



# UNIVERSIDAD DEL MAR

## DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EFFECTO DE LA INCORPORACIÓN DE ARBÓREAS FORRAJERAS A UNA DIETA  
A BASE DE *Cynodon nlemfuensis* DURANTE LA FERMENTACIÓN RUMINAL *IN*

*VITRO*

**TESIS**

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN Y SANIDAD ANIMAL**

PRESENTA

L. P. A. Guillermo de Jesús González Crespo

DIRECTOR

Dr. Serafín Jacobo López Garrido

CO-DIRECTOR

Dr. Narciso Ysac Ávila Serrano

Puerto Escondido, Oaxaca, México.

Octubre, 2019

## DEDICATORIA

Dedico esta tesis a:

A mi esposa Claudia M. Rubio Hernández por su amor brindado, apoyo incondicional, esfuerzos realizados, paciencia otorgada, por ser tolerante en todo momento, por los consejos, palabras de aliento para concluir la presente investigación y ésta etapa de mi formación académica. Además de repetirme a diario que cree en mí y que yo podía, porque siempre cumplo lo que me propongo y tengo lo necesario para hacerlo.

A mis hijos Lya y Aly por su amor y cariño que nunca me faltó, su apoyo siempre que lo necesite, sus esfuerzos realizados por la ausencia, por ser el motor que me impulsa a seguir adelante, además de demostrarles que todo se puede cuando se quiere, y que el estudio es el único medio que les cumplirá todos sus sueños.

A mis padres Rodolfo González y Celia Crespo por los valores inculcados, apoyo, amor, motivación para continuar mis estudios, por enseñarme a esforzarme para cumplir mis metas, a siempre seguir adelante y por recordarme día a día que soy capaz, que todo lo que se empieza se tiene que terminar y que todo lo que haga lo haga bien si no mejor no hacerlo.

A mis hermanos Citlaxochitl y Sócrates por todo el apoyo otorgado siempre que fue necesario, a Yunuen, Rodolfo y Violeta por ser un motivo de superación y ejemplo, para que cumplan lo que se propongan y nunca pierdan las ganas de estudiar y superarse.

## AGRADECIMIENTOS

- Al pueblo de México, por su nobleza, por permitirme realizar mis estudios de Maestría.
- A CONACYT, por aceptarme en su programa de becas y apoyarme económicamente para realizar mis estudios de posgrado.
- A la Universidad del Mar, por abrirme sus puertas y permitirme hacer de ésta mi casa de estudio, al brindarme todas las oportunidades y espacios para realizar ésta investigación.
- Al Dr. Serafín J. López Garrido, por todos sus esfuerzos, tiempo, palabras de motivación, paciencia; por no rendirse y no permitir que yo lo hiciera, pese a todas las complicaciones del camino, al final un gran Doctor, profesor, persona, compañero y amigo.
- Al Dr. J. Guadalupe Gamboa, la Dra. Mónica M. Galicia y el Dr. Marco A. Camacho, por todas las facilidades proporcionadas, esfuerzos, palabras de motivación, consejos, tiempo regalado, enseñanzas, conocimientos brindados y su apoyo otorgado para la escritura de la presente tesis, y amena estancia en esta institución educativa. Grandes personas, doctores, docentes y amigos.
- Al Dr. Narciso Ysac Ávila, el Dr. Noé Ruiz, el Dr. Jaime Arroyo, y el Dr. Erik Pablo, por sus conocimientos, enseñanzas, tiempo, consejos y apoyo otorgado dentro y fuera del aula en cada una de sus clases, y actividades realizadas. Siempre que se les solicitó para concluir esta investigación.
- A mi compañera Silvia Santos Jerónimo, por todo el apoyo y esfuerzos particulares realizados para completar este trabajo de investigación en la etapa de laboratorio y escritura de tesis. Una gran persona y amiga.
- A mis compañeros por formar esta familia educativa todo este tiempo, por apoyarme y alentarme a siempre echarle ganas para concluir esta investigación, Diego A. Ramos Ramos, A. Vladimir Silva Patiño, Gabriela de J. Bielma Sarabia, Maribel Reyes Jiménez, Abraham Santos Díaz, Saris U. Ramos Gabriel, Mario Moncada Hernández y Eliud Flores M.

- A cada uno de los laboratorios incluidos es esta investigación, por su apoyo para la obtención de los resultados. Laboratorio de Productos Pecuarios, de la Universidad del Mar, Laboratorio de Bioquímica y Nutrición, de la Universidad del Mar, Laboratorio de Microbiología Ruminal y Genética Microbiana, del Colegio de Postgraduados, Laboratorio de Nutrición Animal, de la Universidad de Guadalajara.
- A los Laboratoristas P. L. Z. Ricardo Cruz Vázquez y la M. en C. Beatriz Pinacho Santana, por el apoyo en el proceso experimental de este trabajo.
- A los trabajadores de la institución y campo experimental de la UMAR, por su atención y dedicación en las necesidades que esta investigación emanara.
- A mi esposa e hijos, por su amor, apoyo y tolerancia en cada momento durante la investigación.
- A mis padres y hermanos, por el amor, el apoyo y las atenciones brindadas para poder realizar esta tesis.
- Agradezco de manera muy especial a las autoridades de la Universidad del Mar por el financiamiento otorgado al Proyecto interno “**Exudados de Plantas Forrajeras en el Desarrollo Estructural y Sucesión de la Comunidad Microbiana Ruminal**”. Registrado en el Instituto de Genética con Clave de Unidad Programática (CUP): **2IG1702**. El cual fue un soporte fundamental para la realización de la presente Tesis.

## RESUMEN

Las gramíneas no satisfacen las necesidades de los rumiantes en el trópico y su marcada producción estacional afecta la producción animal; además, los altos contenidos de fibra y bajo porcentaje de proteína originan mayor producción de gases de efecto invernadero (GEI). Por esta razón, se busca complementar la dieta al adicionar diferentes niveles de follaje de arbóreas tropicales. El objetivo fue evaluar el efecto de la incorporación de 15%, 30% y 45% de *Moringa oleífera*, *Leucaena leucocephala* o *Guazuma ulmifolia* en una dieta a base de pasto *Cynodon nlemfuensis* durante la fermentación ruminal *in vitro*. Los tratamientos experimentales fueron mezclas con diferentes proporciones pasto/follaje 85:15, 70:30 y 55:45, para cada una de las arbóreas, y un testigo de 100:0. A cada dieta se le determinó la composición química y mediante fermentación ruminal *in vitro* se determinó la producción acumulada de biogás, las poblaciones de microorganismos ruminales (bacterias totales, protozoarios y bacterias celulolíticas), la degradabilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS), el pH, la concentración de ácidos grasos volátiles (AGVs), y las emisiones de metano (CH<sub>4</sub>) y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). El diseño experimental fue completamente al azar con tres repeticiones por variable. Los resultados se analizaron con GLM y las medias se compararon con la prueba de Tukey. La composición química de las dietas mostró diferencias (P < 0.05) al adicionar distintos porcentajes de follaje de arbóreas a la dieta, la DIVMS mostró diferencias (P < 0.05). El pH de los tratamientos no mostro diferencias (P > 0.05), la concentración de AGVs fue diferente (P < 0.05), destacando la dieta con 45% de *M. oleífera* que registró las mejores concentraciones de AGVs; sin embargo, la producción de biogás y las emisiones de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> fueron menores en la dieta con 45% de *L. leucocephala* mostrando diferencias (P < 0.05). Se concluye que la adición de 45% de *L. leucocephala* a la dieta de *C. nlemfuensis*, mejora la composición química, sin afectar las poblaciones microbianas ni la concentración de AGVs, en este estudio se destaca que se redujo la producción de CH<sub>4</sub> en 18% y de CO<sub>2</sub> en 24%.

**PALABRAS CLAVE:** CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, Dietas, *Guazuma*, Inclusión, *Leucaena*, *Moringa*, Pasto, Trópico.

## ABSTRACT

Grasses do not meet the needs of ruminants in the tropics and their marked seasonal production affects animal production; In addition, the high fiber content and low percentage of protein cause greater production of greenhouse gases (GHG). For this reason, it is sought to complement the diet by adding different levels of tropical tree foliage. The objective was to evaluate the effect of the incorporation of 15%, 30% and 45% of *Moringa oleifera*, *Leucaena leucocephala* or *Guazuma ulmifolia* in a diet based on *Cynodon nlemfuensis* grass during ruminal fermentation *in vitro*. The experimental treatments were mixtures with different grass/foilage ratios 85:15, 70:30 and 55:45, for each of the trees, and a 100:0 control. To each diet the chemical composition was determined and by means of *in vitro* ruminal fermentation the accumulated production of biogas, the populations of ruminal microorganisms (total bacteria, protozoa and cellulolytic bacteria), the *in vitro* degradability of dry matter (IVDDM) were determined, the pH, the concentration of volatile fatty acids (VFA), and the emissions of methane (CH<sub>4</sub>) and carbon dioxide (CO<sub>2</sub>). The experimental design was completely randomized with three repetitions per variable. The results were analyzed with GLM and the means were compared with the Tukey test. The chemical composition of the diets showed differences (P < 0.05) by adding different percentages of tree foliage to the diet, the IVDDM showed differences (P < 0.05). The pH of the treatments did not show differences (P > 0.05), the concentration of VFA was different (P < 0.05), highlighting the diet with 45% of *M. oleifera* that registered the best concentrations of VFA; however, biogas production and CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> emissions were lower in the diet with 45% of *L. leucocephala* showing differences (P < 0.05). It is concluded that the addition of 45% of *L. leucocephala* to the diet of *C. nlemfuensis*, improves the chemical composition, without affecting the microbial populations or the concentration of VFA, in this study it is emphasized that the production of CH<sub>4</sub> was reduced in 18% and CO<sub>2</sub> in 24%.

**KEY WORDS:** CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, Diets, Grass, *Guazuma*, Inclusion, *Leucaena*, *Moringa*, Tropic.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>2. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	3
2.1. Alimentación de rumiantes en el trópico.....	3
2.2. Composición química de los pastos del trópico.....	3
2.2.1. Composición nutricional del pasto <i>Cynodon nlemfuensis</i> .....	4
2.3. Alimentación alternativa para bovinos en el trópico.....	4
2.3.1. Arbustivas como alimento alterno en el trópico.....	5
2.3.1.1. <i>Moringa oleífera</i> .....	5
2.3.1.2. <i>Leucaena leucocephala</i> .....	6
2.3.1.3. <i>Guazuma ulmifolia</i> .....	6
2.4. Metabolitos secundarios en las arbóreas.....	7
2.4.1. Saponinas.....	7
2.4.2. Compuestos fenólicos.....	8
2.4.2.1. Cumarina.....	9
2.4.2.2. Flavonoides.....	9
2.4.2.3. Taninos.....	10
2.4.5. Concentración de metabolitos secundarios en las arbóreas forrajeras.....	11
2.4.5.1. <i>Moringa oleífera</i> .....	11
2.4.5.2. <i>Leucaena leucocephala</i> .....	11
2.4.5.3. <i>Guazuma ulmifolia</i> .....	12
2.5. Microorganismos ruminales y cinética ruminal.....	13
2.5.1. Bacterias ruminales.....	14
2.5.2. Protozoarios.....	15
2.5.3. Hongos.....	18
2.5.4. Bacteriofagos.....	20
2.6. Fermentación Ruminal.....	20
2.6.1. Degradación de Carbohidratos.....	22
2.6.2. Producción de AGVs.....	24
2.6.3. Degradación de proteínas.....	25

2.6.4. Producción de amoníaco.....	26
2.6.5. Degradación de lípidos.....	27
2.7. Producción de metano en el rumen.....	28
2.7.1. Estrategias de alimentación para disminuir la metanogénesis.....	29
2.7.1.1. Adición de lípidos a la dieta.....	29
2.7.1.2. Adición de ionóforos.....	30
2.7.1.3. Nivel de consumo relacionado con características de la dieta.....	31
2.7.1.4. Procesamiento de los forrajes.....	31
2.7.1.5. Metabolitos secundarios de las arbóreas.....	32
2.7.1.5.1. Saponinas.....	32
2.7.1.5.2. Taninos.....	33
<b>3. HIPÓTESIS.....</b>	<b>34</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
4.1. Objetivo general.....	35
4.2. Objetivos particulares.....	35
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
5.1. Localización geográfica.....	36
5.2. Cultivos utilizados.....	36
5.3. Tratamientos experimentales.....	36
5.4. Análisis químico.....	37
5.5. Caracterización de la fermentación ruminal.....	38
5.6. Caracterización de las trampas de biogás.....	39
5.7. Inóculo.....	39
5.8. Montaje de biofermentadores y trampas de gas.....	39
5.9. Variables a evaluar.....	40
5.9.1. Producción acumulada de biogás total (CO <sub>2</sub> y CH <sub>4</sub> ).....	40
5.9.2. Población de bacterias totales.....	40
5.9.3. Población de protozoarios.....	41
5.9.4. Población de bacterias celulolíticas.....	41
5.9.5. Degradabilidad <i>in vitro</i> de la materia seca.....	43
5.9.6. pH de los medios de cultivo.....	43
5.9.7. Concentración de ácidos grasos volátiles.....	44

5.9.8. Emisiones de CO <sub>2</sub> y CH <sub>4</sub> .....	44
5.9.9. Análisis estadístico.....	44
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>46</b>
6.1. Composición química.....	46
6.2. Producción acumulada de biogás total (CO <sub>2</sub> y CH <sub>4</sub> ).....	48
6.3. Población de bacterias totales.....	50
6.4. Población de protozoarios.....	53
6.5. Población de bacterias celulolíticas.....	55
6.6. Degradabilidad de la materia seca y pH.....	57
6.7. Concentración de ácidos grasos volátiles.....	60
6.8. Emisiones de CO <sub>2</sub> y CH <sub>4</sub> .....	62
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>66</b>
<b>8. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>67</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Composición nutricional y degradación <i>in vitro</i> de forrajes arbóreos (%). .	5
<b>Cuadro 2.</b> Metabolitos secundarios presentes en las arbóreas forrajeras (% MS)...	12
<b>Cuadro 3.</b> Clasificación funcional de las bacterias. ....	14
<b>Cuadro 4.</b> Clasificación de las principales especies bacterianas del rumen según el tipo de sustrato que fermentan. ....	16
<b>Cuadro 5.</b> Clasificación de los principales protozoarios ruminales con los sustratos de fermentación preferentes. ....	17
<b>Cuadro 6.</b> Características de la fermentación ruminal. ....	21
<b>Cuadro 7.</b> Dietas experimentales. ....	37
<b>Cuadro 8.</b> Componentes del medio de cultivo para bacterias totales (GCA-FR).....	38
<b>Cuadro 9.</b> Componentes del medio de cultivo para bacterias celulolíticas. ....	42
<b>Cuadro 10.</b> Composición química de las dietas (% Base Seca).....	47
<b>Cuadro 11.</b> Producción acumulada de biogás total (mL) en trampas de solución salina acida por g MS <sup>-1</sup> durante la incubación a 72 h.....	49
<b>Cuadro 12.</b> Población de bacterias totales (10 <sup>10</sup> mL <sup>-1</sup> ) a diferentes tiempos de incubación. ....	52
<b>Cuadro 13.</b> Población de protozoarios (10 <sup>6</sup> mL <sup>-1</sup> ) a diferentes tiempos de incubación. ....	54
<b>Cuadro 14.</b> Población de bacterias celulolíticas (10 <sup>6</sup> mL <sup>-1</sup> ) a las 72 h de fermentación.....	56
<b>Cuadro 15.</b> Degradabilidad <i>in vitro</i> de la materia seca (DIVMS) y pH de las dietas.	58
<b>Cuadro 16.</b> Concentración de AGVs en las dietas después de 72 h de incubación.	61
<b>Cuadro 17.</b> Emisiones de CH <sub>4</sub> y CO <sub>2</sub> en las dietas después de 72 h de fermentación (mL g de MS <sup>-1</sup> ).....	64

## 1. INTRODUCCIÓN

La producción de rumiantes en el trópico en su mayoría es de tipo extensivo, se basa en el monocultivo de pastos nativos o introducidos y debido a prácticas inadecuadas de pastoreo la producción animal es deficiente (Delgado *et al.* 2001). Las variaciones del valor nutritivo de los pastos durante el año condicionan la producción de forraje, el rápido crecimiento, maduración y las diferencias morfológicas entre hojas y tallos afectan el porcentaje de digestibilidad que limita su aprovechamiento (Román 1981). Los forrajes tropicales tienen bajos porcentajes de proteína, altos niveles de fibra y baja digestibilidad; por tanto, bajo aporte de energía para los rumiantes (Ku *et al.* 2014).

Distintas investigaciones han buscado alternativas de fuentes de proteína para suplementar las dietas, en especial en la época de estiaje, donde la disponibilidad de pastos es menor. Las arbóreas son un recurso importante en los trópicos, mantienen su follaje por un periodo prolongado en comparación con las gramíneas (Birmania 2013), proveen un forraje rico en nutrientes (proteínas, vitaminas y minerales) que puede ser incluido en la dieta de los rumiantes para incrementar la calidad y la digestibilidad de la dieta (Wencomo 2008).

No obstante, estas plantas contienen altos niveles de metabolitos secundarios, que tienen diversos efectos en la fisiología animal (Sosa *et al.* 2004). Por otro lado, las cámaras de fermentación de los rumiantes producen metano (CH<sub>4</sub>), un potente gas de efecto invernadero (Carmona 2005). Los metabolitos secundarios presentes en las arbóreas como los taninos, saponinas, flavonoides, alcaloides y los compuestos organosulfurados, son una alternativa para reducir la metanogénesis ruminal (Kamra *et al.* 2006; Patra & Saxena 2010; Bodas *et al.* 2012; Vélez *et al.* 2014). En este sentido, el uso de especies arbustivas y leguminosas en la dieta de los rumiantes, constituyen una herramienta potencial para disminuir las emisiones de CH<sub>4</sub> (Mayorga *et al.* 2014).

Con base a la anterior información, este estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de la incorporación de 15%, 30% y 45% de *Moringa oleífera*, *Leucaena leucocephala*

o *Guazuma ulmifolia* en una dieta con base de pasto Estrella africana (*Cynodon nlemfuensis*) durante la fermentación ruminal *in vitro*; y determinar el óptimo nivel de inclusión de estas arbóreas en la dieta de los bovinos, para aumentar el contenido de proteína, disminuir el aporte de fibra y reducir las emisiones de CH<sub>4</sub>.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Alimentación de rumiantes en el trópico

En las zonas tropicales de México, más de 80% de la ganadería es de tipo extensivo. Los pastos son el principal forraje utilizado en la ganadería; se aplican diferentes métodos de pastoreo, se utilizan grandes áreas de pastos de baja calidad, donde se realiza escasa suplementación mineral y proteica (Marinidou & Jiménez 2010).

La calidad nutricional del forraje en las praderas, está directamente relacionada con el estado de madurez de los pastos, el cual es regulado por la temperatura ambiental (Livas 2015). Durante la estación de estiaje, el pasto contiene mayor porcentaje de fibra insoluble en detergente neutro (FIDN), bajo porcentaje de proteína cruda, menor digestibilidad y bajo contenido de energía metabolizable. En esta etapa, el consumo de materia seca (MS) de los rumiantes se reduce, y no cubre los requerimientos de energía para mantenimiento (Ku *et al.* 2014).

Livas (2015) indica que a medida que la temperatura ambiental se incrementa, el forraje tiende a un mayor crecimiento, causando disminución del contenido de proteína e incremento de las fracciones de fibra. En el trópico, cuando el forraje es pastoreado o cortado después de 30 d, los rumiantes consumen un pasto con menor contenido de energía, minerales y proteína.

### 2.2. Composición química de los pastos del trópico

El contenido de proteína de los pastos tropicales es bajo, tanto de la proteína soluble, como la de sobre paso (Pérez *et al.* 2001). Las gramíneas tropicales como el pasto Estrella africana, son altamente sensibles a cambios en las horas luz durante el año; lo que afecta la producción de biomasa y el valor nutricional; el género *Cynodon* se caracteriza por su capacidad de extraer nutrientes del suelo (Villalobos & Arce 2014).

El pasto *Cynodon nlemfuensis* debe tener un período de recuperación entre 4 y 5 semanas entre pastoreos o cortes sucesivos, de tal forma que su persistencia no se

vea afectada para mantener alta producción de MS, contenido de proteína cruda (PC) de 11% a 16% y digestibilidad mayor a 50% (Villalobos & Arce 2014).

### **2.2.1. Composición nutricional del pasto *Cynodon nlemfuensis***

Guerra & Lagos (2014) reportan que el pasto Estrella africana tiene altos rendimientos, lo cual lo clasifica como un forraje de alta calidad, si tiene el manejo adecuado puede producir de 25 ton a 30 ton de MS/ha/año. En general, el pasto puede alcanzar de 10% a 15% de PC y una digestibilidad de 55% a 68%.

Sánchez & Soto (1999) reportan para *C. nlemfuensis* valores de 23.1% para MS, 17.1% de PC, 72.3% de FIDN, contenido de carbohidratos solubles de 5.3% y degradabilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) de 70.2%; con variaciones de acuerdo a la época del año.

Villalobos & Arce (2014) por su parte, reportan para *C. nlemfuensis* valores de 23.57% de MS promedio con variaciones de acuerdo al clima, llegando hasta 29.47% en temporada de estiaje y 18.55% durante las lluvias; 20.27% de PC con variaciones en la época de mayor precipitación alcanzando valores de 25.58% y 16.07% de PC en la época de estiaje.

En otros estudios, se han determinado contenidos de extracto etéreo de 2.67% y cenizas 10.97%; en los componentes de la pared celular, 64.21% para FIDN con cambios durante el año y 34.95% para la fibra insoluble en detergente ácido (FIDA), el contenido de lignina promedio fue de 4.06%. La DIVMS promedio fue de 68.02% y el contenido energético estimado de ED, EM, ENL y ENG mostraron valores promedio de 2.71 Mcal, 2.05 Mcal, 1.25 Mcal y 0.78 Mcal kg<sup>-1</sup> de MS respectivamente (Villalobos & Arce 2014).

### **2.3. Alimentación alternativa para bovinos en el trópico**

El uso de las leguminosas en asociación con pastos, representa una posible solución para resolver el problema de alimentación de bovinos en el trópico. Estas plantas son una fuente alternativa importante de proteína para el ganado bovino, debido a que

las leguminosas tienen una mayor cantidad de proteína, lo cual representa una de las principales limitantes de los pastos tropicales; además, aumentan la disponibilidad de forraje de mayor calidad durante la temporada de estiaje (Bustamante 2004).

### 2.3.1. Arbustivas como alimento alternativo en el trópico

Birmania (2013) reporta que, en las regiones tropicales, los árboles son una fuente importante de forrajes, porque mantienen su follaje por un período más prolongado en comparación con las gramíneas. Los árboles forrajeros producen niveles altos de PC y biomasa más que otros forrajes, como gramíneas y leguminosas rastreras (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Composición nutricional y degradación *in vitro* de forrajes arbóreos (%).

Arbóreas	MS	PC	FIDN	FIDA	EE	Cenizas	DIVMS
<i>Moringa</i>	17-21	11-18	45-66	44	2.4-3.8	12.1-15.2	64
<i>Leucaena</i>	28-30	18-30	36-48	15-24	1.7-2.4	5.7-12	41-48
<i>Guazuma</i>	26	9-15	53-79	22-44	0.8-2.3	7.8-11.8	22-47

MS: materia seca, PC: proteína cruda, FIDN: fibra insoluble en detergente neutro, FIDA: fibra insoluble en detergente ácido, EE: extracto etéreo, C: cenizas, DIVMS: degradabilidad *in vitro* de la materia seca.

Adaptado de: (García *et al.* 2006; Cordoví *et al.* 2013; Molina *et al.* 2013; Cuartas *et al.* 2015; Gutiérrez *et al.* 2015; Vélez *et al.* 2015; Mojica *et al.* 2017; Hernández *et al.* 2018; Gutiérrez *et al.* 2018).

#### 2.3.1.1. *Moringa oleífera*

Todas las partes de la planta son comestibles. Sus hojas, tallos, vainas y flores contienen nutrientes para los animales. Son ricas en proteínas, vitaminas y minerales. Las hojas de *Moringa* constituyen uno de los forrajes más completos y tienen buena gustocidad para los rumiantes. Las hojas y tallos tiernos son apetecidos por los animales (Birmania 2013). García *et al.* (2006) han reportado valores de PC de 18.82%, FIDN de 45.13%, 2.60% de nitrógeno no proteico (NNP), 0.20% de fósforo,

2.65% de potasio, 0.24% de sodio, 3.10% de calcio, 1.94% de magnesio, 12.18% de cenizas y 24.14% de carbohidratos solubles.

Investigaciones realizadas en árboles de 6 años por Pérez *et al.* (2010), reportaron una composición química en hojas y tallos jóvenes de 66.86% de MS, 21.59% de proteína, 3.73% de extracto etéreo, 9.83% de cenizas, 2.99 Mcal/Kg/MS de energía digestible y 2.45 Mcal/Kg/MS de energía metabolizable. En hojas y tallos desarrollados 34.90% de MS, 26.74% de proteína, 3.80% de extracto etéreo, 10.63% de cenizas, 2.93 Mcal/Kg/MS de energía digestible y 2.39 Mcal/Kg/MS de energía metabolizable.

