

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



Efecto de la inclusión de ácido maleico para reducir metano *in vitro*

POR

ELVIA VILLANUEVA PARRA

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA

OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

NOVIEMBRE, 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONO NARRO

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

Efecto de la inclusión de ácido maleico para reducir metano *in vitro*

POR

ELVIA VILLANUEVA PARRA

TESIS

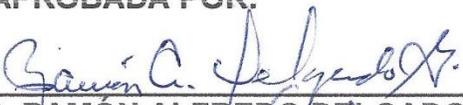
QUE SE SOMETE A LA CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO EXAMINADOR

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

APROBADA POR:

ASESOR PRINCIPAL:


DR. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ

ASESOR:


DRA. LETICIA ROMANA GAYTÁN ALEMÁN

ASESOR:


M.C. JOSÉ LUIS COVARRUBIAS CASTRO

ASESOR:


DR. GERMÁN BUENDÍA RODRÍGUEZ
(DIRECTO DEL PROYECTO)


DR. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ

COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL


Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal

TORREÓN, COAHUILA. MÉXICO

NOVIEMBRE, 2017

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

Efecto de la inclusión de ácido maleico para reducir metano *in vitro*

POR

ELVIA VILLANUEVA PARA

TESIS

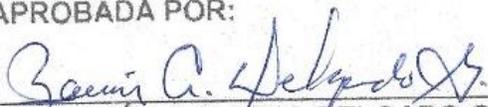
QUE SE SOMETE A LA CONSIDERACIÓN DEL COMITÉ DE ASESORÍA

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

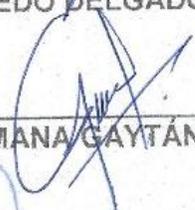
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

APROBADA POR:

ASESOR PRINCIPAL:

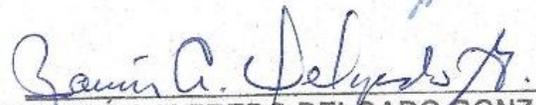

DR. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ

ASESOR:


DRA. LETICIA ROMANA GAYTÁN ALEMÁN

ASESOR:


DR. GERMÁN BUENDÍA RODRÍGUEZ
(DIRECTOR DEL PROYECTO)


DR. RAMÓN ALFREDO DELGADO GONZÁLEZ
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

TORREÓN, COAHUILA. MÉXICO


NOVIEMBRE 2017
Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal

AGRADECIMIENTOS

A Dios que a pesar de las adversidades, me ha permitido culminar una de las etapas más importantes de mi vida, tanto profesional como persona. Teniendo siempre presente los valores de honradez, responsabilidad, disciplina y constancia.

A mis padres y hermanos por tanto amor y ayuda incondicional, estuvieron siempre al tanto de mí, pese a las adversidades la comunicación nunca se acabó.

Al CENIDFyMA INIFAP por permitir y darme las herramientas necesarias para poder hacer la investigación, para la elaboración de mi tesis.

A mi director de tesis el Dr. Germán Buendía Rodríguez quién me dio la oportunidad de entrar al INIFAP y formar parte de su equipo de trabajo, por depositar su confianza en mí, quién me llevo de la mano de inicio a fin.

A mis asesores el Dr. Ramón Alfredo Delgado González y al MVZ. José Luis Covarrubias Castro, a la Dra. Leticia Gaytán Alemán y Dra. Berenice Sánchez Mendoza, quienes con sus diferentes ideas me ayudaron a formar esta “tesis”

A mis compañeros del INIFAP, Daniela, Teresa, Julio, Diego, Ángeles, Ismael, Mauricio quienes también aportaron en mi investigación y me hicieron muy amena la estancia en el instituto, los considero mis amigos.

A mi mejor amigo el MC. Faustino García Pérez, quien mucho antes que entrara a la universidad creyó en mí y hasta la fecha sigue muy pendiente de mi preparación académica.

A mis amigas María de los Ángeles Bárcenas Hernández y Brenda del Rocío Nava Joachín quienes siempre estuvieron conmigo dándome su apoyo moral e incondicional y con quienes compartí muchos momentos felices en lugares increíbles.

A mi “TERRA MATER” que con sus bases y herramientas me ayudo académicamente a prepararme en mi formación para así poder desarrollarme en el ámbito laboral e incluso poder vislumbrar un modo de vida.

DEDICATORIA

A mi preciosa madre Alicia Bárcenas Parra. Ahora comprendo todo lo que me platicabas, los consejos que siempre me diste, la seguridad que depositaste en mi persona, me preparaste para todo menos para tu partida. Siendo yo la hija más pequeña Todo tú conocimiento y experiencia como mujer y madre me lo expresaste a mí de una y otra manera. Sólo espero que en donde te encuentres, estés orgullosa de mi y sonrías por mí, todo el crédito de mi felicidad te lo llevas tú, TE AMO y te AMARÉ aún después de mi muerte.

A mis queridos HERMANOS: Reyna, Mario, Antonio, Adrián, Raquel, Sergio, Oscar, Manuel, Dalia, Daniel y Laura ustedes son la pieza clave en mi vida, siempre he tratado de ir por el camino correcto para que se sientan orgullosos de mí, así como yo me siento afortunada de formar parte de esta hermosa familia que Dios me regalo, no estamos juntos pero puedo sentir que los llevo en mi alma y mis pensamientos en cada paso que doy, todos los momentos compartidos los llevo tatuados en mi alma. Los amo bastante.

A mi mejor amiga María de los Ángeles Bárcenas Hernández, cinco años de amistad que apenas y son pocos a los que nos esperan, de verdad que es un sentimiento muy grande el que tengo hacia tu persona. En los momentos más felices y tristes de mi vida has estado presente, no sabes cuánto yo valoro eso. Tú mejor que nadie sabes que cuentas conmigo en las buenas y las malas, en las verdes y las maduras. Siempre, por y para siempre. Te quiero mucho.

RESUMEN

La ganadería es una actividad que realiza el hombre para satisfacer sus necesidades de alimentación, el consumo mundial per cápita de carne de bovino es de 6.5 kg para 2017. Se considera antropogénica al afectar el ambiente, (calentamiento global), por las emisiones de CH₄ y CO₂, producidos a partir de la fermentación anaeróbica de carbohidratos contenidos en los ingredientes, su eficiencia energética disminuye en función de sus características, por expulsión de gases (CH₄) que involucra pérdidas a través el eructo. Una estrategia para mitigar las emisiones de CH₄ es el manejo dietético-nutricional, por lo que se evaluó el efecto de ácido maleico sobre la producción de metano *in vitro* durante 72 h con porcentajes de inclusión de 0, 0.4, 0.6, 0.8, 1 % en dieta experimental de acuerdo a NRC Beet Cattle bajo un diseño experimental completamente al azar con tres repeticiones. Se determinó e hizo análisis de varianza de CH₄, concentración AGV, bacterias totales, protozoarios, pH ruminal, N-NH₃ MS, MO y se les aplicó Tukey (P<0.1) con SAS (2009). La adición de ácido maleico no disminuyó la producción de CH₄, con o sin él las demás variables fueron estadísticamente iguales. Se sugiere continuar con estas investigaciones.

