Díaz, C. E. Lascano, J. E. Carulla, C. R. Soliva, & A. Machmuller. 2003. Saponin rich tropical fruits affect fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated rumen fluid. *Anim. Feed Sci. Technol.* 109: 79-94.

Holtshausen L., A. V. Chaves, K. A. Beauchemin, S. M. McGinn, T. A. McAllister, N. E. Odongo, P. R. Cheeke & C. Benchaar. 2009. Feeding saponin-containing *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* to decrease enteric methane production in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92 (6): 2809-2821.

Hoover W. H. & S. Stokes. 1991. Balancing carbohydrates and proteins for optimum rumen microbial yield. *J. Dairy Sci.* 74: 3630.

Hu W.-L., J.-X.Liu, J.-A.Ye, Y.-M.Wu & Y.-Q.Guo. 2005. Effect of tea saponin on rumen fermentation *in vitro*. *AnimFeed Sci Technol.* 120: 333-339.

Hussain I. & P. R. Cheeke 1995. Effect of dietary *Yucca schidigera* extract on rumen and blood profiles of steers fed concentrate- or roughage-based diets. *Anim Feed Sci Technol* 51: 231-242.

Intergovernmental Panel on Clime Change. 1996. Climate change 1995. The scientific basis.Group I. 2° Assessment report. Cambridge: WMO-UNEP. Cambridge University Pess.

Intergovernmental Panel on Clime Change. Climate change 2001. The scientific basis. Contribution of workin group I to the third assessment report of the

intergovernmental panel on climate change. Technical summary cambridge: WMO-UNEP. Cambridge university press.

Itabashi H. E., E. Bayaru, S. Kanda, T. Nishida, S. Ando, M. Ishida, T. Itoh, Y. Isobe & K. Nagara. 2000. Effect of fumaric acid on methane production, rumen fermentation and digestibility in cattle. The 3rd joint symposium of Japan and Korea on rumen metabolism and physiology. 11 y 12 Miyazaki, Japan.

Ivan M., K. M. Koenig, B. Teferedegne, C. J. Newbold, T. Entz, L. M. Rode & M. Ibrahim. 2004. Effects of the dietary *Enterolobium cyclocarpum* foliage on the population dynamics of rumen ciliate protozoa in sheep. *Small Ruminant Research*. 52: 81-91.

Jaramillo L. E., Molinar, H. F. Leos, M. J. & A. A. M. C. Hinojosa. 2008. Efecto de la dieta en corderos de lana y pelo sobre la ganancia diaria de peso, consumo de alimento, conversión alimenticia y características de la canal. *Ciencia en la frontera: revista de ciencia y tecnología de la UACJ*. 4: 131-139.

Janssen P. H. & M. Kirs. 2008. Structure of the archaeal community of the rumen. *Applied and Environmental Microbiology*. 74: 3619-3625.

Johnson KA. & D. E. Johnson. 1995. Methane emissions from cattle. *J Anim Sci*. 73: 2483-2492.

Kerr R. A. 1997. Greenhouse forecasting still cloudy. *Sci*. 276: 1040-1042.

Klita P. T., G. W. Mathison, T. W. Fenton & R. T. Hardin. 1996. Effect of alfalfa root saponins on digestive function in sheep. *J. Anim. Sci*. 74 (5): 1144-1156.

Koenig K. M., M. Ivan, B. T. Teferedegne, D. P. Morgavi, L. M. Rode, I. M. Ibrahim & C. J. Newbold. 2007. Effect of dietary *Enterolobium cyclocarpum* on microbial protein flow and nutrient digestibility in sheep with *entodinium caudatum* monofauna. *British Journal of Nutrition*. 98: 504-516.