#### **2.3.1.2. *Leucaena leucocephala***

Es una arbórea forrajera, que proporciona alimento para el ganado en cantidad y calidad todo el año (Birmania 2013), se puede aprovechar como forraje verde de corte o ramoneo, o como harina. Es muy apetecida por el ganado bovino, su contenido de proteína varía de 22% a 26% (Bustamante 2004). Izaguirre & Martínez (2008) reportan 22% de PC y 52.7% de DIVMS.

Sánchez *et al.* (2001) reportan valores de MS de 34.9%, 26.7% de PC, 39.5% de FIDN, 23.9% de FIDA, 7.9% de cenizas y 53.6% de DIVMS para las hojas; y 33.3% de MS, 8.1% de PC, 72.8% de FIDN, 55.0% de FIDA, 6.8% de cenizas y 36.5% de DIVMS en los tallos.

#### **2.3.1.3. *Guazuma ulmifolia***

Murgueitio & Calle (2011) y Birmania (2013) indican que el follaje de este árbol es un alimento muy nutritivo, con gran capacidad forrajera por su alta producción de biomasa y su gran capacidad de rebrote después de la poda, los animales aprovechan los retoños, hojas y frutos, que son muy apetecidos por el ganado bovino. Es una buena alternativa en la dieta de los bovinos durante cualquier época del año. Es un árbol para ramoneo, cuyas hojas y frutos tienen 15% de PC.

La DIVMS oscila entre 40% y 60%, Izaguirre & Martínez (2008) han reportado valores de 15% para PC y DIVMS de 54.1%. La proteína en los frutos varía entre 7% y 10%, en las hojas tiernas entre 16% y 23% y en los tallos jóvenes entre 7% y 8% (Birmania 2013; Murgueitio & Calle 2011). Por otra parte, Sánchez *et al.* (2001) han reportado valores de MS de 32.4%, 15.5% de PC, 42.6% de FIDN, 25.9% de FIDA, 10.9% de cenizas y 53.5% de DIVMS para las hojas y 43.5% para MS, 5.2% de PC, 71.6% de FIDN, 54.1% de FIDA, 8.2% de cenizas y 32.4% de DIVMS en los tallos.

## **2.4. Metabolitos secundarios en las arbóreas**

Son compuestos de origen vegetal, que producen y almacenan las plantas, que no están directamente implicados en su crecimiento, desarrollo o reproducción, pero que pueden ser los responsables del olor o sabor, servir como mensajeros químicos entre las plantas y el medio (responsables de atraer a insectos polinizadores) y protegerse de los herbívoros (Carro *et al.* 2017).

Vélez *et al.* (2014) indican que las plantas producen los metabolitos secundarios, como medio de adaptación a ambientes adversos como temperatura, humedad, intensidad de luz, sequía y defensa al ataque de insectos y microorganismos. Estos compuestos tienen la capacidad de provocar efectos farmacológicos y toxicológicos en los animales. También tienen efectos bactericidas y bacteriostáticos en la microbiota ruminal, y actúan como inhibidores de la fermentación (Carmona 2007).

### **2.4.1. Saponinas**

Compuestos bioactivos en plantas, también presentes en algunos organismos marinos e insectos. De acuerdo a la composición química de la aglicona o sapogenina, las saponinas se dividen en esteroides y triterpenoides. Los esteroides predominan en las plantas y son compuestos que tienen 27 átomos de carbono que conforman la estructura central. Los triterpenoides están compuestos principalmente por agliconas con 30 átomos de carbono (Vélez *et al.* 2014). Son glucósidos, encontrados en algunas arbóreas y arbustivas forrajeras tropicales, las cuales tienen

efectos en la fermentación de los rumiantes, estas se unen a los azúcares conjugados de triterpenoides o esteroides formando espumas estables al entrar en contacto con el agua y el calor del contenido ruminal, confiriéndole potencialidad como factor timpánico; además, tienen un característico sabor amargo. Por su efecto irritante en la mucosa bucal y de la faringe, le confiere una baja palatabilidad, lo cual provoca bajo consumo voluntario (Carmona 2007).

Carmona (2007) reporta que las saponinas afectan la fermentación ruminal, y forman complejos insolubles con algunos minerales como calcio, hierro y zinc; haciéndolos no disponibles para el animal. Este metabolito puede afectar el crecimiento de las bacterias celulolíticas, pero los rumiantes en pastoreo pueden adaptarse a ellas y detoxificarlas. Estos compuestos pueden tener ventajas como sustancia defaunante a nivel ruminal, la disminución de la población de protozoarios reduce la degradabilidad ruminal de la proteína del alimento y aumenta el crecimiento de la masa microbiana, esto aumenta el flujo duodenal de aminoácidos, y mayor cantidad de proteína llega al intestino delgado para cubrir las necesidades del animal. También se ha observado aumento de las proporciones de ácido propiónico, lo que aumenta la disponibilidad de glucosa para el rumiante (Carro *et al.* 2017).

Las dietas de baja calidad en el trópico, son limitantes en cuanto a la proteína, bajo estas condiciones la defaunación puede ser benéfica. El follaje y la vaina de *Enterolobium cyclocarpum* han sido evaluados como agentes defaunantes, se reporta que mejoran la respuesta productiva de los bovinos, la degradación de carbohidratos estructurales y el flujo de proteína microbial al duodeno. Esta actividad se le atribuye a su contenido de saponinas, las cuales tienen un efecto citotóxico (Carmona 2007).

#### **2.4.2. Compuestos fenólicos**

Las plantas sintetizan una gran variedad de compuestos fenólicos (cumarinas, flavonoides, lignina y taninos). Estas sustancias derivan del fenol, un anillo aromático con un grupo hidroxilo. Comprende moléculas como los ácidos fenólicos y polímeros complejos como los taninos y la lignina (Ávalos & Pérez 2009). La lignina es el

principal factor que limita la degradabilidad de la dieta, los isoflavones pueden tener actividad estrogénica en animales en pastoreo, estas sustancias pueden afectar la fertilidad de machos y hembras. El efecto defaunante de algunas arbóreas forrajeras se debe a la presencia de sustancias fenólicas, adicionalmente afectan la palatabilidad de las arbóreas forrajeras (Carmona 2007).

#### **2.4.2.1. Cumarina**

Carmona (2007) reporta que la cumarina es un metabolito perteneciente al grupo de los isoflavones, que se encuentra ampliamente distribuida entre las leguminosas. Este metabolito se origina durante la fermentación en el rumen, y se le atribuye efecto hemorrágico debido a su actividad específica antivitamina K. Además, el mismo autor reporta que la presencia de cumarinas en el follaje de las arbóreas afecta su palatabilidad. Por otro lado, su efecto antifúngico, puede afectar de forma indirecta la degradación de los carbohidratos estructurales, y por tanto, la degradabilidad de los forrajes. Estos efectos adversos en el animal dependen de la concentración total en la dieta.

#### **2.4.2.2. Flavonoides**

Están compuestos por quince átomos de carbono, con dos anillos aromáticos conectados por un puente de tres carbonos. Son los compuestos fenólicos más numerosos y se encuentran en todo el reino vegetal, están presentes en altas concentraciones en la epidermis de las hojas y cascaras de las frutas. Estos compuestos son importantes como metabolitos secundarios (Vélez *et al.* 2014); las arbóreas que contienen flavonoides reducen la producción ruminal de CH<sub>4</sub> y estimulan el metabolismo microbiano (Patra & Saxena 2010; Bodas *et al.* 2012). Además, Broudiscou & Lassalas (2000) reportan que mejoran la tasa de fermentación de la dieta, con un aumento en la liberación de acetato y propionato, reduciendo así las emisiones de CH<sub>4</sub>. También tienen funciones como pro oxidantes, pero se producen sólo a dosis altas; adicionalmente se ha reportado que tienen efectos antiinflamatorios, antivirales o antialérgicos (Martínez *et al.* 2002).

### 2.4.2.3. Taninos

Son un grupo heterogéneo de compuestos fenólicos solubles en agua, de alto peso molecular, la presencia de un gran número de grupos hidroxilo fenólicos les otorga la capacidad de formar complejos con las proteínas, y en menor medida con iones metal, aminoácidos y polisacáridos. Estos compuestos se pueden encontrar en arbustos y árboles forrajeros, leguminosas, frutas, cereales y granos (Vélez *et al.* 2014). Carmona (2007) reporta la afinidad de los taninos por las proteínas. Éstos se han dividido en dos grupos con base a su origen químico: hidrolizables y condensados. Los primeros son polímeros de ácidos fenólicos y los condensados son polímeros de falvan-3-ol.

Los taninos afectan la digestibilidad de la celulosa debido a la disminución de la actividad microbial, también alteran la estructura de la celulosa, evitan la fijación de los microorganismos y el proceso fermentativo. El efecto inhibitorio de los taninos sobre la descomposición de la celulosa y la hemicelulosa se debe a la inactivación de las exoenzimas microbianas involucradas en el proceso de hidrólisis. Adicionalmente disminuyen la absorción de nutrientes, principalmente aminoácidos esenciales como metionina y lisina (Carmona 2007).

Los taninos pueden unirse a las proteínas y formar complejos estables a pH ruminal de 6.0 a 7.0. Estos complejos se disocian a valores de pH inferiores a 3.5, los cuales se encuentran en el abomaso, y superiores a 7.5 como en el intestino delgado; por lo que las proteínas pueden ser digeridas en el abomaso e intestino delgado sin haberse degradado en el rumen (Carro *et al.* 2017).

Carmona (2007) indica que esta propiedad para ligar las proteínas con pH neutro y liberarlas con valores de pH bajo; ha llevado a varios investigadores a considerarlos como aditivos para aumentar la proteína de sobre paso en el rumen, aumentando así, el flujo y la absorción de aminoácidos esenciales en el intestino delgado. Bajas concentraciones de taninos condensados pueden incrementar el nivel de aminoácidos azufrados que entran al torrente sanguíneo, pero se puede presentar toxicidad cuando el consumo de taninos es alto, llevando incluso al animal a estado

comatoso y a la muerte. En casos severos de intoxicación se pueden presentar necrosis renal pancreática y de piel.

Los taninos también pueden formar complejos con otros componentes de los alimentos (minerales, almidón y celulosa), por lo que pueden reducir la digestibilidad de los alimentos y la productividad de los animales (Carro *et al.* 2017).

#### **2.4.5. Concentración de metabolitos secundarios en las arbóreas forrajeras**

Aunque las leguminosas son en general digestibles, diversos metabolitos secundarios presentes en algunas especies, pueden afectar el ataque microbiano a los polisacáridos estructurales, y la degradación por los microorganismos ruminales en los diferentes forrajes (Carmona 2007).

##### **2.4.5.1. *Moringa oleífera***

En diversas partes de la planta se han identificado metabolitos secundarios (Cuadro 2). El contenido de fenoles totales es de 34 mg g<sup>-1</sup>, el de taninos 14 mg g<sup>-1</sup>, saponinas 50 mg g<sup>-1</sup> y fitatos de 31 mg g<sup>-1</sup> (Velázquez *et al.* 2016). La altura de la planta, edad y la combinación de estos dos factores modifican las concentraciones de metabolitos secundarios en las plantas de *Moringa oleífera* (Cabrera *et al.* 2017).

##### **2.4.5.2. *Leucaena leucocephala***

La edad tiene un marcado efecto sobre las concentraciones de metabolitos, más acentuados en el período lluvioso; Verdecía *et al.* (2012) reportan la presencia de metabolitos secundarios (Cuadro 2) durante el período lluvioso, flavonoides, alcaloides y saponinas aumentan con la edad hasta los 180 d, por su parte, los taninos, fenoles, taninos condensados, taninos ligados a la fibra, taninos libres, verbascosa y estaquiosa incrementaron sus valores hasta los 120 d para luego disminuir hasta los 180 d.

**Cuadro 2.** Metabolitos secundarios presentes en las arbóreas forrajeras (% MS).

<b>Especie</b>	<b>FT</b>	<b>TC</b>	<b>TPP</b>	<b>ET</b>
<i>Moringa</i>	3.87	1.02	0.30	1.02
<i>Leucaena</i>	4.32	2.15	4.20	0.52
<i>Guazuma</i>	1.73	0.10	1.02	1.00

Fenoles totales (FT), Taninos condensados (TC), Taninos precipitantes de proteínas (TPP), Esteroles totales (ET).  
(García *et al.* 2008).

Durante el periodo de estiaje los taninos, fenoles, taninos condensados, taninos libres, flavonoides, alcaloides, presentan un incremento en su concentración hasta los 180 d, la verbascosa decrece de los 60 d hasta los 180 d, mientras que los taninos ligados a la fibra, estaquiosa y rafinosa no presentan cambios en su concentración (Verdecía *et al.* 2012).

En algunos reportes los taninos están por debajo de las cantidades toxicas en la fracción comestible de algunas leguminosas utilizadas en los sistemas de alimentación. La concentración de estos metabolitos secundarios fue superior a la mínima notificada en la cual se afecta la fermentación en el rumen (fenoles: 40 g/kg/MS; taninos: 40 g/kg/MS; taninos condensados: 60 g/kg/MS) (Verdecía *et al.* 2012).

#### **2.4.5.3. *Guazuma ulmifolia***

Luna & González (2017) reportan la presencia de metabolitos secundarios (Cuadro 2) como: alcaloides, fenoles, flavonoides, glucósidos, saponinas y terpenos en los tallos de dos etapas fenológicas; y resaltan que existe una mayor presencia, de ellos, en la etapa de floración que en la de fructificación. Los metabolitos comunes en ambas etapas son los fenoles, glucósidos y saponinas, y los alcaloides solo se encontraron en la etapa de floración.

Pinto *et al.* (2009) reportan concentraciones de fenoles totales y taninos condensados en el follaje de *Guazuma* en el trópico seco de 28.01 g/Kg/MS y 47.11 g/Kg/MS respectivamente y valores en frutos de 6.04 g/Kg/MS y 2.80 g/Kg/MS respectivamente.

## **2.5. Microorganismos ruminales y cinética ruminal**

Los microorganismos presentes en el rumen mantienen una estrecha relación simbiótica con el rumiante. La diversidad microbiana esta compuesta por bacterias, protozoarios, hongos y bacteriófagos (Kamra 2005); los cuales son responsables de la degradación ruminal del alimento en las cámaras de fermentación, donde disponen de las condiciones necesarias para su existencia y actividad metabólica (Owens & Goetsch 1988; Casas 2018).

La humedad del contenido ruminal en la region dorsal del rumen es de 86% a 88%, en la region ventral es de aproximadamente 94% (Yokoyama & Johnson 1988). La fermentación ruminal mantiene una osmolaridad entre 260 mOsm y 340 mOsm (Contreras & Noro 2010), y puede aumentar hasta 350 mOsm o 400 mOsm después de consumir leguminosas o concentrados (Araujo & Vergara 2007).

El pH puede variar de 5.5 a 7.2; aunque valores por debajo de 6.0 disminuyen o inhiben la actividad de las bacterias celulolíticas. El potencial redox oscila entre -250 milivolts y -450 milivolts, lo que refleja la ausencia de oxígeno y exceso de poder reductor (Van Soest 1982; Contreras & Noro 2010) que asegura un ambiente anaerobio, requerido por la mayoría de los microorganismos ruminales (Miron *et al.* 2001; Casas 2018).

La composición de la mezcla de los gases producidos en el rumen es aproximadamente de 65% de CO<sub>2</sub>, 27% de CH<sub>4</sub>, 7% de N<sub>2</sub>, 0.6% de O<sub>2</sub>, 0.2% de H<sub>2</sub> y 0.01% de H<sub>2</sub>S. La temperatura se mantiene constante entre 38 C y 42 C. (Yokoyama & Johnson 1988; Contreras & Noro 2010).

### 2.5.1. Bacterias ruminales

Las bacterias ruminales se encuentran ubicadas en tres sitios diferentes del rumen: 1) adheridas a la pared, hidrolizan la urea y consumen pequeñas cantidades de oxígeno que llegan con el alimento ingerido o que se difunde a través de la pared del rumen. 2) las asociadas a partículas del alimento (bacterias celulolíticas y hemicelulolíticas) que atacan paredes celulares. 3) las que flotan en el líquido ruminal, las cuales atacan sustratos solubles como proteínas y almidones (Van Lier & Regueiro 2008). Las bacterias son importantes para la fermentación ruminal, son responsables de la mayor parte de la actividad fermentativa del rumen y poseen capacidad para sintetizar proteínas a partir de amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) (Cuadro 3) (Relling & Mattioli 2003).

**Cuadro 3.** Clasificación funcional de las bacterias.

Grupo de bacterias	Característica funcional	Principales productos finales de su metabolismo
Celulolíticas	Fermentan hidratos de carbono estructurales de la pared celular (celulosa, hemicelulosa y pectinas)	AGV (acetato)
Amilolíticas	Fermentan hidratos de carbono de reserva de granos (almidón)	AGV (propionato)
Sacarolíticas	Fermentan hidratos de carbonos simples (azúcares vegetales)	AGV (butirato)
Lactolíticas	Metabolizan el lactato	AGV (propionato)
Lipolíticas	Metabolizan las grasas	Ácidos grasos libres y AGV (propionato)
Proteolíticas	Degradan las proteínas	AGV y amoníaco ( $\text{NH}_3$ )
Metanogéneas	Producen metano	Metano ( $\text{CH}_4$ )
Ureolíticas	Hidrolizan la urea	$\text{CO}_2$ y $\text{NH}_3$

(Relling & Mattioli 2003).

El número de bacterias en el rumen varía entre  $10^{10}$  y  $10^{11}$  bacterias por mililitro de fluido ruminal (Kumar *et al.* 2009), se agrupan en 32 géneros y 63 especies de las cuales, 16 géneros y 28 especies se consideran importantes (Cuadro 4); (Yokohama & Johnson 1988). Tienen una tasa de generación de 3 h a 48 h (Madigan *et al.* 2002), debido a que existe un constante arrastre hacia el abomaso e intestinos por lo que la población tiene un rápido y continuo recambio. Las bacterias del rumen se clasifican en función del sustrato que utilizan, o de los productos finales que forman. De acuerdo al sustrato de fermentación se pueden clasificar en microorganismos que degradan celulosa, hemicelulosa, almidón, azúcares, ácidos intermedios, proteínas, pectina o lípidos. En una clasificación más extensa se pueden incluir a los grupos de *Archaeas* productoras de metano, bacterias productoras de amoníaco y bacterias con actividad ureolítica (Cuadros 3 y 4) (Yokoyama & Johnson 1988).

### **2.5.2. Protozoarios**

Van Lier & Regueiro (2008) reportan que los protozoarios en el rumen se encuentran en menor número que las bacterias, su población es de  $10^5$  a  $10^6$  protozoarios por mililitro de fluido ruminal (Yokoyama & Johnson 1988; Kumar *et al.* 2009). Comprenden más de 24 géneros y 257 especies (Zapata & Polanco 2010), al tener mayor tamaño (20  $\mu\text{m}$  a 200  $\mu\text{m}$ ) poseen una masa total que puede llegar a ser igual o incluso superior a la bacteriana (Van Lier & Regueiro 2008).

Estos microorganismos tienen una tasa de generación de 24 h a 48 h (Williams & Coleman 1992; Newbold *et al.* 2015) por lo que evitan ser transportados hacia el abomaso. Esto se realiza mediante el fenómeno conocido como autosequestro, donde los protozoarios se ubican en los sacos ciegos caudo-dorsal y caudo-ventral del rumen, o se adhieren a las partículas alimenticias de mayor tamaño para evitar el arrastre. Generalmente aparecen más protozoarios en el rumen cuando los animales reciben dietas de mayor degradabilidad; ingieren bacterias como fuente de proteína y compiten por sustratos (Blanco 1999); además, participan en la digestión de almidones, englobándolos en su interior y protegiéndolos de la fermentación bacteriana (Van Lier & Regueiro 2008).

**Cuadro 4.** Clasificación de las principales especies bacterianas del rumen según el tipo de sustrato que fermentan.

<b>Principales especies celulolíticas</b>	<b>Principales especies proteolíticas</b>
<i>Fibrobacter succinogenes</i>	<i>Ruminobacter amylophilus</i>
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	<i>Prevotella ruminicola</i>
<i>Ruminococcus albus</i>	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	<i>Streptococcus bovis</i>
<b>Principales especies hemicelulolíticas</b>	<b>Principales especies lipolíticas</b>
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	<i>Anaerovibrio lipolytica</i>
<i>Prevotella ruminicola</i>	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>
<i>Ruminococcus sp.</i>	<i>Treponema bryantii</i>
	<i>Eubacterium sp.</i>
	<i>Fusocillus sp.</i>
	<i>Micrococcus sp.</i>
<b>Principales especies pectinolíticas</b>	<b>Principales especies productoras de metano</b>
<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	<i>Methanobrevibacter ruminantium</i>
<i>Prevotella ruminicola</i>	<i>Methanobacterium formicicum</i>
<i>Lachnospira multiparus</i>	<i>Methanomicrobium mobile</i>
<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>	
<i>Treponema bryantii</i>	
<i>Streptococcus bovis</i>	
<b>Principales especies amilolíticas</b>	<b>Principales especies productoras de amoniaco</b>
<i>Ruminobacter amylophilus</i>	<i>Prevotella ruminicola</i>
<i>Streptococcus bovis</i>	<i>Megasphaera elsdenii</i>
<i>Succinomonas amylolytica</i>	<i>Selenomonas ruminantium</i>
<i>Prevotella ruminicola</i>	
	<b>Principales especies ureolíticas</b>
<b>Principales bacterias utilizadoras de azucares</b>	<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i>
<i>Treponema bryantii</i>	<i>Selenomonas sp.</i>
<i>Lactobacillus vitulinus</i>	<i>Prevotella ruminicola</i>
<i>Lactobacillus ruminus</i>	<i>Ruminococcus bromii</i>
	<i>Butyrivibrio sp.</i>
<b>Principales especies utilizadoras de ácidos</b>	<i>Treponema sp.</i>
<i>Megasphaera elsdenii</i>	
<i>Selenomonas ruminantium</i>	

Adaptado de Yokoyama & Johnson (1988).

Tienen una función importante en el reciclaje del nitrógeno ruminal porque consumen grandes partículas de alimento y bacterias ruminales (Van Soest 1994); también son un suministro constante de proteína soluble al ambiente ruminal, debido a la capacidad que poseen para degradar la proteína insoluble de las fracciones de alimento atrapado, no tienen la capacidad de utilizar el N amoniacal (Dijkstra 1994).

Estos microorganismos se pueden clasificar en dos subclases, *Entodiniomorfa* y *Holotrica* (Cuadro 5) (Hungate 1966). Zapata & Polanco (2010) reportan que se consideran 11 los géneros más representativos dentro de las poblaciones ruminales de bovinos (*Entodinium*, *Diplodinium*, *Eudiplodinium*, *Ostracodinium*, *Metadinium*, *Enoploplastron*, *Polyplastron*, *Epidinium*, *Ophryoscolex*, *Isotricha* y *Dasytricha*).

**Cuadro 5.** Clasificación de los principales protozoarios ruminales con los sustratos de fermentación preferentes.

Subclase	Genero	Sustrato fermentado
<i>Holotrica</i>	<i>Isotricha</i>	Almidón y azúcares
	<i>Dasytricha</i>	Almidón y azúcares
	<i>Entodiniomorfa</i>	
	<i>Entodinium</i>	Almidón
	<i>Epidinium</i>	Almidón y hemicelulosa
	<i>Ophryoscolex</i>	Almidón
	<i>Diplodinium</i>	Celulosa
	<i>Eudiplodinium</i>	Celulosa
	<i>Polyplastron</i>	Celulosa

(Hungate 1966; Williams & Coleman 1992).

La caracterización taxonómica de los protozoarios ciliados ruminales se ha realizado con base en su morfología. Estructuras comunes como el macronúcleo, micronúcleo, vacuolas (contráctil, de concreción y alimenticia), vestíbulos o citostomas y citofaringe, se observan entre integrantes de los dos órdenes, variando en tamaño, forma y posición según el género, especie o subespecie. El tamaño y la forma del protozoario son claves taxonómicas importantes para la identificación al igual que el número y posición de las zonas ciliares. Los ciliados del orden *Entodiniomorpha* se caracterizan por tener 1, 2 o 3 zonas ciliares, a diferencia del orden *Vestibuliferida* quienes presentan cilios somáticos y uniformes (Zapata & Polanco 2010).

Los protozoos ruminales son anaerobios estrictos, Blanco (1999) indica que los protozoarios son muy versátiles en su capacidad para degradar y fermentar una amplia gama de sustratos. Ingieren las partículas de los alimentos y atacan los principales componentes de los vegetales, incluyendo celulosa, hemicelulosa, pectina, almidón, azúcares solubles y lípidos.

Están capacitados para almacenar gránulos de almidón, los cuales pueden ser usados como fuente de energía durante los intervalos de ingesta de alimento, el ingreso posterior de los protozoarios al abomaso y al intestino, permite el aprovechamiento de sus proteínas somáticas por parte del rumiante (Blanco 1999).

Por otro lado, es importante mencionar que la proteína microbiana que se genera en el rumen proporciona más de la mitad de los aminoácidos absorbidos por los ruminantes y puede constituir entre 70% y 100% del nitrógeno disponible en las partes bajas del tubo digestivo en los ruminantes que consumen dietas fibrosas y con bajo contenido de proteínas (Ørskov 1992). El valor biológico de estas proteínas es de 80%, y su digestibilidad de 91% (Blanco 1999).