Palabras clave: Gei, Rumiantes, Emisiones de metano, Ácido Maleico, Metano *in vitro*

INDICE GENERAL

	Página
AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIAS	ii
RESUMEN	iii
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
Objetivo	2
Hipótesis	2
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Cambio climático, calentamiento global, efecto invernadero y gases de efecto invernadero	3
2.1.1. Cambio climático	3
2.1.2. Calentamiento global	5
2.1.3. Efecto invernadero	6
2.1.4. Gases de efecto invernadero	9
2.2. Impacto de la agricultura y ganadería al ambiente.	12
2.2.1. Los rumiantes y su afectación al medio ambiente	14
2.3. Producción de metano en rumiantes	14
2.3.1. Ecosistema ruminal	15
2.3.2. Microorganismos metanogénicos	15
2.3.3. pH ruminal	16

2.3.4. Protozoarios	17
2.4. Aditivos en la alimentación de rumiantes	17
2.4.1. Ácidos orgánicos en la alimentación de rumiantes	18
2.4.2. Ácidos butenodioicos (ácido maleico y fumarico)	19
III. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1. lugar y tratamientos del experimento	21
3.2. Técnica de gas <i>in vitro</i>	22
3.3. Digestibilidad <i>in situ</i>	23
3.4. pH ruminal	24
3.5. Concentración de nitrógeno amoniacal (NH ₃ -N)	24
3.6. Concentración de AGV	24
3.7. Concentración de bacterias totales	25
3.8. Concentración de protozoarios	25
IV. RESULTADOS	26
V. DISCUSIÓN	32
VI. CONCLUSIONES	35
Agradecimiento	36
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

INDICE DE CUADROS

		Página
Cuadro 1	Composición química del alimento experimental.	22
Cuadro 2	Primera prueba, volúmenes de gas	26
Cuadro 3	Segunda prueba, volúmenes de gas	26
Cuadro 4	Primera prueba, producción de metano <i>in vitro</i>	26
Cuadro 5	Segunda prueba, producción de metano <i>in vitro</i>	27
Cuadro 6	Variables microbiológicas de gas <i>in vitro</i> a 72 h de incubación con líquido ruminal de bovino	27
Cuadro 7	Análisis de la digestibilidad <i>in situ</i> en bovino	30
Cuadro 8	Análisis de pH <i>in vitro</i> con líquido ruminal de bovino	30
Cuadro 9	Concentración de nitrógeno amoniacal, en líquido ruminal de bovino <i>in vitro</i>	30
Cuadro 10	Concentración de ácidos grasos volátiles, en líquido ruminal de bovino <i>in vitro</i>	31
Cuadro 11	Concentración de bacterias totales, en líquido ruminal de bovino <i>in vitro</i>	31
Cuadro 12	Concentración de protozoarios totales, en líquido ruminal de bovino <i>in vitro</i>	31

INDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Cambio observado en la temperatura en superficie, 1901-2012.	4
Figura 2	Efecto invernadero: un proceso natural y calentamiento global: un efecto de la acción humana.	6
Figura 3	Gráfica del efecto invernadero natural y aumentado por la actividad humana.	8
Figura 4	Emisiones mundiales de gases de efecto invernadero por sectores.	12
Figura 5	Primera prueba, producción acumulada de gas de fermentación de 2-72 h, de cinco tratamientos	28
Figura 6	Primera prueba, volumen fraccionado de gas de 2-72 h, de cinco tratamientos	28
Figura 7	Segunda prueba, producción acumulada de gas de fermentación de 2-72 h, de cinco tratamientos	29
Figura 8	Segunda prueba, volumen fraccionado de gas de 2-72 h, de cinco tratamientos	29

I. INTRODUCCIÓN

La ganadería contribuye a acelerar el cambio climático, principalmente, a través de las emisiones de metano (CH₄) y bióxido de carbono (CO₂); ambos producidos a partir de la fermentación anaeróbica de los carbohidratos (celulosa, almidón, sacarosa) contenidos en el alimento consumido, además de óxido nitroso (N₂O) (Ku *et al.*, 2002).

La producción de CH₄ en los últimos años ha tomado gran importancia en la producción animal debido a sus efectos negativos sobre el ambiente. En sistemas de producción de alta tecnificación la producción anual de CH₄ en animales adultos es entre 60 y 126 kg. Cerca de 500 millones de toneladas métricas/año de CH₄ ingresan a la atmósfera debido a actividades antropogénicas y fenómenos naturales. A esta tasa de emisiones se espera que el CH₄ cause cerca del 15 al 17% del calentamiento global (Carmona *et al.*, 2005).

Otro aspecto, es la eficiencia energética de los sustratos alimenticios fermentados en rumen, la cual disminuye en proporciones variables dependiendo de las características de la dieta, debido a que las emisiones de gases, específicamente CH₄, involucra pérdidas a través el eructo. La eliminación de CH₄ vía eructo en el ganado inicia aproximadamente a las cuatro semanas de vida, cuando los alimento sólidos empiezan a ser retenidos en el retículo-rumen, aumentando la fermentación y la producción de gases a medida que el retículo-rumen se va desarrollando (Carmona *et al.*, 2005).

A partir del desarrollo del rumen se empieza a producir CH₄; los microorganismos presentes en este proceso son del dominio *Archaea*, pertenecientes al reino eucariota

con concentraciones de 10^7 y 10^9 por ml de líquido ruminal, los dos géneros más comunes son *Methanobrevibacter* y *Methanosarcina* (Molina *et al.*, 2013).

La producción de CH_4 por los rumiantes se deriva de manera natural del proceso digestivo en estos, pero constituye una pérdida de energía y contribuye a las emisiones de gases de efecto invernadero (GEI), por lo que ha aumentado el número de investigaciones a fin de reducir la metanogénesis ruminal. Esta última está influenciada por varios factores, entre los que destacan: consumo de alimento, composición y digestibilidad de la dieta y procesamiento previo del alimento. Entre las estrategias para mitigar las emisiones de CH_4 que se han propuesto, la manipulación dietética-nutricional parece ser la de mayor potencial, simplicidad y factibilidad (Bonilla y Lemus, 2012).

Objetivo

Evaluar el efecto de ácido maleico sobre la producción de metano *in vitro*.

Hipótesis

La adición de ácido maleico en dietas reduce la producción de metano *in vitro*.

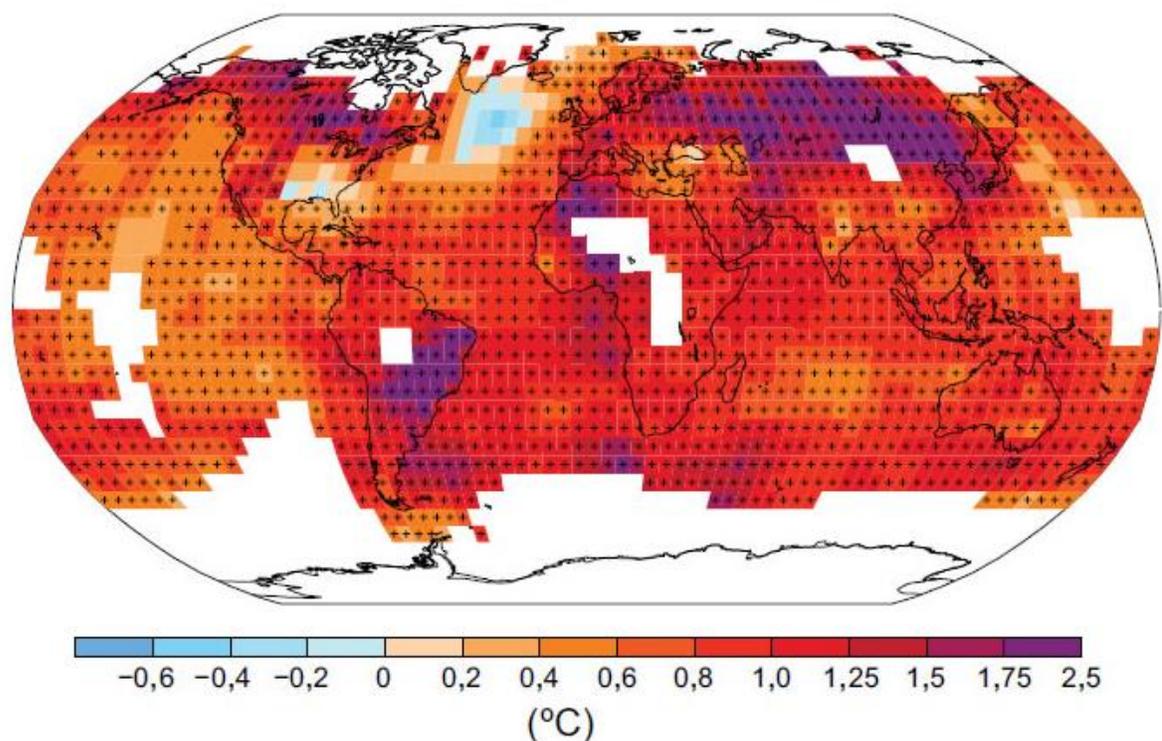
II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Cambio climático, calentamiento global, efecto invernadero y gases de efecto invernadero.