Knight T., R.S. Ronimus, D. Dey, C. Tootill, G Naylor, P. Evans, G. Molano, A. Smith, M. Tavendale, C. S. Pinares-Patino & H. Clark. 2011. Chloroform decreases rumen

- methanogenesis and methanogen populations without altering rumen function in cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166: 101-112.
- Kumar V. M. Tandon & M. P Verma. 2008. Nutritional techniques for mitigating methane production from ruminants. *Dairy Planner.* 4 (11): 14.
- Lana R. P., J. B. Russell & M. E. Van Amburgh. 1998. The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production. *J. Anim Sci.* 76: 2190-2196.
- Lanza M., B. Bella, A. Priolo, & V. Fasose. 2003. Peas (*Pisum sativum* L) as an alternative protein source in lamb diet: growth performance and carcass and meat quality. *Small Ruminant Research.* 47: 63-68.
- Lay J. J., Y. Li, T. Noike, J. Endo & S. Ishimoto. 1997. Analysis of environmental factors affecting methane production from high-solid organic waste. *Water science technology.* 36: 6-7.
- Leng R. A., S. H. Bird, A. Klieve, B. S. Choo, F. M. Ball, G. Asefa, P. Brumby, V. D. Mudgal, U. B. Chaudhry, S. U. Haryono & N. Hedratno. 1992. The potential for tree forage supplements to manipulate rumen protozoa to enhance protein to energy ratios in ruminants fed on poor quality forages. In: Speedy, A., Pugliese, P.L. (Eds.), *Legume Trees and Other Fodder Trees a Protein Sources for Livestock.* FAO Animal Production Health Paper. 102: 77-191.
- Leng R. A. 2014. Interactions between microbial consortia in biofilms: a paradigm shift in rumen microbial ecology and enteric methane mitigation. *Animal Production Science.* 54: 519-543.
- Li Y., Y. Du & C. Zou. 2009. Effects of pH on antioxidant and antimicrobial properties of tea saponins. *Eur. Food. Res. Technol.* 228:1023-1028.
- Lila Z. A., N. Mohammed, S. Kanda, T. Kamada & H. Itabashi. 2003. Effect of sarsaponin on ruminal fermentation with particular reference to methane production in vitro. *J. Dairy Sci.* 86 (10): 3330-3336.

- Madigan M. T., J. M. Martiniko & J. Parker. 2004. Brock, biología de los microorganismos. Editorial Pearson-Prentice Hall, 10ª edición. Madrid España. 986p.
- Mahy J. N. 1979. Desarrollo de un método de análisis por cromatografía de gases y espectrometría de masas combinadas para el estudio del metabolismo de la histamina. Tesis de doctorado. Universidad de Barcelona.
- Makkar H. P., & K. Becker. 1997. Degradation of Quillaja saponins by mixed culture of rumen microbes. *Lett. Appl. Microbiol.* 25: 243-245.
- Malecky M, L. P. Broudiscou & P. Schmidely. 2009. Effects of two levels of monoterpene blend on rumen fermentation, terpene and nutrient flows in the duodenum and milk production in dairy goats. *Anim. Feed Sci. Technol.* 154: 24-35.
- Malik P. K. 2007. Effect of dietary leguminous fodder on methane and nitrous oxide emission from ruminants. Tesis de doctorado. National Dairy Research Institute. Karnal. India.
- Mao L. H., J.K. Wang, Y.Y. Zhou. & X. J. Liu. 2010. Effects of addition of tea saponins and soybean oil on methane production, fermentation and microbial population in the rumen of growing lambs. *Livest. Sci.* 129: 56–62.
- McAllister T.A., H. D. Bae, G. A. Jones & K.J. Cheng. 1994. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *J. Anim. Sci.* 72: 3004 – 3018.
- McAllister T.A., E.K. Okine, G.W. Mathison, & K.J. Cheng. 1996. Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. *Can. J. Anim. Sci.* 76: 23.
- Mellenberger R.W., L.D. Satter, M.A. Millett & A.J. Baker. 1970. An *in vitro* technique for estimating digestibility of treated and untreated wood. *J. Anim. Sci.* 30: 1005-1011.
- Mendoza-Martinez G. D., F. X. Plata-Pérez, R. Espinosa-Cervantes & A. Lara-Bueno. 2008. Manejo nutricional para mejorar la eficiencia de utilización de energía en bovinos. *Uciencia.* 24(1): 75-87.