### **2.5.3. Hongos**

En el rumen existen hongos anaerobios, sus concentraciones van de  $10^3$  a  $10^5$  zoosporas por mililitro de fluido ruminal. Los géneros más frecuentes en el rumen son *Neocallimastix*, *Caecomyces*, *Pyromyces* y *Orpinomyces* (Van Soest 1982). Se ha reportado que la población de hongos anaerobios del rumen está directamente

relacionada con el contenido en fibra de la dieta. Cuando los animales consumen dietas altas en forraje, los hongos del rumen pueden aportar 8% de la masa microbiana (Yokoyama & Johnson 1988). Su proporción disminuye cuando el rumiante consume dietas ricas en almidón (Reyes *et al.* 2008).

Su ciclo de vida está caracterizado por presentar dos fases bien diferenciadas, una móvil de zoospora y una vegetativa reproductiva no móvil. Las zoosporas antes de adherirse a las partículas del alimento, muestran ciertos cambios en su morfología de tipo amiboideo, los cuales son considerados como preparatorios para el enquistamiento. La posterior terminación de la zoospora enquistada da como resultado la producción de un tallo con una amplia porción radical (rizoide) y el esporangio (Obispo 1992).

El desarrollo de los rizoides es rápido, el tamaño del esporangio maduro es alcanzado entre 12 h y 24 h después de la fijación de la zoospora. Y la aparición de la zoosporogénesis se inicia con la aparición del tabique o septum, que constituye una barrera para el flujo del citoplasma desde el sistema radical. Se ha estimado que la duración del ciclo de vida de los hongos anaeróbicos del rumen puede durar entre 24 h y 32 h (Obispo 1992). Debido a su baja tasa de generación no predominan en el rumen en comparación con las bacterias (Relling & Mattioli 2003).

Se ha demostrado que los hongos producen enzimas capaces de degradar los componentes estructurales de las paredes celulares de los vegetales. Debido a lo anterior tienen una importante función en la degradación de la fibra en el rumen (Obispo 1992; Van Lier & Regueiro 2008), en especial cuando el rumiante consume forrajes de baja calidad.

Los hongos ruminales tienen la capacidad enzimática para hidrolizar celulosa y xilano, pero no pueden utilizar la lignina como fuente de energía, solo la solubilizan (Fonty & Joblin 1991). Sus rizoides pueden penetrar y facilitar la degradación de la pared celular (Van Soest 1982), esta acción disminuye la rigidez estructural de los forrajes y favorece la ruptura de las partículas, aumentando así, la superficie accesible para la acción bacteriana (Reyes *et al.* 2008). Además, los hongos desarrollan actividad proteolítica en las partículas vegetales a las que se adhieren en

el proceso de degradación de la pared celular (Wallace & Cotta 1988). Wallace (1991) reporta que *Neocallimastix frontalis*, tienen una alta actividad proteolítica extracelular de tipo metaloproteasa.

#### **2.5.4. Bacteriofagos**

Su principal componente molecular es ácido desoxirribonucleico (ADN) y proteínas (Joklik 1997). Su función primordial es controlar la población y actividad de las bacterias ruminales (Reyes *et al.* 2008). Su ciclo de vida, requiere de la maquinaria enzimática de la célula hospedadora para replicar, transcribir y traducir su código genético. Este ciclo consta de una fase lisogénica, conocida también como atemperada, que inicia una vez que el virus inserta su genoma en el ADN de la bacteria, y el material genético se reproduce a la par de cada división celular, sin afectar la viabilidad de ambos. La segunda fase conocida como lítica, es donde el fago domina la maquinaria biosintética de la bacteria, así como la replicación de ADN y la transcripción de ADN al ARN mensajero (ARNm), generando que la traducción del ARNm a biomoléculas (ácidos nucleicos y proteínas) se realice exclusivamente con el material genético del virus. El ciclo lítico termina con la lisis de la bacteria y la liberación de nuevos virus al medio (Joklik 1997).

Se han reportado cantidades de  $3.0 \times 10^9$  a  $1.6 \times 10^{10}$  de partículas virales por mililitro de líquido ruminal (Ley *et al.* 2015; Gilbert *et al.* 2017); pero el recuento mínimo total reportado por Yokoyama & Johnson (1988) ha estimado  $5 \times 10^7$  fagos por mililitro de fluido ruminal, estos autores reportan que han sido identificados más de 125 tipos morfológicos diferentes; sin embargo, Klieve & Swain (1993) reportan que la cantidad de fagos dependerá de la metodología de aislamiento y la mayor cantidad de partículas virales se ha obtenido con la técnica de ultracentrifugación.

#### **2.6. Fermentación Ruminal**

El rumen es una cámara de fermentación anaeróbica donde se mantiene constante la población microbiana al ingerir alimentos, añadiendo amortiguadores mediante la

saliva y donde son adsorbidos los ácidos orgánicos producidos, los residuos alimenticios no digeribles y la masa microbiana son arrastrados al abomaso e intestino delgado, manteniendo las condiciones apropiadas de pH, temperatura, osmolaridad, potencial redox y humedad para el crecimiento microbiano (Owens & Goetsch 1988; Casas 2018). Los microorganismos dependen del consumo de alimento y de las condiciones óptimas del rumen para su crecimiento, y el rumiante depende de los productos de la fermentación de la actividad biosintética microbiana, para satisfacer sus necesidades metabólicas (Yokoyama & Johnson 1988).

La fermentación en el rumen es el resultado de actividades bioquímicas y microbiológicas que transforman los componentes de la dieta en productos útiles para el animal como son los ácidos grasos volátiles, proteína microbiana, amoníaco y vitaminas del complejo B (Sosa *et al.* 2010). Además, se producen sustancias de desecho como CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> (Cuadro 6), (Owens & Goetsch 1988; Ramírez *et al.* 2014). La degradación de los sustratos por la acción de los microorganismos es realizada mediante hidrólisis enzimática. Esta fermentación anaerobia solo ocurre en el retículo y en el rumen (Prieto *et al.* 2016).

**Cuadro 6.** Características de la fermentación ruminal.

<b>Componente del alimento</b>	<b>Constituyente químico (polímero)</b>	<b>Componentes químicos (monómeros)</b>	<b>Productos de la fermentación ruminal</b>
Extracto libre de nitrógeno	Carbohidratos (hexosanas)	Glucosa y otras hexosas	Acetato, propionato y butirato
Fibra bruta	(pentoxana)	Pentosas	Pentosas
Proteína bruta	Nitrógeno no proteico	Aminoácidos	Aminoácidos e isobutirato, isovalerato y amoníaco
Grasa bruta	Triglicéridos galactocidos	Glicerina Ácidos grasos	Propionato y ácidos grasos saturados
Ceniza bruta	Minerales	Elementos	Células microbianas + CO <sub>2</sub> y CH <sub>4</sub>

(Owens & Goetsch 1988).

### 2.6.1. Degradación de Carbohidratos

Fahey & Berger (1988) reportan que la mayoría de los carbohidratos solubles consumidos por los rumiantes son en forma de almidón, pero también consumen altas cantidades de hemicelulosa y de pectina. Además, indican que la fermentación de la glucosa y de otros monosacáridos tiene lugar principalmente en el ciclo de Embden-Meyerhof, esta conversión de celulosa en glucosa y posteriormente en dos moles de piruvato proporciona dos ATP y dos NADH<sub>2</sub>, el ATP generado es la principal fuente de energía para el crecimiento y mantenimiento de las bacterias.

Las bacterias celulolíticas más comunes del rumen son *Bacteroides succinogenes*, *Ruminococcus albus* y *Ruminococcus flavefaciens*, que producen endoglucanasas, exoglucanasas y β-glucosidasas que actúan sinérgicamente en la degradación de celulosa en el rumen (Cai *et al.* 2010). Estas bacterias producen una proteína que estimula la acción de la celulasa, esta proteína es necesaria para fijar la celulasa a la celulosa. Las especies bacterianas que degradan celulosa también degradan hemicelulosa (Fahey & Berger 1988).

Van Lier & Regueiro (2008) reportan que, para degradar los polisacáridos hasta glucosa, los microorganismos ruminales utilizan dos complejos enzimáticos. El primer complejo es la celulasa extracelular. Los microorganismos, se adhieren a las fibras de celulosa y liberan las enzimas necesarias para degradar la celulosa a celobiosa. Las fracciones de fibra se degradan lentamente. La adhesión de las bacterias a la pared celular es el primer paso para iniciar su degradación. Esta adhesión es mediante adhesinas, o mediante uniones inespecíficas con enlaces iónicos (Chesson & Forsberg 1988). Los primeros puntos de unión se localizan en los bordes de las partículas, en lesiones superficiales o en los estomas de la estructura vegetal, debido a que la superficie externa de las plantas suele estar cubierta por lignina, taninos, cutina y sílice que dificultan el ataque microbiano (Hoover 1986). Los hongos al penetrar la cutícula y la lignina proporcionan nuevos sitios para la adhesión bacteriana (Ho *et al.* 1988).

Una vez adheridos los microorganismos ruminales se produce la degradación enzimática. Inicialmente los polisacáridos complejos son hidrolizados hasta

oligosacáridos de cadena corta (celobiosa, maltosa, xilobiosa) y monosacáridos, mediante las celulasas y hemicelulasas. Posteriormente, los monosacáridos son metabolizados hasta piruvato y finalmente hasta AGVs. La actividad de las celulasas se realiza a través de un complejo enzimático que consta de tres enzimas (endoglucanasa, celobiohidrolasa y  $\beta$ -glucosidasa) que actúan sinérgicamente y para degradar la hemicelulosa intervienen sinérgicamente más de una xilanasas (Rotger 2006).

En la celobiosa actúan las enzimas celobiasas para dar las moléculas de glucosa. La glucosa se encuentra en el líquido ruminal y es absorbida por los microorganismos para ser utilizada como sustrato energético para su metabolismo (Van Lier & Regueiro 2008). La hemicelulosa es degradada por la celulasa mediante la hidrólisis de los enlaces  $\beta$ -1,4 xilosídicos. Las pectinas son degradadas en el rumen por *B. succinogenes*, *B. ruminicola* y *B. fibrisolvens*, así como también por varias especies de protozoarios. Para la hidrólisis de la pectina son necesarias dos enzimas, la metilesterasa y la poligalacturonidasa, estas enzimas degradan la pectina hasta ácido galacturónico y otros azúcares (Fahey & Berger 1988).

Para la degradación de la celulosa son importantes los sinergismos entre distintos microorganismos, también participan bacterias no celulolíticas que son abundantes en dietas a base de forrajes. Estas bacterias degradan los productos de fermentación de la celulosa, como la celobiosa y celodextrina, y aceleran el proceso de la degradación de la celulosa, evitando la inhibición por acumulación de producto final (Russell 1985, Cheng *et al.* 1991). Este sinergismo también está presente en la degradación de la hemicelulosa que al inicio es solubilizada por microorganismos no utilizadores de hemicelulosa (Fondevila & Dehority 1994).

Los carbohidratos en el retículo-rumen son fermentados hasta AGVs de cadena corta, CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub>. Los AGVs son una fuente de energía para el rumiante. La cantidad de glucosa que se absorbe en el intestino delgado es mínima debido a la fermentación microbiana en el retículo-rumen, por lo que solo una pequeña cantidad de glucosa escapa de la fermentación (Cirio 1998).

### 2.6.2. Producción de AGVs

Ángeles (2014) reporta que los productos de la fermentación son el ácido acético, propiónico y butírico; Owens & Goetsch (1988) indican que también se producen isobutírico, valérico, isovalérico y 2-metil-butírico en menores concentraciones. Los cuales son producto de la glucosa o fructuosa.

El piruvato es el compuesto intermedio, a través del cual deben pasar todos los carbohidratos antes de ser transformados en AGVs, CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> (Fahey & Berger 1988). La fermentación de piruvato en acetato por las bacterias del rumen depende de dos mecanismos. El ciclo más común para la producción de acetato es mediante el sistema piruvato-formato liasa que da origen a la formación de formato y acetil-CoA como productos intermedios. El formato es posteriormente utilizado en conjunto con el CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub> por las *Archaeas* del rumen para la producción de metano. La segunda vía es la piruvato-ferredoxina oxidorreductasa que da origen a ferredoxina reducida, CO<sub>2</sub> y acetoil-CoA. Acetil-CoA es transformado en acetato más ATP mediante fosfotransacetilasa y acetoquinasa (Fahey & Berger 1988).

El propionato es producido a partir de piruvato principalmente mediante el ciclo del ácido dicarboxílico. Baldwin & Allison (1983) describieron tres enzimas que catalizan la conversión de piruvato en propionato: fosfoenolpiruvato (PEP) carboxiquinasa, que convierte PEP más adenosín difosfato (ADP), o guanidina difosfato (GDF) más CO<sub>2</sub> en oxalacetato (OAA) más ATP o guanidina trifosfato (GTP); piruvato carboxilasa, que convierte piruvato más CO<sub>2</sub> más ATP en OAA más ADP; y metilmalonil-CoA. La concentración de propionato producida en el rumen mediante el ciclo del ácido dicarboxílico es determinada por las especies bacterianas existentes (Fahey & Berger 1988).

En *Megasphaera elsdenii* y *Prevotella ruminicola* se ha identificado una segunda vía para la producción de propionato, el ciclo del acrilato. En este ciclo el piruvato es convertido en lactato que se transforma en acrilil-CoA y posteriormente se reduce hasta propionil-CoA. La producción del propionato total producido mediante el ciclo del acrilato puede representar un tercio de la producción total (Fahey & Berger 1988).

La vía más común para la síntesis de butirato es la inversa de la  $\beta$ -oxidación. En la otra vía, malonil-CoA se combina con acetil-CoA, que posteriormente es reducido hasta butirato mediante la vía crotonil-CoA. En general el butirato es sintetizado principalmente mediante  $\beta$ -oxidación inversa y los ácidos grasos superiores son sintetizados vía malonil-CoA (Fahey & Berger 1988).

### **2.6.3. Degradación de proteínas**

En los rumiantes el objetivo de la nutrición proteica tiene dos propósitos: por una parte, satisfacer las necesidades de nitrógeno para los microorganismos ruminales, y por otra aportar aminoácidos al animal. Las necesidades de los microorganismos se pueden cubrir con fuentes de nitrógeno proteico y no proteico, en cambio las necesidades del animal solo se pueden cubrir con aminoácidos que pueden ser de origen microbiano o de la dieta (Rotger 2006).

La degradación de las proteínas en el rumen depende de tres procesos catabólicos: la proteólisis, la péptidolisis y la desaminación. Las proteasas bacterianas son enzimas endo y exopeptidasas, unidas a las células, localizadas en la superficie de la membrana celular para tener mayores posibilidades de interacción con los sustratos. Estas exoenzimas no parecen estar sujetas al control metabólico (Rodríguez *et al.* 2007).

La hidrolisis de la proteína en el rumen es un proceso complejo de varias etapas. Primero se solubiliza la fracción soluble. Después se adhieren los microorganismos a la proteína insoluble, la cadena peptídica es atacada por exo y endoproteasas, liberando péptidos y aminoácidos. Los péptidos y aminoácidos libres son absorbidos rápidamente por los microorganismos para ser incorporados a la síntesis de proteína, o para ser descarboxilados y desaminados para dar origen a los AGVs, CO<sub>2</sub> y amoníaco (Owens & Zinn 1988).

En la proteólisis las bacterias son las principales responsables de la degradación de la fracción soluble de la proteína, su principal actividad proteolítica es del tipo cisteína proteasa (McAllister *et al.* 1993; Wallace 1991). Entre 30% y 50% de las bacterias tienen actividad proteolítica, pero pocas especies son estrictamente proteolíticas

(Hungate 1966), las especies proteolíticas más importantes son *Ruminobacter amilophylus*, *Prevotella ruminicola*, *Butyryvibrio fibrisolvens* y *Streptococcus bovis* (Yokoyama & Johnson 1988).

Las enzimas proteolíticas se localizan principalmente asociadas a la membrana celular, excepto *Butyryvibrio fibrisolvens* que secreta la proteasa extracelularmente (Wallace & Cotta 1988). La actividad proteolítica de los protozoarios es diez veces menor que la bacteriana, y su principal actividad también es de tipo cisteína proteasa y tienen mayor actividad aminopeptidasa y de tripsinas que las bacterias (Forsberg *et al.* 1984); se considera que su actividad proteasa es intracelular (Wallace & McPherson 1987). Por otro lado, los hongos tienen alta actividad proteolítica extracelular del tipo metaloproteasa (Wallace 1991).

En el caso de la peptidólisis las cadenas de polipéptidos resultantes de la hidrólisis de las proteínas son degradadas por la acción de las peptidasas microbianas hasta péptidos más pequeños y finalmente hasta aminoácidos (Cotta & Hespell 1986). Los péptidos más pequeños y los aminoácidos entran al interior celular para ser degradados hasta amoníaco o para ser incorporados directamente a la síntesis de proteínas (Wallace & Cotta 1988). Wallace (1991) reporta que los protozoarios tienen gran actividad dipeptidasa, y en animales defaunados proliferan bacterias con actividad dipeptidasa para cubrir esta función.

En los protozoarios ciliados los aminoácidos resultantes de la proteólisis intracelular podrán ser excretados, incorporados a su síntesis proteica o bien desaminados en un proceso similar al bacteriano (Wallace & Cotta 1988), la mayoría de especies de protozoarios tienen actividad desaminasa 3 veces mayor que la bacteriana (Cotta & Hespell 1986).

#### **2.6.4. Producción de amoníaco**

De Luca (2002) reporta que el amoníaco es generado por la proteólisis y desaminación de aminoácidos, y por la acción de la ureasa bacteriana sobre la urea. Por otro lado, el amoníaco puede entrar en la célula microbiana por difusión pasiva, en la forma no iónica ( $\text{NH}_3$ ), o por transporte activo en la forma ionizada ( $\text{NH}_4^+$ )

(Kleiner & Fitzke 1979). La difusión pasiva es el mecanismo mas utilizado y está muy influenciada por la concentración de amoniaco y el pH ruminal (Russell & Strobel 1987). La glutamato deshidrogenasa es la enzima más importante que interviene en la captación y fijación de amoniaco que entra en forma pasiva (Chalupa *et al.* 1970); pero existe una vía alternativa constituida por las enzimas glutamato y glutamina sintetasa, que captan el amoniaco mediante un mecanismo de transporte activo con gasto de ATP (Erflé *et al.* 1977).

### **2.6.5. Degradación de lípidos**

Los microorganismos modifican los lípidos de varias formas, los ácidos grasos aparecen de forma esterificada, y los microorganismos las hidrolizan hasta ácidos grasos libres y glicerol. Posterior a la lipólisis se produce la biohidrogenación de los ácidos grasos (Byers & Schelling 1988).

La degradación de lípidos en el complejo retículo-rumen incluye la hidrólisis de glicerol y ácidos grasos y el proceso de biohidrogenación o biosaturación, en que los ácidos grasos no saturados se transforman en saturados, lo que explica la dureza de la grasa corporal del rumiante (Rodríguez *et al.* 2008).

La principal actividad lipolítica es debida a lipasas, galactolipasas y fosfolipasas de origen bacteriano y de protozoarios. Las lipasas vegetales son secundarias en relación a las lipasas microbianas, y la lipasa de la saliva de los rumiantes tiene baja actividad (Martínez *et al.* 2010).

Los triglicéridos y los galactolípidos son hidrolizados por las bacterias ruminales. Específicamente, se detectaron lipasas producidas por *Anaerovibrio lipolytica* y fosfolipasas por algunas cepas no celulolíticas de *Butyrivibrio fibrisolvens*. Esta lipólisis produce glicerol y galactosa por un lado, y ácidos grasos, por el otro. El glicerol y la galactosa son fermentados por bacterias y protozoarios que aprovechan carbohidratos solubles hasta AGV. Los ácidos grasos de los lípidos no pueden ser oxidados en el rumen, pero sufren procesos de biohidrogenación que tiene lugar en el rumen y los responsables de ésta son las bacterias (Pechin 1999).

## 2.7. Producción de metano en el rumen

La síntesis de metano ruminal se produce posterior a la fermentación anaerobia de los alimentos, los productos finales como el hidrógeno y dióxido de carbono, son reducidos por las *Archaeas* metanogénicas para formar CH<sub>4</sub>, el cual se elimina mediante el eructo a la atmósfera (Martin *et al.* 2009).

La reducción de CO<sub>2</sub> a CH<sub>4</sub> en rumen es realizada exclusivamente por *Archaeas* metanogénicas y tiene una función importante, dado que es una ruta metabólica aceptora de electrones, que constantemente remueve el H<sup>+</sup> producido durante la fermentación ruminal de carbohidratos y proteínas de la dieta, y, por lo tanto, mantiene el ecosistema ruminal en un pH óptimo para que se realicen adecuadamente todas las actividades microbianas (Weimer 1998). La metanogénesis ruminal, no es un proceso fermentativo debido a que las *Archaeas* metanogénicas no realizan fosforilación a nivel sustrato (Báez 2010).

En la metanogénesis, inicialmente el CO<sub>2</sub> es activado por la enzima que contiene el metanofurano (MF) y reducido al nivel de formilo. El grupo formilo se transfiere del metanofurano a una enzima que contiene metanopterina (MP) y posteriormente es deshidratado y reducido en dos pasos distintos a metileno y metilo. Después, el grupo metilo se transfiere de la metanopterina a una enzima que contiene la coenzima M (CoM). Finalmente, el metil-CoM es reducido a metano por el sistema de la metil reductasa, en la cual dos coenzimas la F<sub>430</sub> y la CoM están implicadas. La coenzima F<sub>430</sub> elimina el grupo CH<sub>3</sub> del CH<sub>3</sub>-CoM, formando un complejo Ni<sup>2+</sup> - CH<sub>3</sub>. Este es reducido por los electrones de la coenzima B (CoB) y un complejo disulfuro de CoM y CoB (CoM-S – S-CoB); en el proceso se produce, a través de la fuerza motriz de protones, una mol de ATP por mol de metano producido (Madigan *et al.* 2002).

Las *Archaeas* metanogénicas son microorganismos que pertenecen al dominio *Archaea* (Whitford *et al.* 2001), y se clasifican en los órdenes *Methanococcales*, *Methanomicrobiales*, *Methanopyrales* y *Methanosarcinales* (Thauer 1988) siendo los géneros identificados en el rumen *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter*, *Methanomicrobium* y *Methanosarcina* (McAllister *et al.* 1996; Wolin *et al.* 1997). Las

principales especies son; *Methanobacterium formicum*, *Methanobacterium bryantii*, *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobrevibacter smithii*, *Methanomicrobium mobile*, *Methanosarcina barkeri* y *Methanoculleus olentangyi* (Sosa *et al.* 2007).

La población de *Archaeas* metanogénicas en el rumen se encuentra en una concentración de  $10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  de fluido ruminal (McAllister *et al.* 1996), son organismos anaerobios estrictos y requieren un potencial de óxido reducción menor a -330 mv. La característica particular de estos microorganismos, es la producción de metano para la obtención de energía (Whitford *et al.* 2001).

El metano representa una pérdida de 8% a 15% de la energía bruta consumida por el rumiante (Vélez *et al.* 2015). La mayor producción de este gas esta asociado al consumo de dietas altas en fibra y de baja calidad (Ribeiro *et al.* 2015). Johnson & Johnson (1995) indican que los protozoarios ruminales participan indirectamente en la producción de metano, se han observado *Archaeas* metanogénicas, adheridas a protozoarios, existiendo una transferencia interespecífica de  $\text{H}_2$ .

### **2.7.1. Estrategias de alimentación para disminuir la metanogénesis**

Recientemente se han buscado alternativa para disminuir las emisiones de  $\text{CH}_4$  al mejorar la alimentación, se ha demostrado que la calidad, el tipo y la digestibilidad de los alimentos influyen en la cantidad de  $\text{CH}_4$  que se produce en rumen (Beauchemin & McGinn 2005).

#### **2.7.1.1. Adición de lípidos a la dieta**

La grasa en la dieta de los rumiantes afecta la producción de metano por mecanismos como la biohidrogenación de los ácidos grasos insaturados, el aumento en la producción de ácido propiónico y la inhibición de protozoos. Se ha demostrado que la adición de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga disminuye la metanogénesis porque se convierte en una alternativa metabólica para el hidrógeno (Johnson & Johnson 1995).

Dohme *et al.* (2000) reportan que los aceites con altas cantidades de ácidos grasos de cadena media pueden ser efectivos en la reducción de metano y de las poblaciones de protozoarios. Una proporción de *Archaeas* metanogénicas tienen simbiosis con los protozoarios. La reducción del número de protozoarios puede contribuir a una disminución de la población de *Archaeas* metanogénicas, además la toxicidad de algunos ácidos grasos de cadena larga y media sobre las *Archaeas* también tienen efecto en la disminución de su población.

El impacto de los lípidos en la reducción de CH<sub>4</sub> se asocia con el aporte de ácidos grasos insaturados mediante la inclusión de aceites de linaza, semillas de canola y aceite de pescado en la dieta, debido a que estos funcionan como disipadores de hidrógeno, inhibiendo directamente el crecimiento de la población de las *Archaeas* metanogénicas del rumen (Dong *et al.* 1997).