2.1.1. Cambio climático. Existe una importante variación estadística en el estado medio del clima o en su variabilidad, que persiste durante un período prolongado (normalmente decenios o incluso más). El cambio climático se puede deber a procesos naturales internos o a cambios del forzamiento externo, o bien a cambios persistentes antropogénicos en la composición de la atmósfera o en el uso de las tierras. Se debe tener en cuenta que la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático (CMCC), en su Artículo 1, define cambio climático como: un cambio de clima atribuido directa o indirectamente a la actividad humana que altera la composición de la atmósfera mundial y que se suma a la variabilidad natural del clima observada durante períodos de tiempo comparables. La CMCC distingue entre cambio climático atribuido a actividades humanas que alteran la composición atmosférica y variabilidad climática atribuida a causas naturales [IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change), 2011].

El calentamiento en el sistema climático es inequívoco y desde la década de 1950 muchos de los cambios observados no han tenido precedentes en los últimos decenios a milenios. La atmósfera y el océano se han calentado, los volúmenes de nieve y hielo han disminuido y el nivel del mar se ha elevado (IPCC, 2014 a).

Los datos de temperatura de la superficie terrestre y oceánica, combinados y promediados globalmente, calculados a partir de una tendencia lineal, muestran un calentamiento de 0,85 (0.65 a 1.06) °C, durante el período 1880-2012, para el que existen múltiples conjuntos de datos obtenidos de forma independiente. El incremento total entre el promedio del período 1850-1900 y del período 2003-2012 es de 0.78 (0.72 a 0.85) °C y está basado en el conjunto de datos disponible más extenso. Por lo que respecta al período de tiempo más largo con un cálculo suficientemente completo de las tendencias regionales (de 1901 a 2012, Figura 1), casi la totalidad del planeta ha experimentado un aumento de la temperatura de superficie (IPCC, 2014 a).

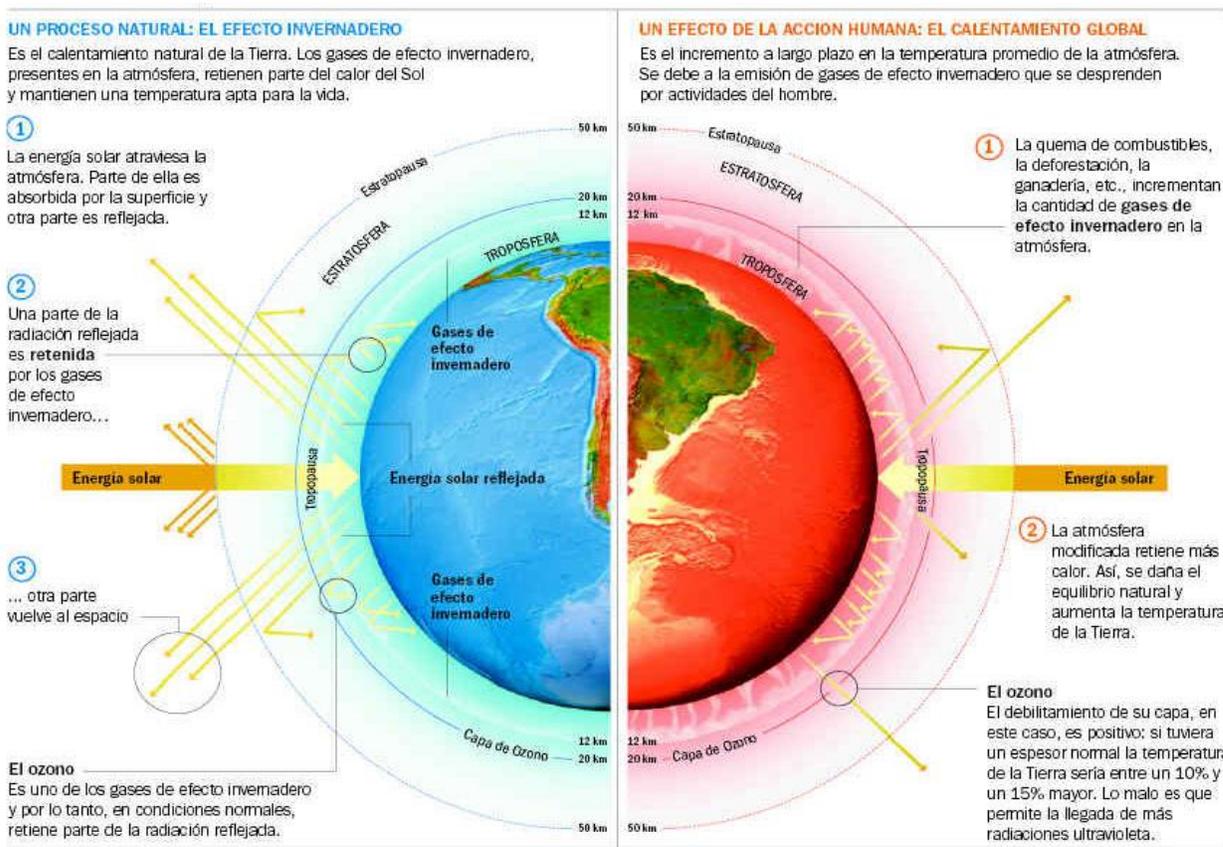


Fuente: IPCC, 2014 a: Cambio climático 2014: Informe de síntesis. Contribución de los Grupos de trabajo I, II y III al Quinto Informe de Evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático [Equipo principal de redacción, R.K. Pachauri y L.A. Meyer (eds.)]. IPCC, Ginebra, Suiza, 157 págs.

Figura 1. Cambio observado en la temperatura en superficie, 1901-2012.

2.1.2. Calentamiento global. Es el aumento gradual, observado o proyectado, de la temperatura global en superficie, como una de las consecuencias del forzamiento radiactivo provocado por las emisiones antropógenas (IPCC, 2014 b).

La Figura 2 muestra gráficamente el calentamiento global, incremento de la temperatura promedio de la atmosfera, debido a la emisión de GEI que se desprenden por actividades del hombre: quema de combustibles, deforestación, ganadería, entre otros en comparación con el proceso natural del efecto invernadero, el cual es el calentamiento natural de la tierra. Los gases de efecto invernadero, presentes en la atmosfera retienen parte del calor del sol y mantienen una temperatura apta para la vida (IPCC, 2014 b).