- Molano G., T.W. Knight & H. Clark. 2008. Fumaric acid supplements have no effect on methane emissions per unit of feed intake in wether lambs. *Australian J. Experimental Agric.* 48: 165.
- Mora, Calvo, V. 2001. Fijación, emisión y balance de gases de efecto invernadero en pasturas en monocultivo y en sistemas silvopastoriles de fincas lecheras intensivas de las zonas altas de Costa Rica, Turrialba, Costa Rica. Tesis de maestría. Centro agronómico tropical de investigación y enseñanza.
- Moscoso C., M. Velez, A. Flores & N. Agudelo. 1995. Effects of Guanacaste tree (*Enterolobium cyclocarpum* Jacq. Griseb.) fruit as replacement for sorghum grain and cotton-seed meal in lamb diets. *Small Ruminant Research.* 18: 121-124.
- Moss A., J. Jouany & J. Newbold. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Ann. Zootechnie.* 49: 231-253.
- Minami K. Takata. 1997. Atmospheric methane: sources, sink, and strategies for reducing agricultural emissions. *Water Science Technol.* 36: 509-516.
- Mirzaei A. A. & S. N. Maheri. 2011. Factors affecting mitigation of methane emission from ruminants I: feeding strategies. *Asian J. Anim. Sci.* 82: 1839-1846.
- Murray P.J., A Moss, D. R. Lockyer, & S. C. Jarvis. 1999. A Comparison of Systems for Measuring Methane Emissions from Sheep. *Journal of Agricultural Science.* 133: 439-444.
- Moe P. W. & H. F. Tyrrell. 1979. Methane production in dairy-cows. *J. Dairy Sci.* 62: 1583-1586.
- National Research Council (Nrc). 1998. Nutrient Requirements of Swine. Subcommittee on swine nutrition. 10th revised edition. Washington, D. C.: 110-117.
- Navas-Camacho A., M. A. Laredo, A. Cuesta, H. Anzola, & J. C. Leon. 1992. Evaluation of *Enterolobium cyclocarpum* as dietary alternative to eliminate protozoa from the rumen. *Livest. Res. Rural Dev.* 4: 55-63.

- Navas-Camacho A., M. A. Laredo, H. Cuesta, H. Anzola & J. C. León. 1993. Effect of supplementation with a tree legume forage on rumen function. *Livest.Res. Rural Dev.*5: 58-71.
- Negrón G., O. Parra, N. Avila & A. Hoet. 1993. Efecto experimental de la ingestión del *Enterolobium cyclocarpum* en el ganado bovino. *Revista Científica FCV-LUZ.* 3:62-67.
- Newbold C. J., S. M. El Hassan, J. Wang, M. E. Ortega & R. J. Wallace. 1997. Influence of foliage from African multipurpose trees on activity of rumen protozoa and bacteria. *Br. J. Nutr.* 78: 237-249.
- Newbold C. J., B. Lassalas & J. P. Jouany. 1995. The importance of methanogens associated with ciliate protozoa in ruminal methane production in vitro. *Lett Appl Microbiol.* 21(4): 230-234.
- Nutrion. 2002. Comercializadora de software, S. A. de C. V. México. En: <http://www.nutrionsoftware.com> (Consultada el 30 de agosto de 2008)
- Patra A. K. & J. Saxena. 2009a. The effect and mode of action of saponins on the microbial populations and fermentation in the rumen and ruminant production. *Nutr.Res. Rev.* 22: 204-219.
- Patra A. K. & J. Saxena. 2009b. Dietary phytochemicals as rumen modifiers: a review of the effects on microbial populations. *Anton. Van Leeuwen.* 96: 363-375.
- Patra A. K. & J. Saxena. 2009. A review of the effect and mode of action of saponins on microbial population and fermentation in the rumen and ruminant production. *Nutr.Res. Rev.* 22: 204-219.
- Patra A. K. & J. Saxena. 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry.* 71: 1198-1222.