#### **2.7.1.2. Adición de ionóforos**

Los ionóforos, como la monensina, pueden reducir el consumo de alimento entre 5% y 6%, la relación acetato-propionato y las emisiones de metano. La disminución en la producción de metano, en animales suplementados con ionóforos, es probable que se relacione con la reducción en el consumo de alimento; debido al incremento en la eficiencia fermentativa y no por un efecto directo en las poblaciones de metanógenos (Moss *et al.* 2000; Johnson & Johnson 1995). En este sentido Van Soest (1994), señala que los ionóforos no son inhibidores directos de las *Archaeas* metanogénicas, solo restringen la producción de hidrógeno y de forma indirecta ayudan a disminuir las emisiones de metano.

*Ruminococcus sp.* y *Butyrivibrio fibrisolvens*, son unas de las principales especies bacterianas productoras de acetato e H<sup>+</sup> en el rumen y son inhibidas por la monensina. De esta forma, la tasa de acetato: propionato y la producción de metano se reducen, como resultado de la menor disponibilidad de H<sup>+</sup> para las *Archaeas* metanogénicas. Lo anterior sugiere que la monensina no inhibe directamente las *Archaeas* metanogénicas (Henderson *et al.* 1981), sino que afecta a las bacterias

productoras de  $H^+$ , originando así la reducción de los precursores de la metanogénesis (Pinos & González 2000).

Por otro lado, el efecto de los ionóforos en la proporción de AGVs, se debe en parte a un proceso de selección biológica de bacterias resistentes que metabolizan más propionato y succinato, y menos acetato, butirato, formato y metano (Schelling 1984; Cobos 1996).

#### **2.7.1.3. Nivel de consumo relacionado con características de la dieta**

Dietas con mayor digestibilidad, presentan menores emisiones de metano (Johnson & Johnson 1995). La producción de metano se reduce aproximadamente 30% cuando la tasa de pasaje de las fases líquida y sólida se incrementa de 54% a 68% (Moss *et al.* 2000).

Los rumiantes que consumen dietas altas en concentrados, producen menores emisiones de  $CH_4$  (Clemens & Ahlgrimm 2001). Cuando el ganado es alimentado con dietas altas en granos, se ha reportado menor concentración de *Archaeas* metanogénicas. En ovinos se han encontrado concentraciones de  $10^7$  a  $10^8$  células  $g^{-1}$ , y en bovinos concentraciones de  $10^8$  a  $10^9$  células  $g^{-1}$  (Morvan *et al.* 1996), con una producción de  $CH_4$  anual de 35 Kg a 55 Kg (Kinsman *et al.* 1995). Sin embargo, en dietas basadas en gramíneas en sistemas extensivos, se observan concentraciones de  $10^9$  a  $10^{10}$  células  $g^{-1}$  para ambas especies (Joblin 2004), y se estima que la producción anual de  $CH_4$  es de 60 Kg a 120 kg, con pérdidas de energía de alrededor de 8% a 15% (Kinsman *et al.* 1995).

#### **2.7.1.4. Procesamiento de los forrajes**

Johnson & Johnson (1995) reportan que el picado y peletizado de los forrajes son factores importantes para disminuir las emisiones de metano en rumen. Dichos procesos promueven una mayor tasa de pasaje, limitando la fermentación de la fibra a nivel ruminal y por tanto, la disponibilidad de  $CO_2$  e  $H_2$  libres para las *Archaeas*

metanogénicas para producir CH<sub>4</sub> (Johnson & Johnson 1995; Bonilla & Lemus 2012; Aguiar & Rojas 2014).

#### **2.7.1.5. Metabolitos secundarios de las arbóreas**

Los metabolitos secundarios de manera general inhiben la actividad de las *Archaeas* metanogénicas, mejoran las reacciones metabólicas como la fermentación hacia una mayor formación de propionato reduciendo la producción de CH<sub>4</sub>, al disminuir los H<sub>2</sub> disponibles para la producción de metano como otras fuentes alternativas para la eliminación de H<sub>2</sub> o reduciendo la fermentación ruminal (Bodas *et al.* 2012).

Los principales metabolitos secundarios con propiedades antimetanogénicas se clasifican generalmente en cinco grupos: saponinas, taninos, aceites esenciales, compuestos órganosulfurados y flavonoides (Patra & Saxena 2010).

##### **2.7.1.5.1. Saponinas**

Vélez *et al.* (2014) reportan que las saponinas pueden disminuir las emisiones de metano de forma indirecta, al reducir la población de protozoarios los cuales están asociados a las *Archaeas* metanogénicas, lo cual disminuye la disponibilidad de hidrógeno, cuya relación puede generar de 9% a 37% de las emisiones totales de metano.

Las saponinas disminuyen la población de los protozoarios formando complejos con esteroides en la superficie de sus membranas causando la lisis (Bonilla & Lemus 2012); las saponinas, a través de su grupo hidroxilo (OH), forman complejos irreversibles con el colesterol que se encuentra en las membranas de la célula, ocasionando su ruptura y la muerte de los protozoarios (Francis *et al.* 2002).

Además, las saponinas tienen efectos variables en la producción de AGVs, al propiciar un aumento en la proporción de propionato y una reducción en acetato y butirato, resultando en una menor producción de hidrógenos necesarios para la producción de metano (Patra & Saxena 2010; Patra & Saxena 2009).

### 2.7.1.5.2. Taninos

El efecto inhibitorio de los taninos sobre la metanogénesis ruminal ha sido atribuido directamente a su efecto sobre las *Archaeas* metanogénicas y los protozoos (Patra & Saxena 2011). Se ha determinado que los taninos pueden inhibir el crecimiento o la actividad tanto de bacterias, (McSweeney *et al.* 2001) *Archaeas* y protozoarios del rumen, por medio de mecanismos bactericidas o bacteriostáticos (Bodas *et al.* 2012). Éste efecto está correlacionado con el peso molecular el cual fluctúa entre 1,900 y 28,000 daltons (Posada *et al.* 2005).

La actividad antibacteriana de éstos compuestos está ligada a la formación de complejos con la pared celular, lo cual provoca cambios morfológicos (Smith *et al.* 2005) e induce deficiencias nutricionales en el rumiante (Posada *et al.* 2005). Smith (1975) señala que los taninos reaccionan con iones  $\text{Ca}^+$  de la pared celular, lo cual causa un cambio en la permeabilidad y permite la penetración de éstos compuestos, con lo que se inactivan permeasas del periplasma involucradas en el transporte de aminoácidos y carbohidratos.

Smith (1975), indica que los grupos fenólicos de los taninos se pueden enlazar con proteínas y fosfolípidos de la membrana externa de la pared celular. Adicionalmente, los taninos pueden unirse a enzimas y alterar el metabolismo microbiano (Posada *et al.* 2005).

También se pueden afectar las bacterias celulolíticas y, en consecuencia, la fermentación de los carbohidratos a AGVs; en especial la producción de acetato, de esta manera se reduce la formación de  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2$  necesarios para la metanogénesis (Bodas *et al.* 2012). Además, la actividad antimetanogénica se atribuye principalmente a los taninos condensados (Ku *et al.* 2014), los cuales disminuyen la producción de metano a través de una reducción en la digestión de la fibra, disminución de la formación de hidrógeno e inhibición de la población de las *Archaeas* metanogénicas (Bonilla & Lemus 2012).

### 3. HIPÓTESIS

En las dietas a base de *Cynodon nlemfuensis* donde se incluye 30% de *M. oleífera*, *L. leucocephala* o *G. ulmifolia*, aumenta el porcentaje de proteína cruda, disminuye el contenido de fibra insoluble en detergente ácido y fibra insoluble en detergente neutro. Durante la fermentación ruminal *in vitro* no se afecta el pH, la producción de ácidos grasos volátiles ni las poblaciones microbianas. Además mejora la degradabilidad y reduce la producción de metano (CH<sub>4</sub>) y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) después de la fermentación ruminal *in vitro*.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la incorporación de 15%, 30% y 45% de *Moringa oleífera*, *Leucaena leucocephala* o *Guazuma ulmifolia* en una dieta a base de pasto Estrella africana (*Cynodon nlemfuensis*) durante la fermentación ruminal *in vitro*.

### 4.2. Objetivos particulares

- 1) Determinar la composición química (materia seca, proteína cruda y cenizas) y el contenido de paredes celulares (fibra insoluble en detergente neutro, fibra insoluble en detergente ácido y hemicelulosa) de las dietas.
- 2) Determinar la producción de biogás total y las poblaciones de microorganismos ruminales (bacterias totales, protozoarios y bacterias celulolíticas) durante la fermentación ruminal *in vitro* en cada una de las dietas.
- 3) Determinar la degradabilidad de la materia seca (DIVMS), el pH, la concentración de ácidos grasos volátiles (AGVs) y las emisiones de metano (CH<sub>4</sub>) y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) después de la fermentación ruminal *in vitro* en cada una de las dietas.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Localización geográfica

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Bioquímica y Nutrición de la Universidad del Mar Campus Puerto Escondido, ubicado en el Campo Experimental de la comunidad de Bajos de Chila, localizado en el kilómetro 128.1 de la carretera Federal Pinotepa Nacional-Puerto Escondido, cuyas coordenadas son 15° 55' 33.4" latitud N y 97° 09' 01.9" longitud O, y altitud de 12 m (GPS GARMIN®, modelo eTrex 20x). El clima de la región se ubica entre los climas A(c) w2 y Aw0, con dos estaciones bien diferenciadas (secas y lluvias), con precipitación media anual entre 839.1 mm y 1587.1 mm y temperatura media anual entre los 24 C y 27.2 C (Serrano *et al.* 2005).

### 5.2. Cultivos utilizados

El material vegetal de pasto *Cynodon nlemfuensis* se cosechó a 27 d de rebrote (Sánchez & Soto 1999), en el mes de julio del año 2018, en una parcela experimental establecida en el Rancho la Flor en la comunidad de San José Manialtepec, Tututepec, Juquila, Oax., localizado a 15° 56' 59.1" latitud N y 97° 14' 18.3" longitud O y una altitud de 17 m (GPS GARMIN®, modelo eTrex 20x).

El material vegetal de las arbóreas (*M. oleifera*, *L. leucocephala* y *G. ulmifolia*) se cosechó durante los meses de junio y julio del año 2018, en la comunidad de Rio Grande, Tututepec, Juquila, Oax., localizado a 16° 00' 31.3" latitud N y 97° 27' 06.8" longitud O a una altitud de 24 m (GPS GARMIN®, modelo eTrex 20x).

### 5.3. Tratamientos experimentales

Para la elaboración de las dietas experimentales (Cuadro 7), el material vegetal se secó a 65 C en estufa (FELISA) por 72 h, y se molió con una malla de 1 mm en

molino Willey (Arthur H. Thomas, Philadelphia, PA) para obtener la harina y hacer las mezclas con los diferentes porcentajes.

**Cuadro 7.** Dietas experimentales.

<b>Dietas</b>	<b>Composición de las dietas experimentales</b>
<i>Cn-100</i>	100% <i>Cynodon nlemfuensis</i> (Testigo)
<i>Mo-15</i>	85% <i>Cynodon nlemfuensis</i> + 15% <i>Moringa oleífera</i>
<i>Mo-30</i>	70% <i>Cynodon nlemfuensis</i> + 30% <i>Moringa oleífera</i>
<i>Mo-45</i>	55% <i>Cynodon nlemfuensis</i> + 45% <i>Moringa oleífera</i>
<i>Ll-15</i>	85% <i>Cynodon nlemfuensis</i> + 15% <i>Leucaena leucocephala</i>
<i>Ll-30</i>	70% <i>Cynodon nlemfuensis</i> + 30% <i>Leucaena leucocephala</i>
<i>Ll-45</i>	55% <i>Cynodon nlemfuensis</i> + 45% <i>Leucaena leucocephala</i>
<i>Gu-15</i>	85% <i>Cynodon nlemfuensis</i> + 15% <i>Guazuma ulmifolia</i>
<i>Gu-30</i>	70% <i>Cynodon nlemfuensis</i> + 30% <i>Guazuma ulmifolia</i>
<i>Gu-45</i>	55% <i>Cynodon nlemfuensis</i> + 45% <i>Guazuma ulmifolia</i>

#### **5.4. Análisis químico**

La composición química de las dietas fue determinada por los métodos de la AOAC (2005): cenizas (método 942.05) y proteína cruda (método 984.13). El contenido de fibra insoluble en detergente neutro (FIDN), ácido (FIDA) y hemicelulosa se determinó por el método propuesto por Van Soest *et al.* (1991) en el Laboratorio de Nutrición Animal, de la Universidad de Guadalajara, ubicada en Ciudad Guzmán Jalisco México. Para determinar el porcentaje de MS, muestras de material vegetal fresco se pesó en balanza analítica, posteriormente se secó a 65 C en estufa (FELISA) por 72 h y se volvió a pesar para determinar el contenido de MS por diferencia de peso (método 930.13) (AOAC 2005).

## 5.5. Caracterización de la fermentación ruminal

Para determinar la degradabilidad de la materia seca *in vitro*, la concentración de AGV, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, pH y microorganismos ruminales se usaron 33 viales serológicos de vidrio de 100 mL como biofermentadores, los cuales se dividieron en 10 grupos de 3 biofermentadores, y 3 blancos, de forma aleatoria a cada grupo de 3 viales se le asignó una dieta a evaluar (Cuadro 7) y se rotuló para su posterior identificación.

**Cuadro 8.** Componentes del medio de cultivo para bacterias totales (GCA-FR).

Ingredientes	Cantidad en 100 mL
Agua destilada	56.2 mL
Fluido ruminal clarificado <sup>1</sup>	30.0 mL
Solución mineral I <sup>2</sup>	5.0 mL
Solución mineral II <sup>3</sup>	5.0 mL
Rezarsurina al 0.1%	0.1 mL
Tripticasa peptona	0.2 g
Extracto de levadura	0.1 g
Glucosa	0.06 g
Celobiosa	0.06 g
Almidón	0.06 g
Carbonato de sodio 8%	5.0 mL
Solución de sulfato cisteína <sup>4</sup>	2.0 mL

<sup>1</sup>Fluido ruminal clarificado: líquido ruminal filtrado en gasa a cuatro capas, centrifugado 15 min, a 10000 rpm y esterilizado por 15 min a 121 C y 15 lb/pulg<sup>2</sup> (el proceso se realizó tres veces).

<sup>2</sup>Solución mineral 1: 6 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> por cada 1000 mL de agua destilada.

<sup>3</sup>Solución mineral 2: 6 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 6 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 12 g NaCl; 2,45 g MgSO<sub>4</sub> y 1,6 g de CaCl<sub>2</sub> H<sub>2</sub>O; por cada 1000 mL de agua destilada.

<sup>4</sup>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% (4N), añadir 2.5 g de Na<sub>2</sub>S-10 H<sub>2</sub>O y aforar a 200 mL. Pasar la mezcla a un matraz de bola, calentar con flujo de CO<sub>2</sub> y esterilizar por 15 min a 121 C y 15 lb/pulg<sup>2</sup>. (Cobos & Yokoyama 1995).

Muestras de 0.5 g de MS de cada una de las dietas (Cuadro 7) se pesaron y agregaron a cada uno de los viales, posteriormente, en condiciones de anaerobiosis se adicionaron 45 mL de medio de cultivo a base de glucosa, celobiosa, almidón y fluido ruminal clarificado (GCA-FR) (Cuadro 8), a continuación los viales fueron sellados con tapones de goma y arillos de aluminio. Se esterilizaron en autoclave (LAB-MED) a 121 C y 15 lb/pulg<sub>2</sub> durante 15 min y después fueron sometidos a prueba de esterilidad en incubadora (RIOSSA, modelo E-71D), a temperatura de 39 C por 48 h (Cobos & Yokoyama 1995).

### **5.6. Caracterización de las trampas de biogás**

Para las trampas de biogás se utilizaron 33 viales de 100 mL llenos totalmente de solución salina saturada (370 g NaCl L<sup>-1</sup> y 5 mL de anaranjado de metilo al 0.1% como indicador de pH) con pH <2 ajustado con HCl a 1N; posteriormente todos los viales fueron sellados con tapones de goma y arillos de aluminio (Cobos *et al.* 2018).

### **5.7. Inóculo**

La fuente de inóculo, fue fluido ruminal fresco obtenido de una vaca cruce de Cebú x Pardo suizo, canulada en el rumen, estabulada, alimentada con 70% forraje, 30% de concentrado comercial y agua a libre acceso. El fluido ruminal fue extraído por la mañana, filtrado en gasas a cuatro capas con la finalidad de eliminar partículas de alimento y posteriormente transportado en un termo cerrado herméticamente al laboratorio, donde el fluido se colocó en un matraz de bola con flujo de CO<sub>2</sub> a 39 C. El tiempo transcurrido entre la extracción del fluido ruminal y su inoculación en los biofermentadores fue de 30 min.

### **5.8. Montaje de biofermentadores y trampas de gas**

A cada biofermentador se le inocularon 5 mL de fluido ruminal fresco, por medio de punción, con jeringa hipodérmica estéril desechable de 10 mL, en campana de flujo laminar (Tecni-lab, modelo LMGE7CM), bajo flama de mechero. Posteriormente los

biofermentadores se colocaron en baño maría (RIOSSA, modelo BMME) a temperatura de 39 C. A cada biofermentador se le acopló una trampa de gas por medio de mangueras de Taygon® de 55 cm de largo, diámetro externo de 3.63 mm e interno de 2.38 mm, a las cuales se le colocaron en sus extremos agujas hipodérmicas marca Nipro 20G X 31.8 mm. Las mangueras Taygon® fueron aseguradas con pinzas para evitar pérdidas de gas antes del montaje del sistema de producción de gas *in vitro* (Cobos *et al.* 2018).

Las trampas contaban con válvula de alivio (aguja hipodérmica 20G X 31.8 mm) para igualar la presión atmosférica. Finalmente, las trampas de gas se colocaron en forma invertida sobre una probeta de plástico de 50 mL, para medir el desplazamiento de la solución saturada interna en las trampas de gas. El sistema de producción de gas *in vitro* se cubrió con lienzo oscuro para evitar la entrada de luz (Cobos *et al.* 2018).

## **5.9. Variables a evaluar**

### **5.9.1. Producción acumulada de biogás total (CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub>)**

Se registró el volumen de biogás total mediante la solución salina desplazada a diferentes tiempos (6 h, 12 h, 24 h, 48 h y 72 h) de incubación (Rodríguez 2009). Posteriormente, las trampas de solución salina saturada fueron almacenadas en refrigeración a 4 C hasta su posterior análisis.

### **5.9.2. Población de bacterias totales**

La determinación de la población de bacterias totales se realizó a 6 h, 12 h, 24 h, 48 h y 72 h de incubación (Stewart *et al.* 1997), por método directo en cámara Neubauer-Improved y microscopio óptico (MOTIC, modelo DMB3), a magnificación total de 400X, determinando el número de bacterias en 5 cuadros de la cuadrícula central de la cámara, con área de 0.04 mm<sup>2</sup> y profundidad de 0.1 mm, estimando el número de bacterias por mL<sup>-1</sup> con la siguiente fórmula:

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

Dónde:

X: Promedio de células contadas en los 5 cuadrados.

FD: Factor de dilución.

25: Número de cuadrados en la cuadrícula central.

50000: Constante de la cámara.

### **5.9.3. Población de protozoarios**

La determinación de la población de protozoarios se realizó a 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h de incubación (Stewart *et al.* 1997), por método directo en cámara Neubauer-Improved y microscopio óptico (MOTIC, modelo DMB3), a magnificación total de 400X, determinando el número de protozoarios en 5 cuadrados con área de 1 mm<sup>2</sup> y profundidad de 0.1 mm. El número de protozoarios por mL<sup>-1</sup> se estimó con la siguiente fórmula:

$$\text{Protozoarios por mL}^{-1} = \text{NP} \times \text{FD} \times 50000$$

Dónde:

NP: Número de protozoarios contados.

FD: Factor de dilución.

50000: Constante de la cámara.

### **5.9.4. Población de bacterias celulolíticas**

La población de bacterias celulolíticas se estimó por el método del número más probable (NMP) descrito por Harrigan & McCance (1979) después de 72 h de

incubación. Para lo cual se utilizó medio de cultivo para bacterias celulolíticas (Cuadro 9). La prueba se realizó por triplicado con diluciones de 0.5 mL en tubos de 13 X 100 mm que contendrán 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. Y se consideró como crecimiento positivo de estas bacterias a aquellos tubos de cultivo que presentaron degradación de la tira de papel y algún grado de turbidez después de 10 d de incubación en una incubadora (RIOSSA, modelo E-71D) a 39 C.

**Cuadro 9.** Componentes del medio de cultivo para bacterias celulolíticas.

<b>Ingredientes</b>	<b>Cantidad en 100 mL</b>
Agua destilada	56.2 mL
Fluido ruminal clarificado <sup>1</sup>	30.0 mL
Solución mineral I <sup>2</sup>	5.0 mL
Solución mineral II <sup>3</sup>	5.0 mL
Resarzurina al 0.1%	0.1 mL
Tripticasa peptona	0.2 g
Extracto de levadura	0.1 g
Carbonato de sodio 8%	5.0 mL
Solución de sulfato cisteína <sup>4</sup>	2.0 mL
Papel Whatman 541	1 tira

<sup>1</sup>Fluido ruminal clarificado: líquido ruminal filtrado en gasa a cuatro capas, centrifugado 15 min, a 10000 rpm y esterilizado por 15 min a 121 C y 15 lb/pulg<sup>2</sup> (el proceso se realizó tres veces).

<sup>2</sup>Solución mineral 1: 6 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> por cada 1000 mL de agua destilada.

<sup>3</sup>Solución mineral 2: 6 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 6 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 12 g NaCl; 2,45 g MgSO<sub>4</sub> y 1,6 g de CaCl<sub>2</sub> H<sub>2</sub>O; por cada 1000 mL de agua destilada.

<sup>4</sup>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% (4N), añadir 2.5 g de Na<sub>2</sub>S-10 H<sub>2</sub>O y aforar a 200 mL. Pasar la mezcla a un matraz de bola, calentar con flujo de CO<sub>2</sub> y esterilizar por 15 min a 121 C y 15 lb/pulg<sup>2</sup>. (Cobos & Yokoyama 1995).

### 5.9.5. Degradabilidad *in vitro* de la materia seca

Después de 72 h de incubación (McAllister *et al.* 1994), se filtró el contenido de los biofermentadores; con bomba de vacío (GAST, modelo DOA-P704AA) y matraz Kitasato, en papel filtro Whatman 541 con diámetro de 125 mm; posteriormente el residuo se secó en estufa (FELISA) a 65 C por 72 h; para obtener el peso constante. Los papeles filtro que contenían la muestra se pesaron en seco antes y después con las muestras en balanza analítica (DENVER instrument). La degradabilidad de la materia seca se determinó por medio de la fórmula descrita por Mellenberger *et al.* (1970).

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

Dónde:

DVI%: Digestibilidad *in vitro* en porcentaje.

MSi: Materia seca inicial (Muestra).

PS: Peso constante del papel.

DB: Digestibilidad de los blancos.

PMS: Peso del papel más el residuo de la muestra.

### 5.9.6. pH de los medios de cultivo

El pH del líquido de cada biofermentador se determinó después de 72 h de incubación (Lana *et al.* 1998) con potenciómetro (HANNA, modelo HI2210), calibrado a 4.0 y 7.0.

### **5.9.7. Concentraciones de ácidos grasos volátiles**

La concentración de AGVs se determinó a 72 h de incubación. Para esto se tomó 1 mL del contenido de cada uno de los biofermentadores en tubos Eppendorf de 2.0 mL que contenían 0.25 mL de ácido metafosfórico al 25%. Posteriormente se centrifugaron a 11000 rpm por 10 min a 4 C en centrifuga (Eppendorf 5810R). En seguida, se tomó el sobrenadante y se colocó en viales para cromatografía. La concentración de AGVs se determinó en cromatógrafo de gases (Perkin Elmer, modelo Clarus 500) con automuestreador y una columna capilar Elite FFAP, de acuerdo a la técnica descrita por Erwin *et al.* (1961). Las condiciones que se usaron fueron: 1) velocidad del gas acarreador de nitrógeno; 2) volumen de inyección de la muestra; 3) temperatura del inyector, detector y horno; 4) tiempo de retención del acetato, propionato y butirato; y 5) el tiempo total de corrida.

### **5.9.8. Emisiones de CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub>**

El biogás total capturado en las trampas de solución salina saturada fue sometido a conductividad térmica por cromatografía de gases para determinar los porcentajes de CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub>, en cromatógrafo de gases (Perkin Elmer, modelo Clarus 500), con detector de conductividad térmica (DCT) y columna PE 6'x1/8 ODSS: Propak 080/100. Se inyectó 0.1 mL de muestra de forma manual de acuerdo a las técnicas descritas por Cobos *et al.* (2018). Las características y condiciones del modelo fueron: 1) temperatura de la rampa en el horno al inicio y al final; 2) temperatura del inyector; 3) volumen de inyección; 4) flujo de gas acarreador; y 5) tiempo de retención de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>.

### **5.9.9. Análisis estadístico**

Para el análisis de los datos se usó un diseño completamente al azar con diez tratamientos y tres repeticiones. Los resultados de las variables evaluadas se analizaron con el procedimiento PROC GLM del paquete estadístico SAS (2010), y para la comparación de medias se usó la prueba de Tukey (Steel & Torrie 1988).

Para cumplir con la normalidad y homogeneidad de varianza, los datos de la variable, población de bacterias totales se transformaron a Log 10, y los datos de población de bacterias celulolíticas y población de protozoarios se transformaron a Log 6, previo al análisis estadístico.