Fuente: IPCC, 2014 a: Cambio climático 2014: Informe de síntesis. Contribución de los Grupos de trabajo I, II y III al Quinto Informe de Evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático [Equipo principal de redacción, R.K. Pachauri y L.A. Meyer (eds.)]. IPCC, Ginebra, Suiza, 157 págs.

Figura 2. Efecto invernadero: un proceso natural y calentamiento global: un efecto de la acción humana.

2.1.3. Efecto invernadero. Los GEI absorben la radiación infrarroja, emitida por la superficie de la Tierra, por la propia atmósfera debido a los mismos gases, y por las nubes. La radiación atmosférica se emite en todos los sentidos, incluso hacia la superficie terrestre. Los gases de efecto invernadero atrapan el calor dentro del sistema de la

troposfera terrestre. A esto se le denomina “efecto invernadero natural”. La radiación atmosférica se vincula en gran medida a la temperatura del nivel al que se emite. En la troposfera, la temperatura disminuye generalmente con la altura. En efecto, la radiación infrarroja emitida al espacio se origina en altitud con una temperatura que tiene una media de -19°C , en equilibrio con la radiación solar neta de entrada, mientras que la superficie terrestre tiene una temperatura media mucho mayor, de unos $+14^{\circ}\text{C}$. Un aumento en la concentración de GEI produce un aumento de la opacidad infrarroja de la atmósfera, y por lo tanto, una radiación efectiva en el espacio desde una altitud mayor a una temperatura más baja. Esto causa un forzamiento radiactivo, un desequilibrio que sólo puede ser compensado con un aumento de la temperatura del sistema superficie–troposfera. A esto se denomina efecto invernadero aumentado (IPCC, 2011).

En la Figura 3 se observa una representación gráfica del efecto invernadero natural y el aumentado por la actividad humana.



Fuente: [En línea] Disponible <https://www.ck12.org/book/CK-12-Conceptos-de-Ciencias-de-la-Tierra-Grados-6-8-en-Espa%C3%B1ol/section/7.13/> (revisado el 15 de marzo de 2017).

Figura 3. Representación gráfica del efecto invernadero natural y aumentado por la actividad humana.

Jano (2008) menciona que las actividades humanas más importantes generan GEI. Las emisiones comenzaron a incrementarse de forma espectacular en el decenio de 1800 debido a la Revolución Industrial y a los cambios en la utilización de la tierra. Muchas de las actividades asociadas con la emisión de gases son ahora esenciales para la economía mundial y forman una parte fundamental de la vida moderna, tales como:

1.- El CO₂ resultante de la combustión de combustibles fósiles es la principal fuente de emisiones de GEI generadas por la actividad humana

2.- La mayoría de las emisiones asociadas con la utilización de energía se producen cuando se queman combustibles fósiles.

3.- La deforestación es la segunda fuente principal de CO₂

4.- La producción de cal (óxido de calcio) para la fabricación de cemento representa una parte importante de las emisiones mundiales de CO₂ provenientes de fuentes industriales.

5.- El cultivo de arroz también produce CH₄.

6.- La eliminación y tratamiento de basura y residuos humanos.

7.- La utilización de fertilizantes incrementa las emisiones de N₂O

8.- La industria ha inventado, para usos especializados, varios gases de invernadero potentes de larga duración.

2.1.4. Gases de efecto invernadero. Los gases integrantes de la atmósfera, de origen natural y antropogénico, que absorben y emiten radiación en determinadas longitudes de ondas del espectro de radiación infrarroja emitido por la superficie de la Tierra, la atmósfera, y las nubes. Esta propiedad causa el efecto invernadero. El vapor de agua (H₂O), CO₂, N₂O, CH₄, y ozono (O₃) son los principales GEI en la atmósfera

terrestre. Además existe en la atmósfera una serie de GEI totalmente producidos por el hombre, como los halocarbonos y otras sustancias que contienen cloro y bromuro, de las que se ocupa el Protocolo de Montreal. Además del CO_2 , N_2O , y CH_4 , el Protocolo de Kyoto aborda otros gases de efecto invernadero, como el hexafluoruro de azufre (SF_6), los hidrofluorocarbonos (HFC), y los perfluorocarbonos (PFC) (IPCC, 2011).

CO_2 es un gas que se produce de forma natural y también como subproducto de la quema de combustibles fósiles y biomasa, cambios en el uso de las tierras y otros procesos industriales. Es el principal GEI antropogénico que afecta al equilibrio de radiación del planeta. Es el gas de referencia frente al que se miden otros GEI y, por lo tanto, tiene un Potencial de calentamiento mundial de 1 (IPCC, 2011).

N_2O es un potente GEI emitido con los usos de cultivos en tierras, especialmente el uso de fertilizadores comerciales y orgánicos, la quema de combustibles fósiles, la producción de ácido nítrico, y la combustión de biomasa. Uno de los seis gases de efecto invernadero que se intentan reducir con el Protocolo de Kyoto.

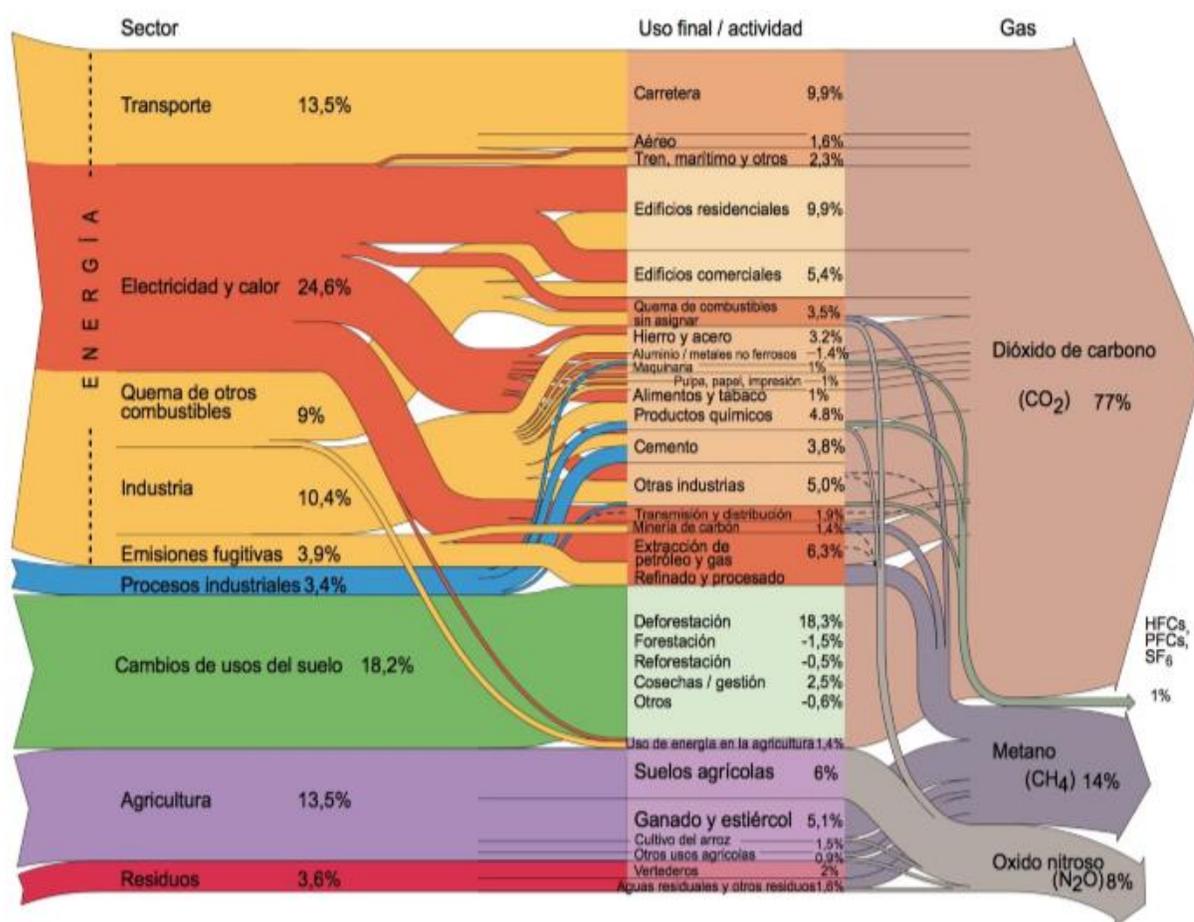
CH_4 es un hidrocarburo que es un GEI, producido por la descomposición anaerobia de residuos en vertederos, digestión animal, descomposición de residuos animales, producción y distribución de gas natural y petróleo, producción de carbón, y combustión incompleta de combustibles fósiles. El CH_4 es uno de los seis GEI que se intenta reducir en el marco del Protocolo de Kyoto (IPCC, 2011).