- Patra A. K. 2010. Meta-analyses of effects of phytochemicals on digestibility and rumen fermentation characteristics associated with methanogenesis. *J. Sci. Food. Agric.* 90: 2700-2708.
- Patra A. K. & Z. Yu. 2013. Effective reduction of enteric methane production by a combination of nitrate and saponin without adverse effect on feed degradability fermentation, or bacterial and archaeal communities of the rumen. *Bioresource Technology.* 148: 352-360.
- Patra A.K. 2012. Enteric methane mitigation technologies for ruminant livestock: a synthesis of current research and future directions. *Environ Monit Assess.* 184: 1929-1952.
- Patra A.K. 2013. Trends and projected estimates of GHG emissions from Indian livestock in comparisons with GHG emissions from world and developing countries. *Asian–Aust. J. Anim. Sci.*
- Pecsok R. L. & L. D. Shields. 1990. Métodos modernos de análisis químico. Limusa. 487.
- Pen B., C. Sar, B. Mwenya, K. Kuwaku, R. Morikawa & J Takahashi. 2006. Effects of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* extracts on in vitro ruminal fermentation and methane emission. *Anim. Feed Sci. Technol.* 129: 175–186.
- Pennington T. D. & J. Sarukhan. 2005. Árboles tropicales de México manual para la identificación de las principales especies. 3ª ed. Fondo de cultura Económica México. 523 p.
- Peralta N., Palma J. M. & R. Macedo. 2004. Efecto de diferentes niveles de inclusión de parota (*Enterolobium cyclocarpum*) en el desarrollo de ovinos en estabulación. *Livestock Research for Rural Development.* 16: (1). <http://lrrd.cipav.org.co/lrrd16/1/pera161.htm>.

- Pérez L. E., M. C. García, S. Albores, R. Sosa & H. León. 2011. Parámetros productivos de ovinos de pelo en un sistema de alimentación intensiva en la región central de Chiapas. *Quehacer Científico en Chiapas*. 1(12): 7-13.
- Pérez L. E., V. H. León, R. R. Sosa, C. L. Villalobos, R. R. Coutiño & N. R. Ruiz. 2010. El caulote (*Guazuma ulmifolia* Lam.) como fuente de nitrógeno complementario en dietas para cordero en finalización. *Quehacer científico en Chipas*. 1 (7): 28-32.
- Piñero-Vázquez A. T., J. Oliva-Hernández & J. A. Hinojosa-Cuéllar. 2009. Uso de suplementación mineral con monensina sódica en corderas Pelibuey durante el crecimiento postdestete. *Arch. Med. Vet.*41: 35-41.
- Posada S.L., R. Noguera & D. Bolívar. 2006. Relación entre presión y volumen para la implementación de la técnica *in vitro* de producción de gases en Medellín, Colombia. *Rev. Col. Cienc. Pec.* 19: 4.
- Potter S. M., R. Jimenez-Flores, J. Pollack, T. A. Lone & M. D. Berber-Jimenez. 1993. Protein saponin interaction and its influence on blood lipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 41: 1287-1291.
- Ramírez I.F. 2010. Emisiones de metano generadas por excretas de animales de granja y contenido ruminal bovino. Tesis de doctorado. Colegio de Postgraduados.
- Ramírez L., L. López, J. Petit & Ku J. C. 2011. Producción ovina en sistemas agroforestales en el trópico. *Bioagrociencia*. 4(1): 33-42.
- Reséndiz V. 2011. Finalización de borregos pelibuey utilizando dietas con diferentes niveles de alfalfa: respuesta en producción y calidad de la carne. Tesis de maestría. Colegio de postgraduados. Mexico.
- Rocha O. J. & G. Aguilar. 2001. Reproductive biology of the dry forest tree *Enterolobium cyclocarpum* (Guanacaste) in Costa Rica: a comparison between trees left in pastures and trees in continuous forest. *American Journal of Botany*.88:1607-1614.