El modelo estadístico fue el siguiente:

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

Dónde:

$Y_{ij}$ : Variable respuesta.

$\mu$ : Media general.

$T_j$ : Efecto de j-esimo tratamiento.

$E_{ij}$ : Error experimental.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Composición química

Los resultados del examen químico proximal de las dietas se muestran en el Cuadro 10. Los valores de PC mostraron diferencias ( $P < 0.05$ ) entre dietas; los tratamientos que contenían 30% y 45% de *L. leucocephala*, y 45% de *G. ulmifolia* tuvieron la mayor concentración de PC comparado con la dieta testigo que presentó la menor concentración de PC. La fracción de FIDA presentó diferencias ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos; las dietas con 15%, 30% y 45% de *M. oleífera*, 30% y 45% de *L. leucocephala* y 30% y 45% de *G. ulmifolia* mostraron menor porcentaje de FIDA comparado con la dieta de 100% de pasto *C. nlemfuensis* que presentó el mayor porcentaje de FIDA. Los valores de FIDN mostraron diferencias ( $P < 0.05$ ) entre las distintas dietas, todas presentaron menor porcentaje de FIDN comparado con la dieta de 100% de pasto *C. nlemfuensis* que tuvo el mayor porcentaje de FIDN. El porcentaje de hemicelulosa también mostró diferencias ( $P < 0.05$ ) entre las diferentes dietas experimentales; las dietas con 30% y 45% de *M. oleífera*, 45% de *L. leucocephala*, 30% y 45% de *G. ulmifolia* tuvieron un porcentaje menor comparado con la dieta de 100% de pasto *C. nlemfuensis* que presentó la mayor concentración para esta variable. Con respecto a los porcentajes de MS y cenizas no se encontraron diferencias ( $P > 0.05$ ) entre las dietas.

Los resultados obtenidos en la composición química de la dieta con 100% de pasto *C. nlemfuensis* fueron mayores a los encontrados por Ley *et al.* (2018) para el mismo tipo de pasto cosechado a 75 d, con 9.56% PC, 42.56% FIDA, 67.24% FIDN, 24.68% de hemicelulosa y 6.72% de cenizas. En contraste, fueron inferiores en PC y cenizas a lo reportado por Villalobos & Arce (2014), cuyos valores fueron de 20.27% y 10.97% respectivamente; pero similares a lo reportado por Maya *et al.* (2005) a 28 d de corte. Para las dietas con inclusión de arbóreas los resultados fueron similares a lo reportado por Rodríguez *et al.* (1998), quienes indican que, al aumentar la inclusión de leguminosas en la dieta, aumenta el contenido de PC y disminuye el porcentaje de FIDA y FIDN en relación directa a su nivel de inclusión; debido a la

composición química individual de las arbóreas tropicales que tienen mayor contenido en proteína y menor proporción de paredes celulares que las gramíneas (Carmona 2007).

**Cuadro 10.** Composición química de las dietas (% Base Seca).

<b>Dietas</b>	<b>MS</b>	<b>PC</b>	<b>FIDA</b>	<b>FIDN</b>	<b>Hem</b>	<b>C</b>
<i>Cn-100</i>	26.87 <sup>a</sup>	11.51 <sup>d</sup>	38.53 <sup>a</sup>	74.95 <sup>a</sup>	36.42 <sup>a</sup>	9.96 <sup>a</sup>
<i>Mo-15</i>	27.22 <sup>a</sup>	12.01 <sup>cd</sup>	35.03 <sup>bcd</sup>	69.78 <sup>bc</sup>	34.74 <sup>ab</sup>	10.03 <sup>a</sup>
<i>Mo-30</i>	27.58 <sup>a</sup>	12.52 <sup>cd</sup>	31.54 <sup>e</sup>	64.62 <sup>d</sup>	33.07 <sup>bc</sup>	10.10 <sup>a</sup>
<i>Mo-45</i>	27.94 <sup>a</sup>	13.03 <sup>cd</sup>	28.05 <sup>f</sup>	59.46 <sup>e</sup>	31.40 <sup>c</sup>	10.17 <sup>a</sup>
<i>Ll-15</i>	27.42 <sup>a</sup>	13.72 <sup>bcd</sup>	36.06 <sup>abc</sup>	71.57 <sup>b</sup>	35.50 <sup>ab</sup>	9.54 <sup>a</sup>
<i>Ll-30</i>	27.97 <sup>a</sup>	15.93 <sup>ab</sup>	33.59 <sup>cde</sup>	68.19 <sup>c</sup>	34.59 <sup>ab</sup>	9.12 <sup>a</sup>
<i>Ll-45</i>	28.52 <sup>a</sup>	18.14 <sup>a</sup>	31.13 <sup>e</sup>	64.81 <sup>d</sup>	33.68 <sup>bc</sup>	8.70 <sup>a</sup>
<i>Gu-15</i>	27.30 <sup>a</sup>	12.53 <sup>cd</sup>	36.68 <sup>ab</sup>	71.46 <sup>b</sup>	34.75 <sup>ab</sup>	9.95 <sup>a</sup>
<i>Gu-30</i>	27.73 <sup>a</sup>	13.55 <sup>bcd</sup>	34.84 <sup>bcd</sup>	67.98 <sup>c</sup>	33.08 <sup>bc</sup>	9.94 <sup>a</sup>
<i>Gu-45</i>	28.16 <sup>a</sup>	14.57 <sup>bc</sup>	33.00 <sup>de</sup>	64.50 <sup>d</sup>	31.41 <sup>c</sup>	9.94 <sup>a</sup>
<b>EEM</b>	<b>0.64</b>	<b>0.54</b>	<b>0.55</b>	<b>0.58</b>	<b>0.53</b>	<b>0.57</b>

a, b, c, d, e, f: Medias con diferentes literales en la misma columna son diferentes estadísticamente (P < 0.05).

**MS:** Materia seca, **PC:** Proteína cruda, **FIDA:** Fibra insoluble en detergente ácido, **FIDN:** Fibra insoluble en detergente neutro, **Hem:** hemicelulosa, **C:** cenizas, **Cn-100:** 100% *Cynodon nlemfuensis* (Testigo), **Mo-15:** 85% *Cynodon nlemfuensis* + 15% *Moringa oleífera*, **Mo-30:** 70% *Cynodon nlemfuensis* + 30% *Moringa oleífera*, **Mo-45:** 55% *Cynodon nlemfuensis* + 45% *Moringa oleífera*, **Ll-15:** 85% *Cynodon nlemfuensis* + 15% *Leucaena leucocephala*, **Ll-30:** 70% *Cynodon nlemfuensis* + 30% *Leucaena leucocephala*, **Ll-45:** 55% *Cynodon nlemfuensis* + 45% *Leucaena leucocephala*, **Gu-15:** 85% *Cynodon nlemfuensis* + 15% *Guazuma ulmifolia*, **Gu-30:** 70% *Cynodon nlemfuensis* + 30% *Guazuma ulmifolia* y **Gu-45:** 55% *Cynodon nlemfuensis* + 45% *Guazuma ulmifolia*, **EEM:** Error estándar de la media.

Estos datos concuerdan con Maya *et al.* (2005) quienes reportan que los valores de PC aumentan al asociar pasto *C. nlemfuensis* con *L. leucocephala* a diferentes edades de cosecha (28 d, 35 d y 42 d) y con diferentes partes de la arbórea (hojas,

tallos y hojas + tallos) sin encontrar diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) en paredes celulares. En estudios *in vivo* se han alimentado ovinos con una dieta a base de pasto clon Cuba CT-115 (*P. purpureum*) con diferentes inclusiones de *L. leucocephala*, se obtuvo mayor ganancia diaria de peso (Madera *et al.* 2013). Se ha determinado que la suplementación con *L. leucocephala* durante el periodo de lactancia incrementa el peso de las crías al destete y contribuye a mayor producción de leche y mejora el peso vivo de las hembras al finalizar la lactancia (Pérez *et al.* 2017). El manejo de ovinos alimentados con pasto Guinea y *L. leucocephala* mostró mayor crecimiento de las crías y las reproductoras durante las etapas de cubrición, parto y 30 d posparto (López *et al.* 2011). Mayren *et al.* (2018) y Gutiérrez *et al.* (2018), enfatizan que la calidad nutrimental de *M. oleífera* y *G. ulmifolia* mejoran la respuesta productiva de los rumiantes al suplementar las dietas a base de pastos tropicales, porque mejoran la ganancia de peso, eficiencia alimenticia, consumo voluntario, utilización del nitrógeno, incrementa la digestibilidad y disminuye las excreciones de nitrógeno. En el presente estudio en las dietas donde se incluyó alguna arbórea, se mejoró la composición química de la dieta; sin embargo, la incorporación de 30% y 45% de *L. leucocephala* presentó los mejores porcentajes de PC. Petit *et al.* (2011) reportan que *L. leucocephala* es una especie que tiene alto contenido de proteína y menor proporción de paredes celulares que las gramíneas, por lo que es una buena opción como forraje para el ganado en el trópico.

## **6.2. Producción acumulada de biogás total (CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub>)**

La producción acumulada de biogás total en las trampas durante la fermentación ruminal *in vitro* (Cuadro 11), presentó diferencias ( $P < 0.05$ ) entre las dietas. A 24 h, 48 h y 72 h de incubación la dieta con 45% de *L. leucocephala* tuvo la menor ( $P < 0.05$ ) producción de biogás comparado con la dieta con 100% de pasto *C. nlemfuensis* que presentó la mayor ( $P < 0.05$ ) producción de biogás por gramo de materia seca. A 6 h y 12 h no se encontraron diferencias ( $P > 0.05$ ) entre las dietas.

**Cuadro 11.** Producción acumulada de biogás total (mL) en trampas de solución salina acida por g MS<sup>-1</sup> durante la incubación a 72 h.

Dietas	Tiempo de incubación en horas				
	6	12	24	48	72
<i>Cn-100</i>	93.40 <sup>a</sup>	145.33 <sup>a</sup>	201.86 <sup>a</sup>	237.86 <sup>a</sup>	248.00 <sup>a</sup>
<i>Mo-15</i>	85.06 <sup>a</sup>	137.93 <sup>a</sup>	185.06 <sup>ab</sup>	217.33 <sup>ab</sup>	229.00 <sup>ab</sup>
<i>Mo-30</i>	85.06 <sup>a</sup>	118.53 <sup>a</sup>	163.93 <sup>ab</sup>	190.53 <sup>ab</sup>	195.46 <sup>ab</sup>
<i>Mo-45</i>	93.06 <sup>a</sup>	142.53 <sup>a</sup>	190.20 <sup>ab</sup>	212.06 <sup>ab</sup>	217.93 <sup>ab</sup>
<i>LI-15</i>	83.46 <sup>a</sup>	128.93 <sup>a</sup>	181.26 <sup>ab</sup>	213.66 <sup>ab</sup>	225.73 <sup>ab</sup>
<i>LI-30</i>	92.13 <sup>a</sup>	143.40 <sup>a</sup>	176.80 <sup>ab</sup>	199.06 <sup>ab</sup>	205.46 <sup>ab</sup>
<i>LI-45</i>	83.66 <sup>a</sup>	128.66 <sup>a</sup>	146.26 <sup>b</sup>	177.33 <sup>b</sup>	187.26 <sup>b</sup>
<i>Gu-15</i>	88.33 <sup>a</sup>	144.13 <sup>a</sup>	194.66 <sup>ab</sup>	223.93 <sup>ab</sup>	232.33 <sup>ab</sup>
<i>Gu-30</i>	84.73 <sup>a</sup>	136.80 <sup>a</sup>	182.00 <sup>ab</sup>	204.86 <sup>ab</sup>	212.80 <sup>ab</sup>
<i>Gu-45</i>	99.33 <sup>a</sup>	154.86 <sup>a</sup>	192.60 <sup>ab</sup>	225.06 <sup>ab</sup>	235.66 <sup>ab</sup>
<b>EEM</b>	<b>8.80</b>	<b>9.61</b>	<b>10.98</b>	<b>10.52</b>	<b>11.94</b>

<sup>a, b</sup>: Medias con diferentes literales en la misma columna son diferentes estadísticamente ( $P < 0.05$ ).

**Cn-100**: 100% *Cynodon nlemfuensis* (Testigo), **Mo-15**: 85% *Cynodon nlemfuensis* + 15% *Moringa oleífera*, **Mo-30**: 70% *Cynodon nlemfuensis* + 30% *Moringa oleífera*, **Mo-45**: 55% *Cynodon nlemfuensis* + 45% *Moringa oleífera*, **LI-15**: 85% *Cynodon nlemfuensis* + 15% *Leucaena leucocephala*, **LI-30**: 70% *Cynodon nlemfuensis* + 30% *Leucaena leucocephala*, **LI-45**: 55% *Cynodon nlemfuensis* + 45% *Leucaena leucocephala*, **Gu-15**: 85% *Cynodon nlemfuensis* + 15% *Guazuma ulmifolia*, **Gu-30**: 70% *Cynodon nlemfuensis* + 30% *Guazuma ulmifolia* y **Gu-45**: 55% *Cynodon nlemfuensis* + 45% *Guazuma ulmifolia*, **EEM**: Error estándar de la media.

Ley *et al.* (2018) reportan que la mayor producción de biogás se presentó en el periodo de 48 h a 72 h, contrario a lo encontrado en el presente experimento, donde la mayor producción de biogás se observó entre 6 h y 24 h, lo que indica que durante este periodo se tuvo la mayor actividad de las bacterias para degradar el sustrato. Ángeles *et al.* (2019) reportan menor producción de biogás total a 24 h para una dieta de 100% de pasto y la inclusión de 30% de *L. leucocephala* o *G. ulmifolia* sin encontrar diferencias significativas entre dietas. Similares resultados fueron hallados

en el presente estudio donde no se encontraron diferencias significativas entre la dieta de 100% de pasto *C. nlemfuensis* y la inclusión de 30% de *M. oleífera*, *L. leucocephala* o *G. ulmifolia* a la dieta. Gaviria *et al.* (2015) indican que la producción de biogás *in vitro* está relacionada con la fermentación del alimento por los microorganismos ruminales; también la composición química de la dieta influye sobre el volumen de biogás producido. Cuartas *et al.* (2015) mencionan que la producción de biogás está relacionada con la degradación de la FIDN y esta relación suele ser lineal, debido a que aquellos forrajes con mayor contenido de FIDN producen más biogás (Kriszan *et al.* 2013). Lo anterior coincide con los resultados del presente experimento, donde la dieta con 100% de pasto *C. nlemfuensis* presentó el mayor porcentaje de FIDN 74.95% y mostro la mayor producción acumulada de biogás a 24 h, 48 h y 72 h de incubación, además, el tratamiento con 45% de *L. leucocephala* tuvo la menor producción acumulada de biogás total a 24 h, 48 h y 72 h de fermentación y fue una de las dietas con menor porcentaje de FIDN (64.81%). Estos datos coinciden con lo encontrado por Rodríguez *et al.* (2014) quienes reportaron al fermentar *in vitro* *L. leucocephala* y *M. oleífera* durante 96 h, mayor producción de biogás en *M. oleífera* con respecto a *L. leucocephala*. En contraste, Ramírez *et al.* (2012) reportan menor producción de biogás para *G. ulmifolia* al ser fermentada *in vitro* durante 96 h. Por otra parte, Gaviria *et al.* (2015) también reportaron menor producción de biogás para *L. leucocephala*, mayor producción de biogás para la dieta con 100% de pasto y menor producción de biogás en una dieta de 23% de *L. leucocephala* y 77% de pasto *Panicum máximum*, sin encontrar diferencias ( $P > 0.05$ ) entre el pasto y la dieta. Ley *et al.* (2018) reportaron para *C. nlemfuensis* superior producción de biogás en más del 100% ( $525 \text{ mL g MS}^{-1}$ ) a los resultados encontrados en el presente experimento que fue de  $248 \text{ mL g MS}^{-1}$  a 72 h de fermentación.

### **6.3. Población de bacterias totales**

La población de bacterias totales ( $10^{10} \text{ mL}^{-1}$ ) a diferentes tiempos de incubación (12 h, 24 h y 48 h) presentó diferencias estadísticas ( $P < 0.05$ ) entre dietas (Cuadro 12).

A 6 h y 72 h no se encontraron diferencias ( $P > 0.05$ ) entre las dietas. A 12 h la dieta con 100% de pasto *C. nlemfuensis* presentó la mayor ( $P < 0.05$ ) población de bacterias totales, comparado con el tratamiento con 30 % de *G. ulmifolia* que tuvo la menor ( $P < 0.05$ ) población de bacterias  $\text{mL}^{-1}$ . A 24 h se observó la mayor ( $P < 0.05$ ) población de bacterias totales en el tratamiento testigo con 100% de pasto *C. nlemfuensis*, en comparación con la dieta con inclusión de 30% de *M. oleífera*, 45% de *L. leucocephala* y 15%, 30% y 45% de *G. ulmifolia*; pero similar ( $P > 0.05$ ) a la dieta con 15% y 45% de *M. oleífera* y 15% y 30% de *L. leucocephala*. La dieta con la menor ( $P < 0.05$ ) población de bacterias  $\text{mL}^{-1}$  después de 24 h de incubación fue el tratamiento con 15% de *G. ulmifolia*. A 48 h la dieta con 100% de pasto *C. nlemfuensis* mostró la mayor ( $P < 0.05$ ) población de bacterias totales en relación a la dieta con 30% y 45% de *M. oleífera* y 30% y 45% de *L. leucocephala*; pero similar a las dietas con 15% de *M. oleífera*, 15% de *L. leucocephala* y 15%, 30% y 45% de *G. ulmifolia*; la dieta donde se obtuvo la menor ( $P < 0.05$ ) población de bacterias  $\text{mL}^{-1}$  después de 48 h de fermentación fue la dieta con 45% de *L. leucocephala*.

En todas las dietas evaluadas, la población de bacterias totales se mantuvo en  $10^{10}$  bacterias por mililitro de medio de cultivo, encontrándose dentro del rango reportado por Yokoyama & Johnson (1988). Ley *et al.* (2018) reportan mayor población de bacterias totales para el pasto *C. nlemfuensis* a 24 h, 48 h y 72 h de fermentación. Galindo *et al.* (2003), reportaron que la inclusión de arbóreas forrajeras a la dieta reduce la población de bacterias totales comparado con una dieta de 100% de pasto *C. nlemfuensis*; resultados similares fueron encontrados en este experimento, donde las dietas con inclusión de *M. oleífera*, *L. leucocephala* o *G. ulmifolia* presentaron una menor población bacteriana comparada con la dieta con 100% de pasto *C. nlemfuensis*. Al respecto, Márquez & Suarez (2008) y Araujo (2008) indican que a los taninos se les identifica como inhibidores del crecimiento de algunas bacterias del rumen; lo cual sugiere que la presencia de taninos en las dietas con algún porcentaje de arbóreas puede presentar una inhibición en el crecimiento bacteriano. Este aspecto pudo influir directamente en los resultados obtenidos en este experimento.

**Cuadro 12.** Población de bacterias totales ( $10^{10}$  mL<sup>-1</sup>) a diferentes tiempos de incubación.

Dietas	Tiempo de incubación en horas				
	6	12	24	48	72
<i>Cn</i> -100	10.21 <sup>a</sup>	10.42 <sup>a</sup>	10.53 <sup>a</sup>	10.43 <sup>a</sup>	10.32 <sup>a</sup>
<i>Mo</i> -15	10.27 <sup>a</sup>	10.37 <sup>ab</sup>	10.41 <sup>abc</sup>	10.35 <sup>abc</sup>	10.22 <sup>a</sup>
<i>Mo</i> -30	10.38 <sup>a</sup>	10.31 <sup>ab</sup>	10.34 <sup>bcd</sup>	10.20 <sup>bc</sup>	10.25 <sup>a</sup>
<i>Mo</i> -45	10.34 <sup>a</sup>	10.33 <sup>ab</sup>	10.40 <sup>abcd</sup>	10.18 <sup>bc</sup>	10.31 <sup>a</sup>
<i>Ll</i> -15	10.20 <sup>a</sup>	10.30 <sup>ab</sup>	10.50 <sup>ab</sup>	10.36 <sup>ab</sup>	10.34 <sup>a</sup>
<i>Ll</i> -30	10.31 <sup>a</sup>	10.38 <sup>ab</sup>	10.38 <sup>abcd</sup>	10.16 <sup>bc</sup>	10.28 <sup>a</sup>
<i>Ll</i> -45	10.32 <sup>a</sup>	10.37 <sup>ab</sup>	10.35 <sup>bcd</sup>	10.13 <sup>c</sup>	10.24 <sup>a</sup>
<i>Gu</i> -15	10.28 <sup>a</sup>	10.36 <sup>ab</sup>	10.24 <sup>d</sup>	10.28 <sup>abc</sup>	10.40 <sup>a</sup>
<i>Gu</i> -30	10.31 <sup>a</sup>	10.23 <sup>b</sup>	10.33 <sup>cd</sup>	10.29 <sup>abc</sup>	10.27 <sup>a</sup>
<i>Gu</i> -45	10.36 <sup>a</sup>	10.34 <sup>ab</sup>	10.32 <sup>cd</sup>	10.24 <sup>abc</sup>	10.30 <sup>a</sup>
<b>EEM</b>	<b>0.04</b>	<b>0.03</b>	<b>0.03</b>	<b>0.04</b>	<b>0.04</b>

a, b, c, d: Medias con diferentes literales en la misma columna son diferentes estadísticamente ( $P < 0.05$ ).

**Cn-100:** 100% *Cynodon nlemfuensis* (Testigo), **Mo-15:** 85% *Cynodon nlemfuensis* + 15% *Moringa oleífera*, **Mo-30:** 70% *Cynodon nlemfuensis* + 30% *Moringa oleífera*, **Mo-45:** 55% *Cynodon nlemfuensis* + 45% *Moringa oleífera*, **Ll-15:** 85% *Cynodon nlemfuensis* + 15% *Leucaena leucocephala*, **Ll-30:** 70% *Cynodon nlemfuensis* + 30% *Leucaena leucocephala*, **Ll-45:** 55% *Cynodon nlemfuensis* + 45% *Leucaena leucocephala*, **Gu-15:** 85% *Cynodon nlemfuensis* + 15% *Guazuma ulmifolia*, **Gu-30:** 70% *Cynodon nlemfuensis* + 30% *Guazuma ulmifolia* y **Gu-45:** 55% *Cynodon nlemfuensis* + 45% *Guazuma ulmifolia*, **EEM:** Error estándar de la media.

Galindo *et al.* (2008) reportaron una mayor población de bacterias totales con una dieta de 80% de pasto *C. nlemfuensis* y 20% de *L. leucocephala* comparada con una dieta de 100% de pasto *C. nlemfuensis*; sin embargo, al incluir 30% de *L. leucocephala* obtuvo una menor población bacteriana; resultados similares fueron encontrados en este experimento a 48 h de fermentación, donde a mayor inclusión de *L. leucocephala* en la dieta, fue menor la población de bacterias totales. Sin

embargo, Galindo *et al.* (2007) reportan que el número de bacterias totales no se modificó por la inclusión de *L. leucocephala* a una dieta a base de gramíneas combinadas.

#### **6.4. Población de protozoarios**

En el Cuadro 13 se muestran los resultados de la población de protozoarios totales ( $10^6 \text{ mL}^{-1}$ ) de las distintas dietas a las diferentes horas de incubación. Para esta variable no se encontraron diferencias ( $P > 0.005$ ) entre las dietas a las distintas horas de incubación.

En todos los tratamientos evaluados del presente estudio, la población de protozoarios se mantuvo en  $10^6$  protozoarios  $\text{mL}^{-1}$  de medio de cultivo, encontrándose dentro del rango reportado por Yokoyama & Johnson (1988). La población de protozoarios encontradas en este experimento para la dieta con 100% de pasto *C. nlemfuensis* fueron superiores a las reportadas por Galindo *et al.* (2008) para una dieta de 100% del mismo tipo de pasto. Galindo *et al.* (2014) reportan que dietas con 70% de *C. nlemfuensis* y 30% de *L. leucocephala*, *M. oleífera* o *G. ulmifolia* reducen la población de protozoarios en comparación de una dieta con 100% de pasto *C. nlemfuensis*, sin presentar diferencias significativas en la población de protozoarios entre las tres arbóreas antes mencionadas. En contraste, en el presente experimento no se encontraron diferencias significativas entre la dieta testigo con 100% de pasto *C. nlenfuensis* y la inclusión de 15%, 30% y 45% de *L. leucocephala*, *M. oleífera* y *G. ulmifolia* a dietas a base de pasto *C. nlenfuensis*. Por otro lado, la población de protozoarios encontrados en las dietas con inclusión de *L. leucocephala* contrastan con los resultados reportados por Galindo *et al.* (2007) y Galindo *et al.* (2008) quienes observaron una disminución significativa en la población de protozoarios al incluir *L. leucocephala* a las dietas con relación a una dieta de 100% de pasto.

Es posible que la reducción en la población de protozoarios sea un factor de influya en el incremento de las bacterias celulolíticas, debido a que los protozoarios

consumen grandes cantidades de bacterias y son selectivos a las zoosporas de hongos celulolíticos (Galindo 1988).