O_3 es la forma triatómica del oxígeno (O_3), es un componente gaseoso de la atmósfera. En la troposfera se crea de forma natural y por reacciones fotoquímicas por

medio de gases que resultan de actividades humanas (el esmog o smoke fotoquímico). En grandes concentraciones, el O₃ troposférico puede ser perjudicial para una amplia gama de organismos vivos. El O₃ troposférico actúa como un GEI. En la estratosfera, el O₃ se crea por la interacción entre la radiación solar ultravioleta y el oxígeno molecular (O₂). El O₃ estratosférico tiene un papel decisivo en el equilibrio de radiación estratosférica. Su concentración es más elevada (IPCC, 2011).

Óxidos nitrosos (N₂O) Potente GEI emitido con los usos de cultivos en tierras, especialmente el uso de fertilizadores comerciales y orgánicos, la quema de combustibles fósiles, la producción de ácido nítrico, y la combustión de biomasa. Uno de los seis GEI que se intentan reducir con el Protocolo de Kyoto (IPCC, 2011).

En la Figura 4 se ilustran los porcentajes de las emisiones mundiales de GEI por sectores, su uso final/actividad y gas.



Fuente: World Resources Institute, Climate Analysis Indicator Tool (CAIT), Navigating the Numbers: Greenhouse Gas Data and International Climate Policy, Diciembre 2005; Intergovernmental Panel on Climate Change, 1996 (datos para el año 2000).

Figura 4. Emisiones mundiales de gases de efecto de invernadero por sectores.

2.2. Impacto de la agricultura y ganadería al ambiente.

La agricultura contribuye aproximadamente de 20 a 80% del total de las emisiones antropogénicas de CO₂, CH₄ y N₂O respectivamente. La agricultura también se considera responsable de más del 95% del amoníaco, 50% del monóxido de carbono (CO) el 35%

de los óxidos de nitrógeno (N_xO_y) liberados a la atmósfera como resultado de las actividades de los humanos (Moss *et al.*, 2000).

Se estima que la agricultura contribuye con alrededor de 19 a 12% de las emisiones totales de GEI de las actividades humanas (NZAGRC, 2013).

La ganadería representa un papel importante en el cambio climático. Más de la mitad de las emisiones (alrededor del 65%) están relacionadas con la ganadería. Las emisiones directas de la producción ganadera y la alimentación animal constituyen el 80% de las emisiones totales de la agricultura, por lo que deben formar parte de cualquier esfuerzo para reducir la contribución de la producción de alimentos al cambio global (NZAGRC, 2013)

Relacionado al aumento de CH_4 , alrededor del 70% es de origen antropogénico, del cual la ganadería es responsable de un tercio, el cual es generado en la fermentación ruminal e indirectamente por la descomposición anaeróbica del estiércol (Moss *et al.*, 2000).

La acumulación de GEI en la atmósfera sugiere un incremento en la temperatura de la superficie terrestre de 1 a 6°C durante el presente siglo (IPCC, 2007). El CH_4 , que constituye el 16% del total de las emisiones globales de GEI (Scheehle y Kruger, 2006), es perjudicial, ya que tiene un potencial de calentamiento 21 veces mayor que el CO_2 (IPCC, 2007). Las emisiones de CH_4 provenientes de las actividades agrícolas representan alrededor del 40% de las producidas por las actividades humanas (Steinfeld *et al.*, 2006), y el mayor aporte (25%) proveniente de la fermentación ruminal (Olivier *et*

al., 1999), ya que los sustratos alimenticios ingeridos por los rumiantes son fermentados hasta generar ácidos grasos volátiles (AGV), (CO_2 y CH_4) y células microbianas (Ramírez *et al.*, 2012).

2.2.1. Los rumiantes y su afectación al medio ambiente. Las emisiones de CH_4 de origen ruminal a la atmósfera varían en función de las especies de rumiantes: en el ganado lechero desde 5,5 hasta 9.0% y en el ganado de engorda de 3.5 a 6.5%. En el caso de los búfalos, las pérdidas de energía de la dieta en forma de CH_4 fluctúan desde 7.5 hasta 9.0% (Ramírez *et al.*, 2012).

Se prevé que para el año 2050 la demanda por carne y leche de origen de rumiantes ha de duplicarse debido al crecimiento poblacional y aumento en el consumo per cápita, y se estima que incluso una reducción de las emisiones de los GEI de origen ganadero del orden del 50% serán insuficientes para cancelar las emisiones debidas al incremento de la población de rumiantes (Patiño-Piñares, 2014)

2.3. Producción de metano en rumiantes

Las características de la dieta tienen un gran efecto en la producción de CH_4 a nivel global, de ahí que países con pocas limitaciones alimentarias para sus ganados, reportan datos de menores emisiones de CH_4 y mayores eficiencias energéticas (Carmona, 2005).

(Kinsman *et al.*, 1995), corroboran lo anterior al mencionar que, en los países en vías de desarrollo, las emisiones son aproximadamente de 55 kg CH_4 / año por animal,

encontraste a lo reportado en países desarrollados, de 35 kg CH₄/año por animal (Carmona, 2005).

La eliminación de CH₄ vía eructo en el ganado inicia aproximadamente a las cuatro semanas de vida, cuando los alimentos sólidos empiezan a ser retenidos en el retículo-rumen, aumentándose la fermentación y la producción de gases a medida que el retículo-rumen se va desarrollando. Se considera que en sistemas de producción de alta tecnificación la reducción anual de CH₄ en animales adultos está entre 60 y 126 kg (Carmona, 2005).

2.3.1. Ecosistema ruminal. El ganado bovino emite CH₄ porque en su proceso digestivo, que ocurre bajo condiciones anaeróbicas, participan diferentes tipos de bacterias. Estas degradan la celulosa ingerida a glucosa, que fermentan luego a ácido acético y reducen el dióxido de carbono, formando CH₄ en el proceso (Carmona, 2005)

Los alimentos que llegan al rumen son fermentados hasta convertirse en productos metabólicos comunes que son los AGV. Los AGV son absorbidos desde el rumen y pueden ser usados tanto en procesos catabólicos (i.e. mantenimiento) como anabólicos (i.e. gluconeogénesis). Sin embargo, el proceso de fermentación, aunque tiene muchas ventajas, también resulta en significativas pérdidas de energía en forma de CH₄, hidrogeno y calor (Caja, 2003).