- Rodríguez J. A. 2009. Aislamiento y caracterización in vitro de una bacteria acetogénica ruminal. Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados.
- Rusell J. B. & L. J. Richlik. 2001. Factors that alter rumen microbial ecology. *Sci.* 292 (5519): 1119-1122.
- Santacoloma L.A. 2011. Las dietas en las emisiones de metano durante el proceso de rumia en sistemas de producción bovina. *RIAA.* 2(1): 55-64.
- Santoso B, B. Mwenya, C. Sar, Y. Gamo, T. Kobayashi, R. Morikawa, K. Kimura, H. Mizukoshi & J. Takahashi. 2004. Effects of supplementing galactooligosaccharides, *Yucca schidigera* and nisin on rumen methanogenesis, nitrogen and energy metabolism in sheep. *Livest. Prod. Sci.* 91 (3): 209-217.
- SAS Institute. 2003. SAS education analytical suite for Windows release 9.2.
- Sejian V., R. Lal, J. Lakritz & T. Ezeji. 2011. Measurement and prediction of enteric methane emission. *Int. J. Biometereol.* 55(1): 1-16.
- Sen S., H. P. S. Makkar, S. Muetzel & K. Becker. 1998. Effect of Quillaja saponaria and *Yucca schidigera* plant extract on growth of *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* 27: 35-38.
- Serrano-Altamirano V., M. M. Silva-Serna, M. A. Cano-García, G. Medina-García & A. Ruiz-Corral. 2005. Estadísticas climatológicas básicas del estado de Oaxaca (periodo 1961-2003). INIFAP. SAGARPA. Libro técnico No. 4. Oaxaca, México, 272.
- Serratos J.C., J. Carreón, H. Castañeda, P. Garzón & J. García. 2008. Composición químico-nutricional y de factores antinutricionales en semillas de parota (*Enterolobium cyclocarpum*). *Interciencia.* 33(11): 850-854.
- Shu Q., A. H. Bir, H. S. Gill, E. Duan, Y. Xu, M. A. Hiliard & J. B. Rowe. 2001. Antibody response in sheep following immunization with *Streptococcus bovis* in different adjuvants. *Veterinary Research Communication.* 25: 43-54.

- Sistema de Información Agropecuaria y Pesquera. 2011. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola de los Estados Unidos Mexicanos. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Sagarpa. Disponible en: http://www.campomexicano.gob.mx/portal_siap/integracion/EstadisticaBasica/Pecuuario/PoblacionGanadera/ProductoEspecie/ovino.pdf(Consultado el 8 de octubre de 2011).
- Sliwinski B. J., C. R. Soliva, A. Machmüller & M. Kreuzer. 2002. Efficacy of plant extracts rich in secondary constituents to modify rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*. 10: 101-114.
- Sosa A., J. Galindo & R. Bocourt. 2007. Metanogénesis ruminal: aspectos generales y manipulación para su control. *Rev. Cubana de Ciencia Agrícola*. 41(2): 105-114.
- Sosa E. E., D. Pérez, L. Ortega & G. Zapata. 2004. Evaluación del potencial forrajero de árboles y arbustos tropicales para la alimentación de ovinos. *Tec. Pecu. Méx.*42(2): 129-144.
- Steele P., P. Fraser, R. Rasmussen, M. Khalil, T. Conway, A. Crawford, R. Gammon, K. Masarie & K. Thoning. 1987. The global distribution of methane in the troposphere. *J. Atmos. Chem.*5:125.
- Stewart C.S., H.J. Flint & M.P. Bryant. 1997. The rumen bacteria. In: The Rumen Microbial Ecosystem. P.N. Hobson & C.S. Stewart (Eds.). Chapman and Hall, London.
- Swain R. A., J. V. Nolan, & A. V. Klieve. 1996. Natural variability and diurnal fluctuations within the bacteriophage population of the rumen. *Applied and Environmental Microbiology*. 62(3):994-997.
- Thauer K.R. 1988. Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. *SGM Microbiol.* 144: 2377-2406.