**Cuadro 13.** Población de protozoarios ( $10^6 \text{ mL}^{-1}$ ) a diferentes tiempos de incubación.

Dietas	Tiempo de incubación en horas				
	6	12	24	48	72
<i>Cn</i> -100	5.26 <sup>a</sup>	8.50 <sup>a</sup>	8.26 <sup>a</sup>	7.88 <sup>a</sup>	2.64 <sup>a</sup>
<i>Mo</i> -15	8.08 <sup>a</sup>	8.30 <sup>a</sup>	7.99 <sup>a</sup>	7.93 <sup>a</sup>	5.34 <sup>a</sup>
<i>Mo</i> -30	8.40 <sup>a</sup>	8.51 <sup>a</sup>	7.71 <sup>a</sup>	7.58 <sup>a</sup>	5.21 <sup>a</sup>
<i>Mo</i> -45	8.03 <sup>a</sup>	8.56 <sup>a</sup>	7.93 <sup>a</sup>	7.78 <sup>a</sup>	5.18 <sup>a</sup>
<i>Ll</i> -15	5.21 <sup>a</sup>	8.45 <sup>a</sup>	8.11 <sup>a</sup>	7.78 <sup>a</sup>	7.71 <sup>a</sup>
<i>Ll</i> -30	8.28 <sup>a</sup>	8.39 <sup>a</sup>	7.91 <sup>a</sup>	5.01 <sup>a</sup>	7.88 <sup>a</sup>
<i>Ll</i> -45	7.93 <sup>a</sup>	8.47 <sup>a</sup>	8.08 <sup>a</sup>	7.71 <sup>a</sup>	7.65 <sup>a</sup>
<i>Gu</i> -15	7.65 <sup>a</sup>	5.21 <sup>a</sup>	8.18 <sup>a</sup>	5.47 <sup>a</sup>	7.99 <sup>a</sup>
<i>Gu</i> -30	7.99 <sup>a</sup>	8.22 <sup>a</sup>	7.91 <sup>a</sup>	7.65 <sup>a</sup>	7.78 <sup>a</sup>
<i>Gu</i> -45	7.91 <sup>a</sup>	8.45 <sup>a</sup>	8.07 <sup>a</sup>	7.95 <sup>a</sup>	7.58 <sup>a</sup>
<b>EEM</b>	<b>1.17</b>	<b>0.82</b>	<b>0.14</b>	<b>1.18</b>	<b>1.67</b>

<sup>a</sup>: Medias en la misma columna con literales iguales no difieren estadísticamente ( $P > 0.05$ ).

**Cn-100**: 100% *Cynodon nlemfuensis* (Testigo), **Mo-15**: 85% *Cynodon nlemfuensis* + 15% *Moringa oleífera*, **Mo-30**: 70% *Cynodon nlemfuensis* + 30% *Moringa oleífera*, **Mo-45**: 55% *Cynodon nlemfuensis* + 45% *Moringa oleífera*, **Ll-15**: 85% *Cynodon nlemfuensis* + 15% *Leucaena leucocephala*, **Ll-30**: 70% *Cynodon nlemfuensis* + 30% *Leucaena leucocephala*, **Ll-45**: 55% *Cynodon nlemfuensis* + 45% *Leucaena leucocephala*, **Gu-15**: 85% *Cynodon nlemfuensis* + 15% *Guazuma ulmifolia*, **Gu-30**: 70% *Cynodon nlemfuensis* + 30% *Guazuma ulmifolia* y **Gu-45**: 55% *Cynodon nlemfuensis* + 45% *Guazuma ulmifolia*, **EEM**: Error estándar de la media.

Por otro lado, Galindo *et al.* (2003) reportan aumento en la población de protozoarios al agregar 30% de *L. leucocephala* a la dieta comparado con una dieta de 100% de pasto *C. nlemfuensis*, contrasta a los resultados encontrados en el presente experimento donde no hubo diferencias entre las distintas dietas.

La reducción de la población de protozoarios reportada en las investigaciones con la inclusión de *L. leucocephala*, *M. oleífera* o *G. ulmifolia* en las dietas, confirma las propiedades defaunantes de estas arbóreas (Galindo *et al.* 2007; Galindo *et al.* 2008; Galindo *et al.* 2014). Estas propiedades pueden atribuirse al contenido de metabolitos secundarios como taninos y saponinas presentes en estas arbóreas (García *et al.* 2008; Galindo *et al.* 2014). Resultados de Galindo *et al.* (2006) con extractos crudos de polifenoles totales y taninos condensados muestran que ambos reducen la población de protozoarios *in vitro*. Por otra parte, Zhou *et al.* (2011) y Galindo *et al.* (2016) informan que las saponinas pueden ocasionar disminución de la población de protozoarios, debido a que producen cambios en la permeabilidad de la membrana celular, como resultado de la saponificación lo que ocasiona la lisis celular a nivel ruminal. En estudios *in vivo* Abreu *et al.* (2003) corroboran que animales alimentados con plantas poseedoras de altas concentraciones de saponinas en sus hojas, tallos, frutos y pericarpio, registran menor población de protozoarios en rumen. Sin embargo, el crecimiento de población de protozoarios reportado por Galindo *et al.* (2003) al adicionar arbóreas a la dieta, corrobora la teoría de que los factores relacionados con la planta, como el estado vegetativo, edad, fenología, época del año y otros, también pueden influir en las poblaciones microbianas ruminales.

### **6.5. Población de bacterias celulolíticas**

La población de bacterias celulolíticas a 72 h de incubación (Cuadro 14) presenta diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre las dietas. La dieta con 15% de *G. ulmifolia* tuvo la mayor ( $P < 0.05$ ) población de estas bacteria por  $\text{mL}^{-1}$  de medio de cultivo; en comparación con los tratamientos con 15% de *M. oleífera*, 15% y 30% de *L. leucocephala* y 45% de *G. ulmifolia*; pero, fue similar ( $P > 0.05$ ) a la dieta de 100% de pasto *C. nlemfuensis*, 30% y 45% de *M. oleífera*, 45% de *L. leucocephala* y 30% de *G. ulmifolia*. Las dietas con la menor ( $P < 0.05$ ) población de bacterias celulolíticas por  $\text{mL}^{-1}$  de medio de cultivo fueron los tratamientos con 15% y 30% de *L. leucocephala*.

En la presente investigación, los resultados obtenidos para la población de estas bacterias en la dieta con 100% de pasto *C. nlemfuensis* fueron inferiores a lo reportado por Ley *et al.* (2018), que fueron de  $4.31 \times 10^7$  bacterias celulolíticas por  $\text{mL}^{-1}$  de medio de cultivo a 72 h de fermentación; siendo superiores a lo reportado por Galindo *et al.* (2003) quienes encontraron una población de estas bacterias de  $2.69 \times 10^6$  ufc/ $\text{mL}^{-1}$  al fermentar una dieta de 100% del mismo pasto a 24 h, no encontraron diferencias significativas al incluir 30% de *L. leucocephala* a la dieta, cuyos resultados fueron similares a lo encontrado en este experimento.

**Cuadro 14.** Población de bacterias celulolíticas ( $10^6 \text{ mL}^{-1}$ ) a las 72 h de fermentación.

Dietas	Bacterias Celulolíticas
<i>Cn</i> -100	9.99 <sup>abc</sup>
<i>Mo</i> -15	9.43 <sup>bc</sup>
<i>Mo</i> -30	10.22 <sup>abc</sup>
<i>Mo</i> -45	10.08 <sup>abc</sup>
<i>Ll</i> -15	8.93 <sup>c</sup>
<i>Ll</i> -30	8.60 <sup>c</sup>
<i>Ll</i> -45	11.44 <sup>ab</sup>
<i>Gu</i> -15	12.21 <sup>a</sup>
<i>Gu</i> -30	10.22 <sup>abc</sup>
<i>Gu</i> -45	9.35 <sup>bc</sup>
<b>EEM</b>	<b>0.49</b>

<sup>a, b, c</sup>: Medias con diferentes literales en la misma columna son diferentes estadísticamente ( $P < 0.05$ ).

**Cn-100**: 100% *Cynodon nlemfuensis* (Testigo), **Mo-15**: 85% *Cynodon nlemfuensis* + 15% *Moringa oleífera*, **Mo-30**: 70% *Cynodon nlemfuensis* + 30% *Moringa oleífera*, **Mo-45**: 55% *Cynodon nlemfuensis* + 45% *Moringa oleífera*, **Ll-15**: 85% *Cynodon nlemfuensis* + 15% *Leucaena leucocephala*, **Ll-30**: 70% *Cynodon nlemfuensis* + 30% *Leucaena leucocephala*, **Ll-45**: 55% *Cynodon nlemfuensis* + 45% *Leucaena leucocephala*, **Gu-15**: 85% *Cynodon nlemfuensis* + 15% *Guazuma ulmifolia*, **Gu-30**: 70% *Cynodon nlemfuensis* + 30% *Guazuma ulmifolia* y **Gu-45**: 55% *Cynodon nlemfuensis* + 45% *Guazuma ulmifolia*, **EEM**: Error estándar de la media.

Galindo *et al.* (2007) reportan que la población de bacterias celulolíticas no cambia al agregar 30% de *L. leucocephala* a la dieta comparada con una dieta de 100% de gramíneas mezcladas, pero aumentan al incrementar el porcentaje de *L. leucocephala*, resultados similares fueron obtenidos en el presente experimento. Galindo *et al.* (2008) y Galindo *et al.* (2018) reportan que la inclusión de *L. leucocephala* a la dieta de pasto aumenta la población de estas bacterias comparado con una dieta de 100% de pasto, lo cual contrasta con el presente experimento donde no se encontraron diferencias significativas entre la dieta de 100% de pasto *C. nlemfuensis* y las dietas con 15%, 30% y 45% de *L. leucocephala*.

La adición de forrajes que aportan proteína a dietas de baja calidad, propicia una mayor disponibilidad de compuestos como amoníaco, aminoácidos y péptidos, y ácidos grasos volátiles ramificados que son el resultado de la degradación de las proteínas (Chongo *et al.* 1998; De Luca 2002), compuestos que son activadores del crecimiento de las bacterias ruminales, en particular de las celulolíticas (Galindo *et al.* 2007) que realizan la degradación de la fibra (Hoover & Stokes 1991). Por otro lado, Santos *et al.* (2005) reportan que la presencia de metabolitos secundarios como las saponinas en las arbóreas utilizadas en la alimentación de rumiantes pueden reducir el número de bacterias celulolíticas, lo cual podría afectar la digestibilidad de la dieta; indican que el crecimiento de dos de las bacterias celulolíticas más importantes: *Ruminococcus flavefaciens* y *Fibrobacter succinogenes* se afecta negativamente por las saponinas, este metabolito inhibió el crecimiento de las bacterias Gram-negativa (*F. succinogenes*). Esto sugiere que existen efectos sobre algunas especies de microorganismos específicos sensibles a las saponinas, lo que podría ofrecer una manipulación selectiva del metabolismo ruminal (Patra & Saxena 2009).

## **6.6. Degradabilidad de la materia seca y pH**

En el Cuadro 15 se observa la DIVMS y el pH de las dietas a 72 h de incubación. La DIVMS presenta diferencias estadísticas ( $P < 0.05$ ) entre dietas. La dieta con 30% de *M. oleífera* mostró la mayor ( $P < 0.05$ ) DIVMS, mientras que las dietas con 45% de *M. oleífera*, 30% de *L. leucocephala* y 30% de *G. ulmifolia* presentaron los

porcentajes más bajos ( $P < 0.05$ ) de DIVMS. Las dietas evaluadas no presentaron diferencias ( $P > 0.05$ ) en los valores de pH a 72 horas de incubación.

**Cuadro 15.** Degradabilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) y pH de las dietas.

Dietas	DIVMS (%)	pH
<i>Cn</i> -100	57.50 <sup>abc</sup>	6.24 <sup>a</sup>
<i>Mo</i> -15	55.34 <sup>bc</sup>	6.27 <sup>a</sup>
<i>Mo</i> -30	61.25 <sup>a</sup>	6.27 <sup>a</sup>
<i>Mo</i> -45	52.50 <sup>c</sup>	6.25 <sup>a</sup>
<i>Ll</i> -15	55.94 <sup>abc</sup>	6.21 <sup>a</sup>
<i>Ll</i> -30	51.88 <sup>c</sup>	6.37 <sup>a</sup>
<i>Ll</i> -45	59.04 <sup>ab</sup>	6.40 <sup>a</sup>
<i>Gu</i> -15	54.34 <sup>bc</sup>	6.30 <sup>a</sup>
<i>Gu</i> -30	52.11 <sup>c</sup>	6.34 <sup>a</sup>
<i>Gu</i> -45	54.92 <sup>bc</sup>	6.28 <sup>a</sup>
<b>EEM</b>	<b>1.17</b>	<b>0.06</b>

<sup>a, b, c</sup>: Medias con diferentes literales en la misma columna son diferentes estadísticamente ( $P < 0.05$ ).

**DIVMS**: Degradabilidad *in vitro* de la materia seca, **Cn-100**: 100% *Cynodon nlemfuensis* (Testigo), **Mo-15**: 85% *Cynodon nlemfuensis* + 15% *Moringa oleífera*, **Mo-30**: 70% *Cynodon nlemfuensis* + 30% *Moringa oleífera*, **Mo-45**: 55% *Cynodon nlemfuensis* + 45% *Moringa oleífera*, **Ll-15**: 85% *Cynodon nlemfuensis* + 15% *Leucaena leucocephala*, **Ll-30**: 70% *Cynodon nlemfuensis* + 30% *Leucaena leucocephala*, **Ll-45**: 55% *Cynodon nlemfuensis* + 45% *Leucaena leucocephala*, **Gu-15**: 85% *Cynodon nlemfuensis* + 15% *Guazuma ulmifolia*, **Gu-30**: 70% *Cynodon nlemfuensis* + 30% *Guazuma ulmifolia* y **Gu-45**: 55% *Cynodon nlemfuensis* + 45% *Guazuma ulmifolia*, **EEM**: Error estándar de la media.

Los resultados de DIVMS de este estudio para la dieta con base de 100% de pasto *C. nlemfuensis* fueron menores a los reportados por Villalobos & Arce (2014), quienes reportaron valores de 68.02% de DIVMS, pero fueron mayores a los encontrados por Sandoval *et al.* (2016) que fueron de 48.08% de DIVMS a 35 d de rebrote. Rodríguez *et al.* (2014) reportan porcentajes de DIVMS para *M. oleífera* y *L. leucocephala* a 96

h de incubación, similares a los encontrados en el presente experimento a 72 h de fermentación. Por su parte, Ángeles *et al.* (2019) reportan porcentajes de DIVMS a 24 h de fermentación inferiores a 50% en una dieta de 100% de pasto y dietas con la inclusión de 30% de *L. leucocephala* o *G. ulmifolia*, sin encontrar diferencias significativas entre tratamientos; de forma similar a lo reportado en este estudio, donde no se encontraron diferencias entre la dieta testigo de 100% de pasto *C. nlemfuensis* y las dietas con inclusión de 30% de *L. leucocephala* o *G. ulmifolia*.

En general todos los porcentajes de DIVMS de las dietas con inclusión de *L. leucocephala*, *M. oleifera* o *G. ulmifolia* fueron superiores a 50% sin mostrar diferencias respecto a la dieta testigo de 100% de pasto *C. nlemfuensis*. Los datos obtenidos fueron similares a los resultados reportados por Rodríguez *et al.* (1998) quienes adicionaron 5%, 10%, 20% y 40% de arbóreas a dietas con base de pasto. Se ha determinado que la adición de arbóreas a las dietas, aunque produce cambios en la composición química, no asegura un incremento en la DIVMS; debido a que hay un desbalance entre el aporte de proteína y energía, ocasionado por una baja disponibilidad de carbohidratos de fácil fermentación en las arbóreas. Los desbalances de proteína y energía en el rumen, el uso total del amonio producido por la degradación de las proteínas, limitan el crecimiento microbiano y reducen la degradabilidad de la MS (Van Soest 1982).

Los valores de pH de los medios de cultivo de los biodigestores se mantuvieron dentro del rango de pH óptimo para el desarrollo y actividad de los microorganismos ruminales (Van Soest 1982), fueron superiores a 6.2, siendo adecuados para la proliferación de las bacterias celulolíticas que degradan las paredes celulares y se inhiben a pH inferiores a 6.0 (Sánchez & Cobos 2016). Los resultados del presente experimento para la dieta con 100% de pasto *C. nlemfuensis* son inferiores en pH a los reportados por Ley *et al.* (2018) para el mismo tipo de pasto en condiciones similares; además reportan que la fermentación ruminal de dietas con alto contenido de paredes celulares no causa disminución del pH debido a que la mayor parte de la glucosa liberada se fermenta hasta acetato (Ley *et al.* 2018). Por otro lado, Galindo *et al.* (2003) y Galindo *et al.* (2008) reportan valores de pH de 7.0 en dietas de 100% de pasto *C. nlemfuensis* y pH mayores a 6.9 en dietas de pasto *C. nlemfuensis* con

inclusión de *L. leucocephala*, cuyos resultados fueron superiores a los encontrados en este experimento.

### 6.7. Concentración de ácidos grasos volátiles

El Cuadro 16 muestra la concentración de AGVs ( $\text{mM L}^{-1}$ ) y la relación acetato: propionato determinada en cada una de las dietas a 72 h de fermentación. Se encontraron diferencias estadísticas ( $P < 0.05$ ) en las concentraciones de acetato y propionato, la dieta con 45% de *M. oleífera* presentó la mayor ( $P < 0.05$ ) concentración de ambos AGVs comparado con el resto de las dietas; mientras que la dieta con 30% de *L. leucocephala* tuvo la menor ( $P < 0.05$ ) concentración. Para butirato, la mayor ( $P < 0.05$ ) concentración la tuvo la dieta con 45% de *M. oleífera* comparado con las dietas con 30% de *M. oleífera*, 30% y 45% de *L. leucocephala* y 30% de *G. ulmifolia*, pero similar a la dieta de 100% de pasto *C. nlemfuensis*, 15% de *M. oleífera*, 15% de *L. leucocephala* y 15% y 45% de *G. ulmifolia*. La dieta con 45% de *M. oleífera* tuvo la mayor ( $P < 0.05$ ) concentración de AGVs totales, mientras que las dietas con 30% de *L. leucocephala* y 30% de *G. ulmifolia* tuvieron la menor ( $P < 0.05$ ) concentración. La relación acetato: propionato, fue menor ( $P < 0.05$ ) para la dieta de 45% *M. oleífera* comparado con las dietas con 30% de *L. leucocephala* y 30% de *G. ulmifolia* que presentaron una relación acetato: propionato ( $P < 0.05$ ) mayor.

En todas las dietas el patrón de fermentación fue acético, que corresponde a las características fermentativas de una dieta alta en fibra, debido a la menor velocidad de degradación de la celulosa en el rumen, con respecto a otras fuentes energéticas (Galindo *et al.* 2003). Ley *et al.* (2018) en condiciones similares reportan para el pasto *C. nlemfuensis* valores de acetato, propionato, butirato, AGVs totales y relación acetato:propionato muy superiores a lo encontrado en el presente estudio. Galindo *et al.* (2003) reportan para una dieta de 100% de pasto *C. nlemfuensis* y con inclusión de 30% de arbóreas forrajeras valores de acetato, propionato, butirato y AGVs totales, a 24 h de fermentación superiores a los encontrados en este experimento, sin encontrar diferencias entre tratamientos; similar a lo encontrado en este estudio,

donde la inclusión de 30% de *M. oleífera*, *L. leucocephala* o *G. ulmifolia* a la dieta no presentó diferencias significativas en comparación con el tratamiento testigo de 100% de pasto *C. nlemfuensis*.

**Cuadro 16.** Concentración de AGVs en las dietas después de 72 h de incubación.

Dietas	Acetato (mM L <sup>-1</sup> )	Propionato (mM L <sup>-1</sup> )	Butirato (mM L <sup>-1</sup> )	AGVs totales (mM L <sup>-1</sup> )	Relación Acet:Prop
<i>Cn</i> -100	21.89 <sup>bc</sup>	11.08 <sup>bcd</sup>	6.11 <sup>ab</sup>	39.08 <sup>bc</sup>	1.98 <sup>ab</sup>
<i>Mo</i> -15	23.29 <sup>b</sup>	12.31 <sup>b</sup>	7.00 <sup>ab</sup>	42.60 <sup>b</sup>	1.89 <sup>ab</sup>
<i>Mo</i> -30	20.89 <sup>bcd</sup>	10.52 <sup>bcd</sup>	5.69 <sup>b</sup>	37.10 <sup>bc</sup>	1.99 <sup>ab</sup>
<i>Mo</i> -45	30.00 <sup>a</sup>	17.11 <sup>a</sup>	8.82 <sup>a</sup>	55.93 <sup>a</sup>	1.75 <sup>b</sup>
<i>Ll</i> -15	21.85 <sup>bc</sup>	11.17 <sup>bcd</sup>	6.09 <sup>ab</sup>	39.11 <sup>bc</sup>	1.96 <sup>ab</sup>
<i>Ll</i> -30	18.53 <sup>d</sup>	8.87 <sup>d</sup>	4.85 <sup>b</sup>	32.25 <sup>c</sup>	2.09 <sup>a</sup>
<i>Ll</i> -45	21.77 <sup>bc</sup>	11.25 <sup>bcd</sup>	5.61 <sup>b</sup>	38.63 <sup>bc</sup>	1.94 <sup>ab</sup>
<i>Gu</i> -15	21.89 <sup>bc</sup>	11.34 <sup>bcd</sup>	6.37 <sup>ab</sup>	39.60 <sup>bc</sup>	1.93 <sup>ab</sup>
<i>Gu</i> -30	19.24 <sup>cd</sup>	9.07 <sup>cd</sup>	5.02 <sup>b</sup>	33.33 <sup>c</sup>	2.13 <sup>a</sup>
<i>Gu</i> -45	22.98 <sup>b</sup>	12.08 <sup>bc</sup>	6.13 <sup>ab</sup>	41.19 <sup>bc</sup>	1.90 <sup>ab</sup>
<b>EEM</b>	<b>0.61</b>	<b>0.60</b>	<b>0.59</b>	<b>1.81</b>	<b>0.05</b>

<sup>a, b, c, d</sup>: Medias con diferentes literales en la misma columna son diferentes estadísticamente (P < 0.05). **Cn-100**: 100% *Cynodon nlemfuensis* (Testigo), **Mo-15**: 85% *Cynodon nlemfuensis* + 15% *Moringa oleífera*, **Mo-30**: 70% *Cynodon nlemfuensis* + 30% *Moringa oleífera*, **Mo-45**: 55% *Cynodon nlemfuensis* + 45% *Moringa oleífera*, **Ll-15**: 85% *Cynodon nlemfuensis* + 15% *Leucaena leucocephala*, **Ll-30**: 70% *Cynodon nlemfuensis* + 30% *Leucaena leucocephala*, **Ll-45**: 55% *Cynodon nlemfuensis* + 45% *Leucaena leucocephala*, **Gu-15**: 85% *Cynodon nlemfuensis* + 15% *Guazuma ulmifolia*, **Gu-30**: 70% *Cynodon nlemfuensis* + 30% *Guazuma ulmifolia* y **Gu-45**: 55% *Cynodon nlemfuensis* + 45% *Guazuma ulmifolia*, **EEM**: Error estándar de la media.

El acetato y el butirato dan origen a la síntesis de CH<sub>4</sub>, por la mayor disponibilidad de CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub> para las *Archaeas* metanogénicas; mientras que la formación de propionato se considera una forma de competencia por la captación de H<sub>2</sub> que causa una menor síntesis de CH<sub>4</sub> (Gidlund *et al.* 2015). Lo anterior explica lo encontrado en este

estudio en la dieta con 45% de *M. oleífera* que presentó la mayor concentración de acetato y butirato y fue la dieta con la mayor emisión de CH<sub>4</sub>, comparado con la dieta de 30% de *L. leucocephala* que tuvo la menor concentración de acetato y butirato y fue una de las dietas con la menor producción de CH<sub>4</sub>.

## 6.8. Emisiones de CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub>

Las emisiones de metano y dióxido de carbono en las dietas después de 72 h de incubación mostraron diferencias estadísticas ( $P < 0.05$ ). La menor ( $P < 0.05$ ) emisión de CH<sub>4</sub> se determinó en la dieta con 45% de *L. leucocephala*, en contraste, las dietas con 100% de pasto *C. nlemfuensis* y con 45% de *M. oleífera* presentaron la mayor ( $P < 0.05$ ) emisión. La mayor ( $P < 0.05$ ) emisión de CO<sub>2</sub> la tuvo la dieta con 100% de pasto *C. nlemfuensis*, comparado con la dieta con 45% de *L. leucocephala* que presentó las menores ( $P < 0.05$ ) emisiones (Cuadro 17). En general la dieta con 45% de *L. leucocephala* produjo 18% menor emisión de CH<sub>4</sub>, en comparación con la dieta con 45% de *M. oleífera* que tuvo la mayor emisión de CH<sub>4</sub>; además tuvo 24% menor producción de CO<sub>2</sub> comparado con la dieta con 100% de pasto *C. nlemfuensis* que presentó la mayor producción de CO<sub>2</sub>.