2.3.2. Microorganismos metanogénicos. Los organismos metanogénicos son generalmente Gram positivos pertenecientes al dominio *Archaea*, capaces de crecer en ambientes donde el potencial redox tenga valores por debajo a -300 mV. Entre las

principales se encuentran *Methanobacterium formicicum*, *Methanobacterium bryantii*, *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobrevibacter millerae*, *Methanobrevibacter olleyae*, *Methanomicrobium mobile*, *Methanoculleus olentangyi* y *Methanosarcina* spp las que ha sido cultivadas a partir de ambiente ruminal.

En el funcionamiento del rumen, el alimento ingerido es fermentado por una comunidad compleja para dar AGV, NH_4 , CO_2 y H_2 . Ninguna de las bacterias o protozoos fermentadores produce metano, pero algunos producen formiato, CO_2 y H_2 . En el rumen la principal vía de formación de metano es a partir del CO_2 y H_2 , ($4\text{H}_2 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$), (Rodríguez, 2013).

2.3.3. pH ruminal. El pH del rumen varía entre 5.8 a 7.0, siendo un factor crítico para el normal funcionamiento.

El tipo de dieta proporcionada al animal condiciona el desarrollo de la microbiota adecuada para su fermentación así como el rango de pH ideal. La forma física de los alimentos es importante para inducir una adecuada rumia. El forraje fibroso estimula mucho más a la rumia que los concentrados, durante la rumia se secreta saliva que posee un pH alcalino y que en el rumen actúa como tampón frente a la producción de ácidos. Cuando el animal consume concentrados, la rumia disminuye, por lo tanto también la producción de saliva, lo que hace por tanto descender el pH ruminal (Rodríguez, 2013).

El metabolismo anaerobio de los microorganismos convierte a los glúcidos en AGV, CO_2 y CH_4 . Los AGV y el CH_4 retienen la mayor parte de la energía contenida en el

sustrato, debido a la ausencia de oxígeno, lo que impide llegar hasta la formación de CO₂ y agua.

Los AGV más abundantes en el rumen son los ácidos acético, propiónico y butírico, en una proporción aproximada de 63:21:16. El acetato es el AGV que siempre se produce en mayor cantidad, siendo el producto típico de rumiantes que consumen forrajes. Por lo tanto, la dieta influye en el tipo de población bacteriana presente en el rumen, ya que el tipo de alimento ingerido afecta al pH del mismo (Rodríguez, 2013).

2.3.4. Protozoarios. Los protozoarios son los organismos más conspicuos del rumen y se encuentran en una concentración típica que varía entre 10⁴ a 10⁶ protozoos/mL, distribuidos en más de 25 géneros.

Los protozoarios encontrados en el rumen por mayoría son ciliados, aunque también se encuentran algunos flagelados. Los ciliados son los protozoos unicelulares que más abundan en el rumen de los rumiantes adultos y las clases principales con los holotricos (presentan cilios en la superficie celular) y los entodimorfos (los cilios se encuentran restringidos a un solo grupo alrededor de la citofaringe por donde ocurre la entrada de los nutrientes), (Hungate, 1966).

2.4. Aditivos en la alimentación de rumiantes

Una de las vías que se han desarrollado para propiciar modificaciones en la fermentación, es la utilización de aditivos.

El uso de diversos antibióticos y productos antimicrobianos como promotores del crecimiento animal se convirtió en práctica común después de su descubrimiento en los años cuarenta. Sin embargo, su uso continuo e indiscriminado creó serios problemas y resistencia microbiana y agudizó la aparición de efectos residuales en los alimentos para el consumo humano. Por eso, la Organización Mundial de la salud (OMS) emitió en el año 2000 la recomendación de que había que dejar de utilizar los antibióticos como promotores del crecimiento animal (APC), debido a esta problemática y a la eminente prohibición en el 2006 por la Comunidad Europea del uso de los APC, la comunidad científica prestó mayor interés en el estudio, evaluación e introducción de otros aditivos nutricionales y zootécnicos como alternativas a estos APC, que presentan propiedades nutraceuticas (García, 2015).

Entre los aditivos más estudiados y empleados se encuentran los probióticos, prebióticos, fitobióticos, acidificantes, enzimas, minerales y aditivos microbianos activadores de la fermentación ruminal (García, 2015).

2.4.1. Ácidos orgánicos. Los ácidos orgánicos se utilizan habitualmente como aditivos en la alimentación de los animales no rumiantes, pero su uso en los animales rumiantes es limitado y las experiencias realizadas en estos animales, hasta el momento, se reducen a los ácidos fumárico y málico (Carro, 2006).

El modo de acción de los ácidos orgánicos en los animales rumiantes no es totalmente conocido, pero parecen ejercer su acción a nivel del rumen.

Este hecho se ha atribuido por una parte, a su poder acidificante (Lázaro y Mateos, 2000), ya que reducen el pH del tubo digestivo y perjudican así el crecimiento está en torno a la neutralidad. Los ácidos orgánicos pueden penetrar en el interior de algunos microorganismos y alterar su equilibrio interno (Lázaro y Mateos, 2000), de forma que estos microorganismos se ven obligados a un gasto energético adicional para recuperar su equilibrio, y por ello su crecimiento se ve perjudicado (Ranilla, 2000).

En estudios *in vitro* (Russell y Van Soest, 1984) se ha observado que los microorganismos ruminales son capaces de fermentar concentraciones 7.5 mM de malato en menos de 24 horas. Esto significa que cuando las sales de los ácidos orgánicos son administradas a estos niveles son completamente transformadas y no pasan al tubo digestivo posterior, por lo que son sustancias que no pueden dejar residuos en los productos animales. La mayoría de los estudios realizados con ácidos orgánicos se han llevado a cabo en condiciones *in vitro* y son muy pocas las experiencias realizadas con animales (Carro, 2006).

2.4.2. Ácidos butenodioicos (ácido maleico y fumárico) Los dos compuestos más importantes de esta clase son los ácidos maleico y fumárico, en los que Willicenus estudió por primera vez la isomería *cis-trans* el ácido maleico no se ha encontrado en la naturaleza. Su nombre se deriva del ácido málico (*acidum malicum*), del que se obtiene por eliminación de agua. El ácido fumárico se encuentra en una serie de plantas, por ejemplo en la fumaria (*Fumaria officinalis*), en los líquenes de Islandia, así como en los hongos y líquenes. En el ciclo del ácido cítrico se produce como producto intermedio en la deshidrogenación del ácido succínico (Beyer, 1987).

Propiedades: el ácido maleico forma prismas incoloros de p.f. 130.5°C ($403,7\text{ K}$) y se disuelve fácilmente en agua; el ácido fumárico se disuelve difícilmente en agua, sublima a partir de los 200°C (475 K) y funde en tubo cerrado a 287°C (560 K). La primera constante de disociación del ácido maleico muestra un valor de pK^1 (1.92) mucho menor (mayor acidez) que la del ácido fumárico ($\text{P}k^1=3.02$), puesto que el anión del ácido maleico de forma similar al del ácido salicílico se estabiliza mediante un puente de hidrógeno intramolecular. Por hidrogenación catalítica, en las mismas condiciones de reacción, el ácido maleico se transforma en ácido succínico, mucho más rápidamente de lo que hace el ácido fumarico (Beyer, 1987).

Aplicaciones. El ácido maleico se utiliza en el campo de la síntesis como componente en la fabricación de resinas alquídicas y el anhídrido maleico como componente en la síntesis dienicas (Beyer, 1987).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar y tratamientos del experimento.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal (CENIDF y MA), perteneciente al Instituto Nacional de Investigadores Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). El CENID F y MA se encuentra ubicado en la localidad de Juchitán, municipio de Colón, estado de Querétaro.