- Thornton P.K. 2010. Livestock production: recent trends, future prospects. *Phil.Trans R. Soc. B.* 365: 2853–2867.
- Thornton P. K. & M. Herrero.2011. Potential for reduced methane and carbon dioxide emissions from livestock and pasture management in the tropics. *PNAS.*107: 19667-19672.
- Valdez F. R., Bush L. J., Goetsch A. L. & Owens F. N. 1986. Effect of steroidal sapogenins on rumen fermentation and on production of lactating dairy cows.*J. Dairy Sci.* 69: 1568-1575.
- Van Soest P. J., J. B. Robertson & B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral-detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74: 3583-3597.
- Van Soest P. J. 1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant.* Cornell University Press. 2 ed. Ithaca, NY. 476.
- Vlaming J.B., N. Lopez-Villalobos, I. M. Brookes, S. O. Hoskin&H. Clark. 2008. Within- and Between-Animal Variance in Methane Emissions in Non-Lactating Dairy Cows. *Australian Journal of Experimental Agriculture.* 48: 124-127.
- Wallace R. J., L. Arthaud &C. J. Newbold. 1994. Influence of *Yucca shidigera* extract on ruminal ammonia concentrations and ruminal microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1762-1767.
- Wang Y, T. A. McAllister, L. J. Yanke & P. R. Cheeke. 2000. Effect of steroidal saponin from *Yucca shidigera* extract on ruminal microbes. *J. Appl. Microbiol.* 88: 887-896.
- Weimer P. J. 1998. Manipulating ruminal fermentation: A microbiological ecological perspective. *J. Anim. Sci.* 76: 3114-3122.
- Weir K.L. 1998. Sugarcane fields; source or sink for greenhouse. *Australian journal agriculture research.* 49: 1-9.

- Williams A. G. & G. S. Coleman. 1997. The rumen protozoa. Pp. 72-139 In: P. N. Hobson & C. S. Stewart (eds), *The Rumen Microbial Ecosystem*. Blackie Academic and Professional, London.
- Wina, E., S. Muetzel, & K. Becker. 2005. The impact of saponins or saponin-containing plant materials on ruminant production – A review. *J. Agric. Food Chem.* 53: 8093-8105.
- Wina E., S. Muetzel & K. Becker. 2006. Effects of Daily and Interval Feeding of *Sapindus rarak* Saponins on Protozoa, Rumen Fermentation Parameters and Digestibility in Sheep. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 19(11):1580-1587.
- Wolin M. 1960. A theoretical rumen fermentation balance. *J. Dairy Sci.* 43:1452.
- Wolin M. J., T. L. Miller & C. S. Stewart. 1997. Microbe-microbe interactions. In *The Rumen Microbial Ecosystem*, pp. 467–491 [PN Hobson and CS Stewart, editors]. London: Blackie Academic and Professional. 110.
- Wu Z., Sadik M, Sleiman F. T., Simas J. M., Pessarakli M. & Huber J. T. 1994. Influence of yucca extract on ruminal metabolism in cows. *J Anim. Sci.* 72: 1038-1042.
- Yogianto A., A. Sudarman, E. Wina & A. Jayanegara. 2014. Supplementation effects of tannin and saponin extracts to diets with different forage to concentrate ratio on *in vitro* rumen fermentation and methanogenesis. *J. Indonesian Trop. Anim. Agric.* 39(3):144-151.
- Yokoyama, M.T. & K.A. Johnson. 1988. *Microbiología del rumen e intestino*. Pp. 137-157 In: C.D. Church (ed.), *El Rumiante: Fisiología Digestiva y Nutrición*. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España.
- Zhou Y. Y., H. L. Mao, F. Jianga, J. K. Wanga, J. X. Liua & C. S. McSweeney. 2011. Inhibition of rumen methanogenesis by tea saponins with reference to fermentation pattern and microbial communities in Hu sheep. *Animal Feed Science and Technology*. 166-167: 93-100.

Zawadzki W. 1986. Inhibition of methanogenesis in the rumen of sheep. II. Methanogenesis after administration of inhibitors. *Pol. Arch. Weter.* 25: 127-144.