En contraste, otras investigaciones en condiciones similares han reportado mayores emisiones de CH<sub>4</sub> (43.62 mL g<sup>-1</sup> MS) en pasto *Pennisetum clandestinum* a 48 h de incubación, que son superiores a las obtenidas en el presente estudio (33.01 mL g<sup>-1</sup> MS) en pasto *C. nlemfuensis* a 72 h de fermentación (Posada *et al.* 2014). También, Ley *et al.* (2018) reportan emisiones de CH<sub>4</sub> superiores en una dieta de 100% de pasto *C. nlemfuensis* en condiciones similares a 72 h de incubación, además indican que este gas se encuentra en mayor proporción (73.9%) de los gases emitidos durante la fermentación a 72 h, contrario a lo encontrado en este estudio donde se reportaron emisiones de 13.31% de CH<sub>4</sub> en relación al biogás total producido. Galindo *et al.* (2014), reportan emisiones de CH<sub>4</sub> superiores para una dieta de 100% de pasto *C. nlemfuensis* y para una dieta con 70% de *C. nlemfuensis* y 30% de *G. ulmifolia*, iguales para una dieta con 70% de *C. nlemfuensis* y 30% de *M. oleífera*, pero menor emisión para una dieta con 70% de *C. nlemfuensis* y 30% de *L.*

*leucocephala*, además reportan a *L. leucocephala* como una de las arbóreas capaces de reducir en mayor magnitud la producción de CH<sub>4</sub> y a *M. oleífera* y *G. ulmifolia* como arbóreas que pueden reducir la metanogénesis ruminal en menor magnitud. En el presente estudio se encontraron datos similares, además, se destaca que la inclusión de *L. leucocephala* en dietas a base de pasto *C. nlemfuensis* mostró mayor capacidad para reducir las emisiones de CH<sub>4</sub> en comparación con *M. oleífera* y *G. ulmifolia* que mostraron menor capacidad para reducir la producción de CH<sub>4</sub>. Ley *et al.* (2018) reportan que las dietas con la menor producción de biogás tienen la menor producción de CH<sub>4</sub> igual a lo encontrado en el presente estudio, donde la dieta con 45% de *L. leucocephala* tuvo la menor producción de biogás y fue la que presentó la menor emisión de gas metano, indicando una mayor eficiencia en la producción de energía debido a la mayor síntesis de ácido propionico; además indica que dietas con menores emisiones de metano tienen menores poblaciones de bacterias celulolíticas.

Hernández *et al.* (2017), Indican que al adicionar 15% de arbóreas a dietas para bovinos no se presentan diferencias estadísticas ( $P > 0.05$ ) en las emisiones de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> durante la fermentación ruminal *in vitro* a 96 h. Similares resultados fueron encontrados en la presente investigación, donde la inclusión de 15% de *L. leucocephala*, *M. oleífera* o *G. ulmifolia* a una dieta de pasto *C. nlemfuensis* no presentó diferencias significativas en las emisiones de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> comparado con la dieta testigo con 100% de pasto a 72 h de incubación. Ángeles *et al.* (2019) no reportan diferencias significativas en las emisiones de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> en dietas con inclusión de 30% de arbóreas forrajeras, comparada con una dieta testigo de 100% de pasto a 24 h de incubación. Similares resultados fueron encontrados en el presente estudio a 72 h de incubación donde la inclusión de 30% de *M. oleífera*, *L. leucocephala* o *G. ulmifolia* a una dieta a base de pasto *C. nlemfuensis* no mostró diferencias significativas en las emisiones de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> comparado con la dieta de 100% de pasto *C. nlemfuensis*.

**Cuadro 17.** Emisiones de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> en las dietas después de 72 h de fermentación (mL g de MS<sup>-1</sup>).

Dietas	CH <sub>4</sub>	CO <sub>2</sub>
<i>Cn</i> -100	33.01 <sup>ab</sup>	214.97 <sup>a</sup>
<i>Mo</i> -15	28.93 <sup>abc</sup>	200.11 <sup>ab</sup>
<i>Mo</i> -30	25.38 <sup>bc</sup>	170.40 <sup>ab</sup>
<i>Mo</i> -45	34.43 <sup>a</sup>	183.29 <sup>ab</sup>
<i>Ll</i> -15	27.29 <sup>abc</sup>	198.08 <sup>ab</sup>
<i>Ll</i> -30	24.48 <sup>bc</sup>	180.74 <sup>ab</sup>
<i>Ll</i> -45	23.97 <sup>c</sup>	163.17 <sup>b</sup>
<i>Gu</i> -15	28.75 <sup>abc</sup>	203.64 <sup>ab</sup>
<i>Gu</i> -30	30.01 <sup>abc</sup>	182.60 <sup>ab</sup>
<i>Gu</i> -45	28.84 <sup>abc</sup>	206.75 <sup>ab</sup>
<b>EEM</b>	<b>1.79</b>	<b>10.25</b>

<sup>a, b, c</sup>: Medias con diferentes literales en la misma columna son diferentes estadísticamente ( $P < 0.05$ ).

**CH<sub>4</sub>**: Metano, **CO<sub>2</sub>**: Dioxido de Carbono, **Cn-100**: 100% *Cynodon nlemfuensis* (Testigo), **Mo-15**: 85% *Cynodon nlemfuensis* + 15% *Moringa oleífera*, **Mo-30**: 70% *Cynodon nlemfuensis* + 30% *Moringa oleífera*, **Mo-45**: 55% *Cynodon nlemfuensis* + 45% *Moringa oleífera*, **Ll-15**: 85% *Cynodon nlemfuensis* + 15% *Leucaena leucocephala*, **Ll-30**: 70% *Cynodon nlemfuensis* + 30% *Leucaena leucocephala*, **Ll-45**: 55% *Cynodon nlemfuensis* + 45% *Leucaena leucocephala*, **Gu-15**: 85% *Cynodon nlemfuensis* + 15% *Guazuma ulmifolia*, **Gu-30**: 70% *Cynodon nlemfuensis* + 30% *Guazuma ulmifolia* y **Gu-45**: 55% *Cynodon nlemfuensis* + 45% *Guazuma ulmifolia*, **EEM**: Error estándar de la media.

La conversión anaeróbica de materia orgánica a CH<sub>4</sub> en el rumen involucra a todos los microorganismos, pero las *Archaeas* metanogénicas intervienen en el paso final. Primeramente, las bacterias, hongos y protozoos hidrolizan las proteínas, polisacáridos y lípidos para producir aminoácidos y azúcares, y fermentan estos últimos hasta ácidos grasos de cadena corta, H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>. El CH<sub>4</sub> se forma por los metanógenos ruminales, usando 80% de H<sub>2</sub> y 18% del formiato como sustratos (Demeyer & Fievez 2000). Probablemente la reducción en las emisiones de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> se puedan explicar por la presencia y concentración de metabolitos secundarios

como los taninos y las saponinas en el follaje de *L. leucocephala* (Verdecía *et al.* 2012), *M. oleífera* (Velázquez *et al.* 2016, Cabrera *et al.* 2017) y *G. ulmifolia* (Pinto *et al.* 2009; Luna & González 2017) que muestran distintos mecanismos de acción para reducir la metanogénesis ruminal (Vélez *et al.* 2014). Pueden afectar el desarrollo de las poblaciones microbianas del rumen, en especial de las *Archaeas* metanogénicas, además el mayor aporte de proteínas puede cambiar los patrones de fermentación hacia una mayor formación de propionato reduciendo la producción de CH<sub>4</sub> (Bodas *et al.* 2012). Vélez *et al.* (2014) reportan que las saponinas disminuyen la metanogénesis de modo indirecto al reducir la disponibilidad de H<sub>2</sub> al reducir la población de protozoarios, los cuales se encuentran en endosimbiosis con las *Archaeas* metanogénicas, cuya relación puede generar de 9% a 37% de las emisiones totales de CH<sub>4</sub>. Además, las saponinas tienen efectos en la producción de AGVs, pueden favorecer un aumento en la concentración de propionato y reducir la producción de acetato y butirato, lo que resulta en una menor producción de hidrógenos necesarios para la producción de CH<sub>4</sub> (Patra & Saxena 2010; Patra & Saxena 2009).

La inhibición de la metanogénesis ruminal por los taninos ha sido atribuido a su efecto directo sobre las *Archaeas* metanogénicas y los protozoarios (Patra & Saxena 2011). Se ha determinado que los taninos pueden inhibir el crecimiento o la actividad de las bacterias (McSweeney *et al.* 2001), *Archaeas* y protozoarios ruminales, también pueden afectar a las bacterias celulolíticas, en consecuencia, la fermentación de carbohidratos a AGVs, en especial reducen la producción de acetato, lo que reduce la formación de CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub> necesarios para la producción de CH<sub>4</sub> (Bodas *et al.* 2012). La mayor actividad antimetanogénica se atribuye a los taninos condensados (Ku *et al.* 2014), que inhiben a las *Archaeas* metanogénicas y causan una reducción en la degradación de la fibra, lo que produce una disminución de la liberación de hidrógenos necesarios para la producción de CH<sub>4</sub> (Bonilla & Lemus 2012). En general, los métodos de manipulación de la dieta que reduzcan la producción de CH<sub>4</sub> en rumen repercuten positivamente en el metabolismo energético de los rumiantes (Galindo *et al.* 2008).

## 7. CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados de esta investigación, se puede concluir que, a mayor porcentaje de *Moringa oleífera*, *Leucaena leucocephala* o *Guazuma ulmifolia* en una dieta a base de pastos *Cynodon nlemfuensis*, el contenido de PC aumenta y las concentraciones de paredes celulares (hemicelulosa, fibra insoluble en detergente neutro y ácido) disminuyen en relación directa con el nivel de inclusión.

La *Leucaena leucocephala* es una alternativa excelente como aporte de nutrientes para mejorar la calidad de la dieta de los rumiantes, así como un valioso recurso para disminuir las emisiones de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> al ambiente.

La inclusión de 45% de *L. leucocephala* a una dieta a base de pasto *C. nlemfuensis* redujo en 18% las emisiones de CH<sub>4</sub> y en 24% las de CO<sub>2</sub> durante la fermentación ruminal *in vitro*.

Se sugiere realizar más investigación con el follaje de estas arbóreas tanto *in vitro* como *in vivo* a diferentes edades de la planta, época del año, porcentaje de inclusión y pastos; así como medir la presencia y concentración de metabolitos secundarios de las arbóreas, antes y después de la fermentación ruminal para determinar su degradación en rumen y sus efectos a nivel microbiota ruminal.

## 8. LITERATURA CITADA

- Abreu, A., Carulla, J.E., Krenzer, M., Lascano, C. Díaz, T., Cano, A. & Hess, H.D. 2003. Efecto del fruto del pericarpo y el extracto semipurificado de saponinas de *Sapindus saponaria* sobre la fermentación ruminal y metanogénesis *in vitro* en un sistema RUSITEC. Rev. Col. Cienc. Pec. 16:2.
- Aguiar Z. E. & Rojas B. A. 2014. Métodos utilizados para reducir la producción de metano endógeno en rumiantes. Nutrición animal tropical. 8(2): 72-90.
- Ángeles M. Y., M. M. Ramírez, H. R. Mayo, G. M. M. Crosby, B. J. B. Ramírez y V. A. Sánchez. 2019. Evaluación *in vitro* del potencial antimetanogénico de follajes tropicales como estrategia de alimentación para rumiantes. Agro productividad. 12(2): 61-65.
- Ángeles S. C. 2014. Fermentación ruminal, tamaño de la partícula y efecto de la fibra en la alimentación de vacas lecheras. Universidad Nacional Autónoma de México. Researchgate: Sitio Argentino de Producción Animal.
- AOAC. 2005. Association of Official Analytical Chemests Official Methods of Animals, 18<sup>th</sup> ed. Washington, DC, USA.
- Araujo F. O. 2008. Desarrollo Sostenible de la Ganadería de Doble Propósito. Capitulo XXXIV: Factores antinutricionales en los alimentos para ganado vacuno. 410-421. Consultado el 28 de noviembre 2017. [http://www.avpa.ula.ve/libro\\_desarrollosost/pdf/capitulo\\_34.pdf](http://www.avpa.ula.ve/libro_desarrollosost/pdf/capitulo_34.pdf)
- Araujo O. & Vergara J. 2007. Propiedades físicas y químicas del rumen. Archivo Lationamericano de Producción Animal.15 (1): 133-140.
- Ávalos G. A. & Pérez U. C. E. 2009. Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2 (3): 119-145.
- Báez P. J. L. 2010. Uso de levaduras y fumarato para disminuir la metanogénesis en la fermentación de alfalfa. Tesis de Doctorado de Recursos Genéticos y Productividad Ganadera. Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo. México.
- Baldwin R. L. & Allison M. J. 1983. J. Animal. Sci. 57(2): 461.
- Beauchemin K. A. & S. M. McGinn. 2005. Methane emissions from feedlot cattle fed barley or corn diets. J. Anim. Sci. 83:653.
- Birmanía W. J. 2013. Las arbóreas, una alternativa nutricional en la producción animal. Sitio Argentino de Producción Animal. Consultado: el 24 de agosto de 2018: [www.engormix.com/ganaderia-carne/articulos/las-arboreas-alternativa-nutricional-t30443.htm](http://www.engormix.com/ganaderia-carne/articulos/las-arboreas-alternativa-nutricional-t30443.htm)
- Blanco R. M. 1999. Bacterias ruminales. Sitio argentino de Producción Animal.

- Bodas R., Prieto N., García-González R., Andrés S., Giráldez F. J., López S. 2012. Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Animal Feed Science and Technology* 176: 78-93.
- Bonilla C. J. A. & Lemus F. C. 2012. Emisión de metano entérico por rumiantes y su contribución al calentamiento global y al cambio climático. Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 3(2): 215-246.
- Broudiscou L.P. & Lassalas B. 2000. Effects of *Lavandula officinalis* and *Equisetum arvense* dry extracts and isoquercitrin on the fermentation of diets varying in forage contents by rumen microorganisms in batch culture. *Reproduction Nutrition Development*. 40: 431-440.
- Bustamante G. J. J. 2004. Estrategias de alimentación para la ganadería bovina en Nayarit. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Pacífico Centro. Folleto para Productores Núm. 1 Div.
- Byers F. M. & Schelling G. T. 1988. Los lípidos en la nutrición de los rumiantes. En: *El rumiante. Fisiología digestiva y nutrición*. DC Church. Acribia. Zaragoza, España. 339-356.
- Cabrera C. J. L., Jaramillo J. C., Dután T. F., Cun C. J., García P. A. y Rojas de Astudillo L. 2017. Variación del contenido de alcaloides, fenoles, flavonoides y taninos en *Moringa oleífera* Lam. En función de su edad y altura. *Bioagro* 29(1): 53-60.
- Cai S., J. Li, F. H. Ze, K. Zhang, Y. Luo, B. Janto, R. Boissy, G. Ehrlich, and X. Dong. 2010. *Cellulosilyticum ruminicola*, a newly described rumen bacterium that possesses redundant fibrolytic-protein-encoding genes and degrades lignocellulose with multiple carbohydrate-borne fibrolytic enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 3818-3824.
- Carmona A. 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., Bolívar D. M. y Giraldo L. A. 2005. El gas metano en la producción ganadera y alternativas para medir sus emisiones y aminorar su impacto a nivel ambiental y productivo. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 18(1): 49-63.
- Carro M. D., Saro C., Mateos I., Díaz A. y Ranilla M. J. 2017. Perspectivas y retos de los extractos vegetales como aditivos alimentarios en rumiantes. *Artículos nutrición ALBEITAR PV*. 51.
- Casas R. S. 2018. *Saccharomyces cerevisiae* y *Aspergillus oryzae*: estimuladores y modificadores de la fermentación y crecimiento microbiano ruminal. *Revista Producción animal*. 30(2): 1-9.
- Chalupa W., Clark J., Opliger P. y Lavker R. 1970. Ammonia metabolism in rumen bacteria and mucosa from sheep fed soy protein or urea. *J. Nutr.* 100: 161-169.

- Cheng K. J., Forsberg C. W., Minato H. y Costerton J. W. 1991. Microbial ecology and physiology of feed degradation within the rumen. Pag. 595-623 in: Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants. T. Tsuda, Y. Sasaki y R. Kawashima. Eds. Academic Press. London.
- Chesson A. & Forsbers C. W. 1988. Polysaccharide degradation by rumen microorganisms. Pag. 251-284 in: The rumen microbial ecosystem. P N Hobson Ed. Elsevier, NY.
- Chongo B., La O O., Delgado D., Scull I., Santos Y. y Galindo J. 1998. Polifenoles totales y degradación ruminal in situ del nitrógeno en árboles forrajeros promisorios para la alimentación del ganado. III Taller Internacional Silvopastoril: Los árboles y arbustos en la ganadería. Estación Experimental de Pastos y Forrajes Indio Hatuey, Matanzas, Cuba. p. 11.
- Cirio A. T. I. 1998. Fisiología Metabólica de los Rumiantes. Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Montevideo. Bolsa del libro.
- Clemens J. & H. J. Ahlgrimm. 2001. Greenhouse gases from animal husbandry: Mitigation options. Nutr. Cycl. Agroecosys. 60: 287.
- Cobos P. M. A. & Yokoyama T. 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.
- Cobos P. M. A. 1996. Microbiología aplicada a producción de rumiantes. Memoria del curso internacional avanzado de nutrición de rumiantes. Universidad Autónoma Metropolitana. Xochimilco, México. pp. 1-16.
- Cobos P. M. A., Curzaynz L. K. R., Rivas M. M. I., Santillan G. E. A. y Barcena J. R. 2018. Efecto *in vitro* de dietas para corderos más un suplemento de granos secos de destilería en la fermentación ruminal y emisiones de gases. Agrociencia. 52(2): 203-215.
- Contreras P. A., M. Noro. 2010. Rumen: morfología, trastornos y modulación de la actividad fermentativa. 3 ed. Valdivia: América. 135p.
- Cordoví E., Ray J. V., Otilia, Tamele, Nhantumbo S. y Chimbambala A. 2013. Caracterización de especies arbóreas y arbustivas forrajeras en clima semiárido del sur de Mozambique. Pastos y Forrajes 36(4): 434-439.
- Cotta M. A. & Hespell R. B. 1986. Protein and amino acid metabolism of rumen bacteria. Pag 121-136 in: Control of digestion and metabolism in ruminants. L. P. Milligan, W. L. Grovum y A. Dobson. Eds. Prentice-Hall. Englewood Cliffs, New Jersey.
- Cuartas C. C. A., Naranjo R. J. F., Tarazona M. A. M., Barahona R. R., Rivera H. J. E., Arenas S. F. A. y Correa L. G. A. 2015 Valor nutritivo y cinética de fermentación *in vitro* de mezclas forrajeras utilizadas en sistemas silvopastoriles intensivos. Zootecnia Trop. 33 (4): 295-306.

- De Luca L. J. 2002. Urea: Su Utilización en Rumiantes; Sitio Argentino de Producción Animal.
- Delgado D. La OO, Congo B, Galindo J, Obregón Y. y Aldama A. 2001. Cinética de la degradación ruminal *in situ* de cuatro árboles forrajeros tropicales; *leucaena leucocephala*, *Enterolobium cyclocarpum*, *Sapindus saponaria*, *Gliricidia sepium*. Revista Cubana de Ciencias Agrícola 35: 141-145.
- Demeyer D. L. & V. Fievez. 2000. Ruminants et environnement: la methanogenese. Ann. Zootech. 49: 95-102.
- Dijkstra J. 1994. Simulation of the dynamics of protozoa in the rumen. Br. J. Nutr. 72:679.
- Dohme F., Machmüller A., Wasserfallen A. y Kreuzer M. 2000. Comparative efficiency of various fats rich in medium-chain fatty acids to suppress ruminal methanogenesis as measured with RUSITEC. Canadian Journal of Animal Science 80: 473-482.
- Dong Y., Bae H., Mcallister T., Mathison G., Cheng K. 1997. Lipid-induced depression in methane production and digestibility in the artificial rumen system (RUSITEC). Journal of Animal Science 77: 269-278.
- Erfle J. D., Sauer F. D. y Mahadevan S. 1977. Effect of ammonia concentration on activity of enzymes of ammonia assimilation and on synthesis of amino acids by mixed rumen bacteria in continuous culture. J. Dairy Sci. 60: 1064-1072.
- Erwin E. S., Marco G. J. y Emery E. M. 1961. Volatile fatty acid analysis of blood and rumen fluid by gas chromatography. Journal Dairy Science 44: 1768.
- Fahey G. C. & Berger L. L. 1988. Los carbohidratos en la nutrición de los rumiantes. Pp. 305-337 In: C.D. Church (ed.), El Rumiante: Fisiología Digestiva y Nutrición. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España.
- Fondevila M. & Dehority B. A. 1994. Degradation and utilization of forage hemicellulose by rumen bacteria, singly, in co-culture or added sequentially. J. Appl. Bacteriol. 77: 541-548.
- Fonty G. & Joblin K. N. 1991. Rumen anaerobic fungi: Their role and interactions with other rumen microorganisms in relation to fiber digestion. Pag. 655-679 in: Physiological aspects of digestion and metabolism in ruminants. T. Tsuda, Y. Sasaki y R. Kawashima. Eds. Academic Press, Inc. San Diego, CA.
- Forsberg C. W., Lovelock L. A., Krumholz L. y Buchanan S. J. G. 1984. Protease activities of rumen protozoa. Appl. Env. Microbiol. 121: 105-119.
- Francis G., Z. Kerem, P. Harinder, S. Makkar, y K. Becker. 2002. The biological action of saponins in animal systems: a review. British Journal of Nutrition. 88: 587- 605.
- Galindo J. 1988. Efecto de la zeolita en la población de bacterias celulolíticas y su actividad en el rumen de animales que consumen ensilaje. Tesis de Doctorado. Instituto de Ciencia Animal, La Habana, Cuba.

- Galindo J., García C.; Marrero Yoandra; Castillo E.; Aldana Ana I.; Torres Verena; Sarduy Lucía. 2007. Efecto de la composición del pastizal de *Leucaena leucocephala* con gramíneas en la población microbiana ruminal de toros. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, vol. 41, núm. 2, 2007, pp. 145-148.
- Galindo J., González N., Delgado D., Sosa A., Marrero Y., González R., Aldana A. I. y Moreira O. 2008. Efecto modulador de *Leucaena leucocephala* sobre la microbiota ruminal. *Zootecnia Tropical*. 26(3): 249-252.
- Galindo J., González N., Marrero Y., Sosa A., Ruiz T., Febles G., Torres V., Aldana A. I., Achang G., Moreira O., Sarduy L. y Noda A. C. 2014. Efecto del follaje de plantas tropicales en el control de la producción de metano y la población de protozoos ruminales *in vitro*. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 48(4): 359-364.
- Galindo J., Y. Marrero, N. Gonzalez y 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*. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 37(4): 395-401.
- Galindo, J., Scull, I., Marrero, Y., Aldana, A.I. & Moreira, O. 2006. Efecto de los metabolitos secundarios de los vegetales en la población de protozoos del rumen. Informe Final de Proyecto CITMA-GEPROP. Instituto de Ciencia Animal, La Habana, Cuba.
- Galindo, Juana; González, Niurca; Abdalla, A. L.; Alberto, Mariem; Lucas, R. C.; Dos Santos, K. C.; Santos, M. Regina; Louvandini, P.; Moreira, O. y Sarduy, Lucía. 2016. Effect of a raw saponins extract on ruminal microbial population and *in vitro* methane production with star grass (*Cynodon nlemfuensis*) substrate. *Cuban J. Agric. Sci.* 50(1):77-88.
- Galindo-Blanco Juana L., Idalmis Rodríguez-García, Niurca González-Ybarra, Roberto GarcíaLópez y Magaly Herrera-Villafranca. 2018. Ecosistema con *Leucaena leucocephala*: su efecto en la población microbiana ruminal en toros en ceba. *Pastos y Forrajes*, 41(2): 138-144.
- García D. E., Medina M. G., Cova L. J., Torres A., Soca M., Pizzani P., Baldizán A., Domínguez C. E. 2008. Preferencia de vacunos por el follaje de doce especies con potencial para sistemas agrosilvopastoriles en el Estado Trujillo, Venezuela. *Pastos y Forrajes* 31(3): 255-270.
- García D. E., Medina M. G., Domínguez C., Baldizán A., Humbría J. y Cova L. 2006. Evaluación química de especies no leguminosas con potencial forrajero en el estado Trujillo, Venezuela. *Zootecnia Tropical*. 24(4): 401-415.
- Gaviria X., Naranjo J. F. y Barahona R. 2015. Cinética de fermentación *in vitro* de *Leucaena leucocephala* y *Megathyrsus maximus* y sus mezclas, con o sin suplementación energética. *Pastos y Forrajes*. 38(1) pp. 55-63.
- Gidlund H., Hetta M., Krizsan S. J., Lemosquet S. y Huhtanen P. 2015. Effects of soybean meal or canola meal on milk production and methane emissions in

- lactating dairy cows fed grass silage-based diets. *J Anim Sci.* 98(11):8093-8106.
- Gilbert R. A., Kelly W. J., Altermann E., Leahy S. C., Minchin C., Ouwerkerk D. and Klieve A. V. 2017. Toward Understanding Phage:Host Interactions in the Rumen; Complete Genome Sequences of Lytic Phages Infecting Rumen Bacteria. *Front. Microbiol.* 8:2340.
- Guerra A. N. & Lagos L. J. 2014. Análisis de la composición bromatológica de pastos y formulación de dietas para la producción de leche en el trópico. Proyecto especial para obtener grado de Licenciatura. Escuela agrícola panamericana. Zamorano Honduras.
- Gutiérrez G. D., Borja R. E., Rodríguez H. R. Rodríguez Z., Stuart R. y Sarduy L. 2015. Evaluación de la composición química y degradabilidad ruminal *in situ* de ensilaje mixto con *Pennisetum purpureum* cv Cuba CT-169: *Moringa oleifera*. *Avances en Investigación Agropecuaria.* 19(3): 7-16.
- Gutiérrez G. D., González G. N. N., Elías I. A., García L. R. y Tuero M. O. R. 2018. Efecto de diferentes proporciones de *Moringa oleifera*: *Cenchrus purpureus* sobre el consumo voluntario y el balance de nitrógeno. *Pastos y Forrajes.* 41(3): 227-232.
- Harrigan W. F. & McCance E. M. 1979. Métodos de laboratorio en Microbiología de alimentos y productos lácteos. Ed. Academia. León, España. 361- 366 pp.
- Henderson C., Stewart C.S. y Nekrep F. V. 1981. The effect of monensin on pure and mixed cultures of rumen bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 51: 159-169.
- Hernández E. M. R., Pinto R. R., Ley de Coss A., Raj A. D., Hernández S. D., Jiménez J. A. y Gómez C. H. 2017. Producción de gases efecto invernadero de dietas para bovinos con especies arbóreas con alto contenido de metabolitos secundarios. XLIV Reunión científica AMPA, Clima y ganadería: Productividad sustentable.
- Hernández M. J., Sánchez S. P., Torres S. N., Herrera P. J., Rojas G. A. R., Reyes V. I. y Mendoza N. M. A. 2018. Composición química y degradaciones *in vitro* de vainas y hojas de leguminosas arbóreas del trópico seco de México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias.* 9(1).
- Ho Y. W., Abdullah N. y Jalaludin S. 1988. Penetrating structures of anaerobic rumen fungi in cattle and swamp buffalo. *J. Gen. Microbiol.* 134: 177-181.
- Hoover W. H. & Stokes S. 1991. Balancing carbohydrates and proteins for optimum rumen microbial yield. *J. Dairy Sci.* 74:3630.
- Hoover W. H. 1986. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. *J. Dairy Sci.* 69: 2755-2766.
- Hungate R. E. 1966. The rumen and its microbes. Academic Press, N. Y. 533pp.
- Izaguirre F. F. & Martínez T. J. J. 2008. El uso de árboles multipropósito como alternativa para la producción animal sostenible. *Tecnología en Marcha* 21(1): 28-40.