En el estado de Querétaro el 51% de su superficie presenta clima seco y semiseco localizado en la región centro; el 24.3% presenta clima cálido subhúmedo en la región de la Sierra Madre Oriental; el 23% presenta clima templado subhúmedo localizado en la región sur, centro y noreste; el 1% presenta clima cálido húmedo hacia el noreste y el restante 0.7 % presenta clima templado húmedo al noreste del estado.

La temperatura media anual en Querétaro es de 18°C, la temperatura máxima promedio es de 28°C y se presenta en los meses de abril y mayo, la temperatura mínima promedio es de 6°C durante el mes de enero.

La precipitación media estatal es de 570 mm anuales, las lluvias se presentan en verano en los meses de junio a septiembre.

En el estado la agricultura es de gran importancia, en donde sobresale el cultivo de maíz, alfalfa, cebolla, lechuga, sorgo, forrajes, frijol, cebada y col; esta se desarrolla principalmente en las regiones de clima seco y semiseco, pero requiere riego.

Se utilizó un diseño completamente al azar con cinco tratamientos, cada uno con los siguientes porcentajes de inclusión de ácido maleico; 0, 0.4, 0.6, 0.8, 1 % y se realizó por triplicado, en una dieta que cubre los requerimientos diarios por animal (Cuadro 1) (NRC, Beef Cattle, 2001).

Cuadro 1. Composición química del alimento experimental. NRC, Beef Cattle 2001.

Requerimientos diarios por animal	Cantidad
E.M	2.398 Mcal/Kg
E.N	1.057 Mcal/Kg
PROTEINA	18.00 %
F.N.D	30.10 %
FORRAJE	18.00 %
E.D.	2.773 Mcal/kg
T.N.D	63.85 %
F.D.A	14.80 %
FIBRA	12.26 %
CALCIO	0.34 %

E.M: energía metabolizable, E.N: energía neta, F.N.D: fibra detergente neutro, E.D: energía digestible, T.N.D: total de nutrientes digestibles, F.D.A: fibra detergente ácida, Mcal: mega caloría, Kg: kilogramos.

3.2. Técnica de gas *in vitro*

Se utilizó 0.5 g de cada muestra colocándolas en frascos de 125 ml color ámbar. A cada frasco se le aplicó 81 ml de Solución Mineral Reductora (2.5 g de Na₂S + 2.5 g de L- Cisteína + 100 mg de rezarzurina aforadas a 100 mL de agua destilada) y 9 ml de inóculo ruminal con burbujeo continuo de CO₂ el cual se retiró rápidamente y se cubrió con un tapón de goma y se selló con un aro metálico. El líquido se extrajo de dos bovinos con fístula ruminal, el cual se filtró con una tela de gasa doblada ocho veces. Se colocaron los frascos en baño maría durante 72 h a 39°C, y se tomaron mediciones de presión con un manómetro provisto de una llave trifásica y aguja hipodérmica, la presión de gas

originada por la fermentación del sustrato se midió con escala de 0 a 1 kg cm², a las 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24, 30, 36, 42, 48, 60 y 72 h al término de las mediciones, se tomaron muestras para la determinación de AGV, bacterias, protozoarios, pH, CH₄, materia seca (MS) y materia orgánica (MO). Las muestras se filtraron con una bomba de vacío. Una vez filtradas las muestras se metieron a una estufa a 100°C durante 24 h para secarlas y obtener el peso seco. Los datos se procesaron en hoja de cálculo electrónica del programa Excel 4.0. La comparación de medias se realizó mediante la prueba de rango múltiple de Tukey (P<0.1). Todo lo anterior se realizó con el paquete estadístico SAS (2009).

3.3. Digestibilidad *in situ*

Se emplearon bolsas de nylon (15.0 x7.5 cm; tamaño de poro 52±10 con 4 g de MS de cada tratamiento con una malla de 2 mm. Se colocaron dos bolsas con la dieta por animal dentro del rumen por 0, 6, 12, 24, 48 y 72 h, por duplicado y se retiraron en orden inverso. Después se lavaron con agua hasta que el afluyente fue claro.

Las bolsas se secaron a temperatura ambiente y luego en una estufa de aire forzado a 55°C. Se midió el contenido de AGV, bacterias, protozoarios pH, CH₄. El primer día de muestreo se tomaron muestras de líquido ruminal a las 0, 4, 8 y 12 h. se midió el pH y se filtró la muestra, se conservó con ácido metafosfórico al 25% (v/v) y se conservaron a -4°C para posteriormente medir el contenido de AGV por cromatografía de gases (Erwin *et al*, 1961). Los resultados se analizaron de acuerdo con un cuadro latino con arreglo factorial de tratamientos (SAS, 2009).

3.4. pH ruminal

Esta determinación se realizó inmediatamente después de haber colectado el líquido ruminal con un potenciómetro marca Orión modelo 710^a, calibrado a dos valores de pH (4.0 y 7.0), respectivamente (ORION, 1996).

3.5. Concentración de nitrógeno amoniacal N-NH₃

Se utilizó la técnica de McCulloch (1967). El líquido ruminal que se recolectó se acidificó con ácido metafosfórico, la muestra se centrifugó a 208.17 fuerzas G durante cinco min y del sobrenadante se colectaron 3.0 ml y se depositaron en viales de plástico. Para su lectura se tomaron 20 µL que se depositaron en tubos de 18 x 130 mm a los cuales se les agregó 1.0 ml de fenol y 1.0 ml de hipoclorito de sodio basificado con hidróxido de sodio. Los tubos fueron puestos en incubación a 39°C durante 30 min y posteriormente se agregaron 5.0 ml de agua destilada para diluir la muestra. La concentración de N-NH₃ se midió por absorbancia en un espectrofotómetro marca Perkin Elmer UV-VIS modelo Lambda 40 a 630 nm. Se utilizó un blanco como referencia, el cual contenía 1.0 ml de fenol, 1.0 ml hipoclorito de sodio y 5.0 ml de agua destilada. Para conocer la concentración final de N-NH₃, se hizo una comparación con una curva estándar.

3.6. Concentración de AGV

Se determinó una vez que se acidificó el líquido ruminal con ácido metafosfórico con una proporción de 4:1 de muestra: ácido metafosfórico respectivamente. La muestra

se centrifugó a 208.17 fuerzas G durante 15 min y se colectó el sobrenadante (1.5 ml). La concentración de AGV de las muestras se determinó por cromatografía de gases (Erwin *et al.*, 1961), en un cromatógrafo Perkin Elmer, Modelo Claurus 500 con columna capilar Elite FFAP. El gas acarreador fue hidrógeno con flujo de 15 ml min⁻¹. Se inyectó 1µL de muestra, con temperatura de inyector de 200°C, detector de 250°C y una temperatura de horno de 140°C por 5 min.

3.7. Concentración de bacterias totales

Las concentraciones fueron calculadas utilizando la técnica del recuento directo en microscopio a través de la cámara de Petroff-Hausser (Parthnership® modelo SQMM Horsham PA 190044). El conteo se realizó en 10 cuadros (0.05 x 0.05), elegidos al azar utilizando un microscopio de contraste marca Olimpos® modelo BX51, lente objeto 100 x, contraste ph3 y filtro de luz azul. El procedimiento se realizó de acuerdo a lo descrito en el manual de operación Sigma (1990).

3.8. Concentración de protozoarios

Se utilizó una cámara de Neubauer y un microscopio Zeiss a una magnificación de 40X. Como no se requieren protozoarios viables, se diluyó el líquido ruminal en solución para conteo (5 ml de solución mineral I + 5 ml de solución mineral II + 3 ml de formaldehído al 3% aforadas a 87 ml con agua destilada) (Dehority, 1984).