- Joblin K.N. 2004. Methanogenic Archaea. I Planning Meeting of Project Contract Research and Training Workshop "Development and Use of Rumen Molecular Techniques for Predicting and Enhancing Productivity. Brisbane, Australia 19-30.
- Johnson K. A. & Johnson D. E. 1995. Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science* 73: 2483-2492.
- Joklik W.K. 1997. Naturaleza, aislamiento y cuantificación de virus animales. In: Joklik, W. K., Willet, H. P., Amos, D. B., y Wilfert, C. M. (Eds). *Microbiología de Zinsser*. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. Pp. 997- 1042.
- Kamra D. N. 2005. Rumen microbial ecosystem. *Current Science*. 89(1): 124-135.
- Kamra D. N., N. Agarwal y L. C. Chaudhary. 2006. Inhibition of ruminal methanogenesis by tropical plants containing secondary compounds. *International Congress Series* 1293: 156-163.
- Kinsman R., F.D. Sauer, H.A. Jackson y M.S. Wolynetz. 1995. Methane and carbon dioxide emissions from dairy cows in full lactation monitored over a six-month period. *J. Dairy Sci.* 78(12): 2760 - 2766.
- Kleiner D. & Fitzke E. 1979. Evidence of ammonia translocation by *Clostridium pasteurianum*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 96: 211-217.
- Klieve A. V. & Swain R. A. 1993. Estimation of Ruminant Bacteriophage Numbers by Pulsed Field Gel Electrophoresis and Laser Densitometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2299-2303.
- Kriszan S. J., Jančík F., Ramin M. y Huhtanen P. 2013. Comparison of some aspects of the in situ and in vitro methods in evaluation of NDF digestion. *J. Anim. Sci.* 91(2): 838-847.
- Ku V. J. C., Briceño E. G., A. Ruiz, R. Mayo, A. J. Ayala, C. F. Aguilar, F. J. Solorio y L. Ramírez. 2014. Manipulación del metabolismo energético de los rumiantes en los trópicos: opciones para mejorar la producción y la calidad de la carne y leche. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 48(1): 43-53.
- Kumar S., Puniya A. K., Puniya M., Dagar S. S., Sirohi S. K., Singh K., Griffith G. W. 2009. Factor affecting rumen methanogens and methane mitigation strategies. *World J. Microbiol Biotechnol.* 25: 1557-1566.
- Lana R. P., Russell J. B. y Van Amburgh M. E. 1998. The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production. *Journal of Animal Science* 76: 2190-2196.
- Ley de Coss A., Cobos P. M. A., Aguirre M. J. F., Marroquin A. F. J., Lerma M. J. N., Posadas C. S. y Cerda O. M. 2015. Los virus bacteriófagos en la industria ganadera bovina. *AP Agro Productividad*. 51-58.
- Ley de Coss A., Guerra M. C., Montañez V. O., Guevara F., Pinto R. y Reyes G. J. 2018. Producción *in vitro* de gas metano por gramíneas forrajeras tropicales. *Rev. MVZ Córdoba* 23(3):6788-6798.

- Livas C. F. 2015. Estrategias de Alimentación para Ganado Bovino en las Regiones Tropicales. Revista BM Editores.
- López Y., Arece J., León E. y Aróstica N. 2011. Comportamiento productivo de reproductoras ovinas en un sistema silvopastoril. Pastos y Forrajes. 34(1) pp. 87-96.
- Luna C. L. M. & González E. A. R. 2017. Metabolitos secundarios y actividad antibacteriana de *Guazuma ulmifolia* Lam. (Cuaulote) en dos etapas fenológicas. LACANDONIA, Revista de ciencias de la UNICACH 1(1): 37-44.
- Madera S. N. B., Bacab P. H. M. y Ortiz de la R. B. 2013. Ganancia diaria de peso en ovinos por inclusión de una planta leguminosa (*Leucaena leucocephala*) en dietas basadas en pasto clon Cuba CT-115 (*Pennisetum purpureum*). Bioagrocencias. 6(1): 26-31.
- Madigan M. T., Martiniko J. M. y Parker J. 2002. Biología de los microorganismos. Editorial Pearson Prentice Hall. Octava edición. Madrid, España. 986p.
- Marinidou E. & Jiménez F. G. 2010. Paquete tecnológico Sistemas silvopastoriles uso de árboles en potreros de Chiapas. Primera Edición. México.
- Márquez L. D. & Suarez L. A. 2008. El uso de taninos condensados como alternativa nutricional y sanitaria en rumiantes. Revista de Medicina Veterinaria. 16
- Martin C., Morgavi D. P. y Doreau M. 2009. Methane mitigation in ruminants: from microbes to the farm scale. Animal 4(3): 351-365.
- Martínez F. S., González G. J., Culebras J. M. y Tuñón M. J. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Nutrición Hospitalaria 17(6): 271-278.
- Martínez M. A. L., Pérez H. M., Pérez A. L. y Gómez C. G. 2010. Digestión de los Lípidos en los Rumiantes. Interciencia 35(4): 240-246.
- Maya M. G. E., Durán C. C. V. y Ararat J. E. 2005. Valor nutritivo del pasto estrella solo y en asociación con *Leucaena* a diferentes edades de corte durante el año. Acta Agronomica. 54(4):41-46.
- Mayorga O., E. Angarita, R. Zambrano, J. Cardozo, y S. Ospina. 2014. Emisión de metano entérico en novillos cebú con y sin la inclusión de dietas de *Guazuma ulmifolia* sobre dietas de *Panicum maximum* en el Caribe Seco Colombiano. In: M. Alfaro *et al.*, editores, Primera conferencia de gases de efecto invernadero en sistemas agropecuarios de Latinoamérica (GALA). Serie de Actas N° 54. INIA, Osorno, CHI. p. 25-31.
- Mayren M. F. J., Rojas G. A. R., Maldonado P. M. A., Ramírez R. O., Herrera P. J., Torres S. N., Sánchez S. P., Bottini L. M. B. y Hernández G. A. 2018. Comportamiento productivo de ovinos pelibuey en pastoreo suplementados con follaje de *Guazuma ulmifolia* Lam. Agroproductividad. 11(5) pp: 29-33.
- McAllister T. A., Bae H. D., Jones G. A. & Cheng K. J. 1994. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. Journal Animal Science 72: 3004-3018.

- McAllister T. A., Okine E. K., Mathison G. W. y Cheng K. J.. 1996. Dietary, environmental and microbiological aspects of methane production in ruminants. *Can. J. Anim. Sci.* 76: 23.
- McAllister T. A., Phillippe R. C., Rode L. M. y Cheng K. J. 1993. Effect of the protein matrix on the digestión of cereal grains by ruminal microorganisms. *J. Anim. Sci.* 71: 205-212.
- McSweeney C. S., Palmer B., McNeill D. M. y Krause D. O. 2001. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Animal Feed Science and Technology.* 91: 83-93.
- Mellenberger R. W., Satter L. D., Millett L. A. y Baker A. J. 1970. An *in vitro* technique for estimating digestibility of treated and untreated wood. *Journal Animal Science* 30(6): 1005-1011.
- Miron J., Ben-Ghedalia D. y Morrison M. 2001. *Invited Review: Adhesion Mechanisms of Rumen Cellulolytic Bacteria.* *J. Dairy Sci.* 84: 1294-1309.
- Mojica R. J. E., Casto R. E., Carulla F. J. y Lascano A. C. E. 2017. Efecto de la especie y la edad de rebrote en el perfil de ácidos grasos de leguminosas y arbustivas tropicales. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria.* 18(3): 463-477.
- Molina B. I. C., Cantet J. M., Montoya S., Correa L. G. A. y Barahona R. R. 2013. Producción de metano *in vitro* de dos gramíneas tropicales solas y mezcladas con *Leucaena leucocephala* o *Gliricidia sepium*. *Rev CES Medicina Veterinaria y Zootecnia.* 8(2): 15-31.
- Morvan B., F. Bonnemoy, G. Fonty, y P. Gouet. 1996. Quantitative determination of H<sub>2</sub>-utilizing acetogenic and sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea from digestive tract of different mammals. *Curr.Microbiol.* 32: 129-133.
- Moss A. R., Jouany J. P. y Newbold J. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. INRA, EDP Sciences. *Annales de Zootechnie.* 49: 231-253.
- Murgueitio E. & Calle Z. 2011. Guácimo, una alternativa. *Agro Meat.* Buenos Aires Centro, Argentina.
- Newbold C. J., de la Fuente G., Belanche A., Ramos M. E. and McEwan N. R. 2015. The Role of Ciliate Protozoa in the Rumen. *Front. Microbiol.* 6:1313.
- Obispo N. 1992. Los hongos anaeróbicos del rumen. Revisión bibliográfica. *Zootecnia Tropical* 10(1): 91-107.
- Ørskov E. R. 1992. *Protein Nutrition in Ruminants.* 2nd Edition. Academic Press. New York, EUA.
- Owens F. N. & A. L. Goetsch. 1988. Fermentación ruminal. Pp. 159-189 In: *El Rumiante: Fisiología Digestiva y Nutrición.* C.D. Church (ed.), Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España.

- Owens F. N. & Zinn R. 1988. Metabolismo de la proteína en los ruminantes. Pag. 255-282 in: El Rumiante: Fisiología Digestiva y Nutrición. C.D. Church (ed.), Editorial Acribia. Zaragoza, España.
- Patra A. K. & Saxena J. 2009. A review of the effect and mode of action of saponins on microbial population and fermentation in the rumen and ruminant production. *Nutrition Research Reviews*. 22: 204-219.
- Patra A. K. & Saxena J. 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry* 71: 1198-1222.
- Patra A. K. & Saxena J. 2011. Exploitation of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 91: 24-37.
- Pechin G. H. 1999. Metabolismo ruminal de los hidratos de carbono y los lípidos. ANUARIO de la Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad nacional de la Pampa. Provincia de la Pampa, Republica de Argentina.
- Pérez A., Sánchez T., Armengol N. y Reyes F. 2010. Características y potencialidades de *Moringa oleifera*, Lamark. Una alternativa para la alimentación animal. *Pastos y Forrajes* 33(4).
- Pérez C. K., Fonseca F. N., Vázquez A. J., Rojas G. N., Botello L. A., Zambrano C. N. G., Jines F. F. H., Ramírez de la R. J. L. y Chacón M. E. 2017. Respuesta productiva de la oveja Pelibuey en el período de lactancia alimentada con *Leucaena leucocephala*. *Revista Electrónica de Veterinaria*. 18(6) pp. 1-8.
- Pérez J. P., Alarcón B. Z., Mendoza G. D. M., Barcena R. G., Hernández A. G. y Herrera J. G. H. 2001. Efecto de un banco de proteína de kudzu en la ganancia de peso de toretes en pastoreo de estrella africana. *Técnica Pecuaria en México* 39(1): 39-52.
- Pérez S. M. 2006. Comportamiento productivo y microbiológico de borregos alimentados con polietilentereftalato como fuente de fibra. Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados.
- Petit J., Uribe G., Casanova F., Solorio F. y Ramírez L. 2011. Composición química y rendimiento de forraje de *Leucaena leucocephala*, *Guazuma ulmifolia* y *Moringa oleifera* asociadas y en monocultivo en Yucatán, México. *Revista Forestal Latinoamericana*. 26 (2): 35-65.
- Pinos R. J. M. & González M. S. S. 2000. Efectos biológicos y productivos de los ionóforos en rumiantes. 25(8): 379-385.
- Pinto R. R., Hernández S. D., Ramírez A. L., Sandoval C. C. A., Cobos P. M., y Gómez C. H. 2009. Taninos y fenoles en la fermentación *in vitro* de leñosas forrajeras tropicales. *Agronomía mesoamericana* 20(1): 81-89.
- Posada O. S. L., Ramírez A. J. F. y Rosero N. R. 2014. Producción de metano y digestibilidad de mezclas kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) - papa (*Solanum tuberosum*). *Agronomía Mesoamericana*. 25(1): 141-150.

- Posada S. L. & R. R. Noguera. 2005. *In vitro* gas production technique: A tool for evaluation of ruminant feeds. *Livest. Res. Rural Dev.* 17:
- Posada S. L., Montoya G. y Ceballos A. 2005. Caracterización de los taninos en la nutrición de rumiantes. En: Pabón M. y Ossa J. (eds). *Bioquímica, nutrición y alimentación de la vaca*. Medellín: Biogénesis. p. 161-180.
- Prieto M. E., Vargas S. J. E., Angulo A. J. y Mahecha L. L. 2016. Ácidos grasos, fermentación ruminal y producción de metano, de forrajes de silvopasturas intensivas con *Leucaena*. *Agronomía Mesoamericana* 27(2): 337-352.
- Ramírez J. F., Posada O. S. y Noguera R. 2014. Metanogénesis ruminal y estrategias para su mitigación. *Rev CES Med Zootec.* 9(2): 307-323.
- Ramírez R., Pizzani P., De Martino G., García D., Linares Z., Colmenares O. y Domínguez C. 2012. Estimación *in vitro* de gases con efecto invernadero en frutos y follaje de árboles de un bosque seco tropical de Venezuela. *Pastos y Forrajes.* 35(1): 99-108.
- Relling A. E. & Mattioli G. A. 2003. Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes. Cátedra de Fisiología Facultad de Ciencias Veterinarias U.N.L.P. Esta obra corresponde a una actualización de los autores del libro "Fisiología Digestiva y Metabólica de los Rumiantes" de Editorial EDULP (Ediciones 2002 y 2003).
- Reyes A. D., Galindo B. J. L., Bocourt S. R., Laurencio S. M. y Pérez Q. M. 2008. Los microorganismos del rumen y su papel en la fisiología digestiva del rumiante. Consultado el 13 de octubre de 2017. <http://monografias.umcc.cu/monos/2008/Agronomia/m082.pdf>
- Ribeiro L. G., Machado F. S., Campos M. M., Guimaraes R., Tomich T. R., Reis L. G. y Coombs C. 2015. Estrategias de mitigación de metano entérico en rumiantes: revisión de literatura. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 28(2): 124-143.
- Rodríguez A. A., Riquelme E. O. y Randel P. F. 1998. Inclusión de leguminosas forrajeras en dietas basadas en gramíneas tropicales. I. Composición química y degradación *in vitro*. *J. Agríc. Univ. P. R.* 82(1-2):25-38.
- Rodríguez C. A. A., Valencia C. E., Cruz A. L., Vázquez O. M., Rivera M. F., Rodríguez S. W. y Santos V. A. 2008. Microbiología Ruminal. Universidad de Puerto Rico 3(1).
- Rodríguez J. A. 2009. Aislamiento y caracterización *in vitro* de una bacteria acetogénica ruminal. Tesis de maestría. Colegio de postgraduados.
- Rodríguez R., González N., Alonso J., Domínguez M. y Sarduy L. 2014. Valor nutritivo de harinas de follaje de cuatro especies arbóreas tropicales para rumiantes. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola.* 48(4): 371-378.
- Rodríguez R., Sosa A. y Rodríguez Y. 2007. La síntesis de proteína microbiana en el rumen y su importancia para los rumiantes. *Revista cubana de ciencia agrícola* 41(4): 303-311.

- Román P. H. 1981. Potencial de producción de los bovinos en el trópico de México. Instituto nacional de investigaciones pecuarias. Sarh. Centro Experimental Pecuario. Paso del Toro. Veracruz, México. Ciencia veterinaria, 3. Pp. 394-430
- Rotger C. A. 2006. Fermentación ruminal, degradación proteica y sincronización energía-proteína en terneras en cebo intensivo. Tesis de Doctorado en Producción Animal. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona, España.
- Russell J. B. & Strobel H. J. 1987. Concentration of ammonia across cell membranes of mixed rumen bacteria. J. Dairy Sci. 70:970-976.
- Russell J. B. 1985. Fermentation of cellodextrins by cellulolytic and non-cellulolytic rumen bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 49:572-579.
- Sánchez H. L., Lizarraga S., y Castro C. A. S. 2001. Evaluación agronómica de especies arbóreas para la producción de forrajes en la Península de Yucatán. Centro de Investigación Agrícola Tropical, Santa Cruz Bolivia. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán.
- Sánchez J. & Soto H. 1999. Calidad nutricional de los forrajes de una zona con niveles medios de producción de leche, en el trópico húmedo del norte de Costa Rica. Agronomía costarricense 23(2): 165-171.
- Sánchez S. P. & Cobos P. M. A. 2016. Producción *in vitro* de ácidos grasos volátiles de bacterias celulolíticas reactivadas y bacterias ruminales totales en sustratos celulósicos. Agrociencia. 50(5): 565-574.
- Sandoval G. L., Miranda R. L. A., Lara B. A., Huerta B. M., Uribe G. M., y Martínez M. M. 2016. Fermentación *in vitro* y la correlación del contenido nutricional de *Leucaena* asociada con pasto estrella. Revista mexicana de ciencias agrícolas. 16: 3185-3196.
- Santos A. L., H. Jiménez y A. Cano. 2005. Efecto *in vitro* de extractos ricos en saponinas de *Pithecellobium saman* y *Sapindus saponaria* sobre el crecimiento de dos bacterias celulolíticas ruminales. Revista Corpoica. 6(1): 20-25.
- SAS Institute. 2010. SAS education analytical suite for using Windows release 9.2.
- Schelling G. T. 1984. Monensin mode of action in the rumen. J. Anim. Sci. 58: 1518-1527.
- Serrano A. V., Silva S. M. M., Cano G. M. A., Medina G. G., y Ruiz C. A. 2005. Estadísticas climatológicas básicas del estado de Oaxaca (periodo 1961-2003). INIFAP. SAGARPA. Libro técnico No. 4. Oaxaca, México, 272 pp.
- Smith A. H., Zoetendal E. y Mackie R. I. 2005. Bacterial mechanisms to overcome inhibitory effects of dietary tannins. Microbial Ecology. 50: 197-205.
- Smith D. G. 1975. Inhibition of searoming in *Proteus* spp. By tannic acid. Journal of Applied Bacteriology. 38: 29-32.
- Sosa A., Galindo J., Aldana A. I., Moreira O. y González N. 2010. Efecto de *Aspergillus oryzae* en las poblaciones microbianas del rumen y en los

- productos finales de la fermentación de *Pennisetum purpureum* vc. Cuba CT-115. Revista Cubana de Ciencia Agrícola. 44(4): 365-371.
- Sosa A., J. Galindo y R. Bocourt. 2007. Metanogénesis ruminal: aspectos generales y manipulación para su control. Revista Cubana de Ciencia Agrícola. 41(2): 105-114.
- Sosa R. E. E., Pérez R. D., Ortega R. L. y Zapata B. G. 2004. Evaluación del potencial forrajero de árboles y arbustos tropicales para la alimentación de ovinos. Técnica Pecuaria en México 42(2): 129-144.
- Steel R. G. D. & Torrie J. H. 1988. Bioestadística: principios. McGraw Hill. México. 622 p.
- Stewart C. S., Flint H. J. y Bryant M. P. 1997. The rumen bacteria. In: The rumen Microbial Ecosystem. P. N. Hobson y C. S. Stewart (Eds.) Chapman and Hall, London.
- Thauer K. R. 1988. Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. SGM Microbiol. 144: 2377-2406.
- Van Lier E. & Regueiro M. 2008. Digestión en retículo-rumen. Departamento de producción animal y pasturas. Curso de anatomía y fisiología animal. Universidad de la Republica, Facultad de Agronomía. Montevideo, Uruguay.
- Van Soest P. J. 1982. Nutritional Ecology of the Rumen. Comstoc publishing Ass. Cornell University Press. 160-169 p.
- Van Soest P. J. 1994. Ecología nutricional del rumiante. 2da Edición, Cornell University Press, Ithaca, 476 p.
- Van Soest P. J., J. B. Robertson y B. A. Lewis. 1991 Methods for dietary fiber, neutral detergents fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. Dairy Sci. 74: 3583-3597.
- Velázquez Z. M., Peón E. I. E., Zepeda B. R. y Jiménez A. M. A. 2016. Moringa (*Moringa oleifera* Lam.): potential uses in agriculture, industry and medicine. Revista Chapingo serie horticultura 22(2): 95-116.
- Vélez T. M., Campos G. R. y Sánchez G. H. 2015. Propiedades antimetanogénicas *in vitro* de algunas plantas adaptadas a las condiciones de sabana inundable del departamento de Arauca, Colombia. Tropical and Subtropical Agroecosystems 18(3): 335-345.
- Vélez T. M., Campos G. R., Sánchez G. H. 2014. Uso de metabolitos secundarios de las plantas para reducir la metanogénesis ruminal. Tropical and Subtropical Agroecosystems 17(3): 489-499.
- Verdecía D. M., Herrera H., Ramírez J. L., Leonard I., Álvarez Y., Bazán Y., Arceo, Y., Bodas R., Andrés S., Álvarez J., Giráldez F. y López S. 2012. Valor nutritivo de *Leucaena leucocephala*, con énfasis en el contenido de metabolitos secundarios. Revista Electrónica de Veterinaria 13(11): 1-10.

- Villalobos L. & Arce J. 2014. Evaluación agronómica y nutricional del pasto estrella africana (*Cynodon nlemfuensis*) En la zona de Monteverde, Puntarenas, Costa Rica. II. valor nutricional. *Agronomía Costarricense* 38(1): 133-145.
- Wallace R. J. & Cotta M. A. 1988. Metabolism of nitrogen-containing compounds Pag. 217-250 in: *The rumen microbial ecosystem*. P. N. Hobson, Ed. Elsevier Applied Science, NY.
- Wallace R. J. & McPherson C. A. 1987. Factors affecting the rate of break down of bacterial protein in the rumen fluid. *Br. J. Nutr.* 58: 313-323.
- Wallace R. J. 1991. Rumen proteolysis and its control. Pag. 131-150 in: *Rumen microbial metabolism and ruminant digestion*. J. P. Jouany, Ed. INRA editions, Paris.
- Weimer P. J. 1998. Manipulating ruminal fermentation: a microbial ecological perspective. *Journal of Animal Science*. 76: 3114-3122.
- Wencomo H. B. 2008. Evaluación morfoagronómica e isoenzimática y selección de accesiones de *Leucaena* spp. Con fines silvopastoriles. Tesis. Dr. C. Agrícola. Estación experimental de pastos y forrajes. Indio Hatuey, Cuba. 106 pp.
- Whitford M. F., Teather R. M. y Foster R. J. 2001. Phylogenetic analysis of methanogens from de bovine rumen. *Biomedicalcentral microbiology* 1-5.
- Williams A. G. & Coleman G. S. 1992. *The rumen protozoa*. New York. Springer-Verlag.
- Wolin M. J., T. L. Miller y C. S. Stewart. 1997. Microbe- microbe interactions. Pp: 467-491 *In: Hobson, P. N., C. S Stewart. (Eds). The rumen microbial ecosystem*. Eds. P. N. Hobson and Stewart. Blackie Academic and Professional. London.
- 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.
- Zapata S. R. & Polanco E. D. 2010. Estructuras de los protozoos ciliados ruminales relevantes para la caracterización morfológica. *Hechos Microbiol.* 1(2): 67-69.
- Zhou Y. Y.; Mao, H. L.; Jiang, F.; Wang, J. K.; Liu, J. X. & McSweeney, C. S. 2011. Inhibition of rumen methanogenesis by tea saponins with reference to fermentation pattern and microbial communities in Hu sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166-167:93-100.