Concentración de protozoarios = (promedio) (factor de dilución) (10⁴).

IV. RESULTADOS

Cuadro 2. Primera prueba, volúmenes de gas.

Tratamiento	V	Fr	Fm	Fl	S (h ⁻¹)	L (h)	DIMS %
0%	444.36 ^a	260.98 ^a	171.18 ^a	12.2 ^a	0.0364 ^a	-0.0332 ^a	86.14 ^a
1%	412.81 ^a	246.23 ^a	154.33 ^a	12.24 ^a	0.0364 ^a	-0.5647 ^a	84.67 ^a
2%	219.57 ^a	247 ^a	162.44 ^a	10.12 ^a	0.0353 ^a	-0.6719 ^a	84.42 ^a
3%	436.77 ^a	249.09 ^a	175.42 ^a	12.25 ^a	0.0346 ^a	0.7866 ^a	80.11 ^a
4%	405.15 ^a	243.48 ^a	151.91 ^a	9.76 ^a	0.0357 ^a	0.1219 ^a	85.04 ^a

Medias con igual letra en la misma columna no son diferentes (P<0.05);

V=volumen de gas máximo, Fr= volumen de gas acumulado de 0-16 h, Fm=volumen de gas acumulado de 16-48 h, Fl= volumen de gas acumulado de 48-72 h, S=fase lag o de retardo, L= fase exponencial del crecimiento microbiológico, DIMS= Digestibilidad *in vitro* de la Materia Seca.

Cuadro 3. Segunda prueba volúmenes de gas.

Tratamiento	V	Fr	Fm	Fl	S (h ⁻¹)	L (h)	DIMS %
0%	479.72 ^a	277.47 ^a	189.77 ^a	12.48 ^a	0.0354 ^a	0.3832 ^a	67.75 ^a
1%	429.43 ^a	247.30 ^a	170.84 ^a	11.29 ^a	0.0351 ^a	-0.4079 ^a	83.78 ^a
2%	385.99 ^a	218.87 ^a	158.19 ^a	8.92 ^a	0.0376 ^a	0.9587 ^a	79.82 ^a
3%	440.34 ^a	252.75 ^a	175.98 ^a	11.62 ^a	0.0360 ^a	-0.0804 ^a	87.34 ^a
4%	425.82 ^a	246.54 ^a	167.63 ^a	11.66 ^a	0.0346 ^a	-0.9186 ^a	80.42 ^a

Medias con igual letra en la misma columna no son diferentes (P<0.05);

V=volumen de gas máximo, Fr= volumen de gas acumulado de 0-16 h, Fm=volumen de gas acumulado de 16-48 h, Fl= volumen de gas acumulado de 48-72 h, S=fase lag o de retardo, L= fase exponencial del crecimiento microbiológico, DIMS= Digestibilidad *in vitro* de la Materia Seca.

Cuadro 4. Primera prueba, producción de metano *in vitro*

Tratamiento	V	CH ₄ (6h)	CH ₄ (12h)	CH ₄ (18h)	CH ₄ (24h)
0%	444.36 ^a	2.5 ^a	13.25 ^a	7 ^a	7.25 ^a
1%	412.81 ^a	6 ^a	8.9 ^a	6.25 ^a	4.5 ^a
2%	219.57 ^a	6 ^a	9.25 ^a	6.75 ^a	4.75 ^a
3%	436.77 ^a	6.5 ^a	7.5 ^a	11.25 ^a	7 ^a
4%	405.15 ^a	3 ^a	9.95 ^a	9.25 ^a	5 ^a

a, b, c = medidas con las literales diferentes en la misma columna indican diferencias (P<0.05)

V= volumen de gas máximo, CH₄ (6h)= producción de metano a las 6h, CH₄ (12h)= producción de metano a las 12 h, CH₄ (18h)= producción de metano a las 18 h, CH₄ (24h)= producción de metano a las 24 h.

Cuadro 5. Segunda prueba, producción de metano *in vitro*

Tratamiento	V	CH ₄ (6h)	CH ₄ (12h)
0%	479.72 ^a	3.75 ^a	12.5 ^a
1%	429.43 ^a	4.5 ^a	10 ^a
2%	385.99 ^a	4 ^a	11.25 ^a
3%	440.34 ^a	4.5 ^a	11 ^a
4%	425.82 ^a	2.75 ^a	13.15 ^a

a, b, c = medidas con las literales diferentes en la misma columna indican diferencias (P<0.05)

V= volumen de gas máximo, CH₄ (6h)= producción de metano a las 6h, CH₄ (12h)= producción de metano a las 12 h

Cuadro 6. Variables microbiológicas de gas *in vitro* a 72 h de incubación con líquido ruminal de bovino.

Variable	Ácido maleico					EEM
	0 %	1 %	2 %	3 %	4 %	
N-NH ₃ , mg/dL ⁻¹	8.98 ^b	9.58 ^b	11.58 ^a	12.08 ^a	9.15 ^b	1.68
Bacterias totales (10 ¹⁰ mL ⁻¹)	3.25	3.14	3.28	3.36	3.65	0.68
Protozoarios (10 ⁵ mL ⁻¹)	3.58 ^b	4.98 ^a	4.59 ^a	5.02 ^a	3.28 ^b	0.78

a, b, c = medias con literales diferentes en una hilera, son diferentes (P<0.05).

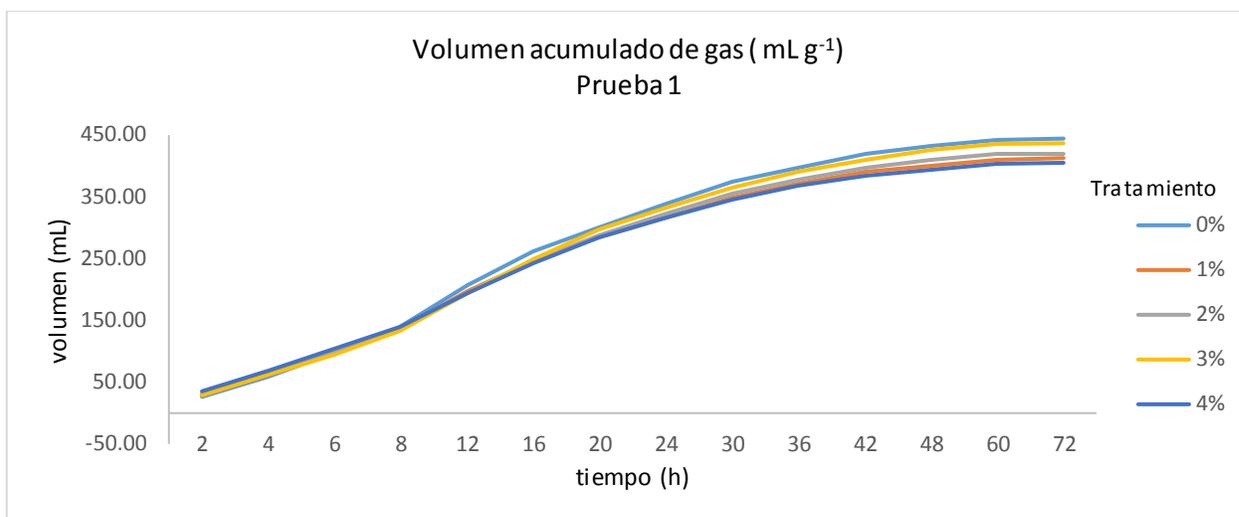


Figura 5. Primera prueba, producción acumulada de gas de fermentación (72 h) de cinco tratamientos con ácido maleico.

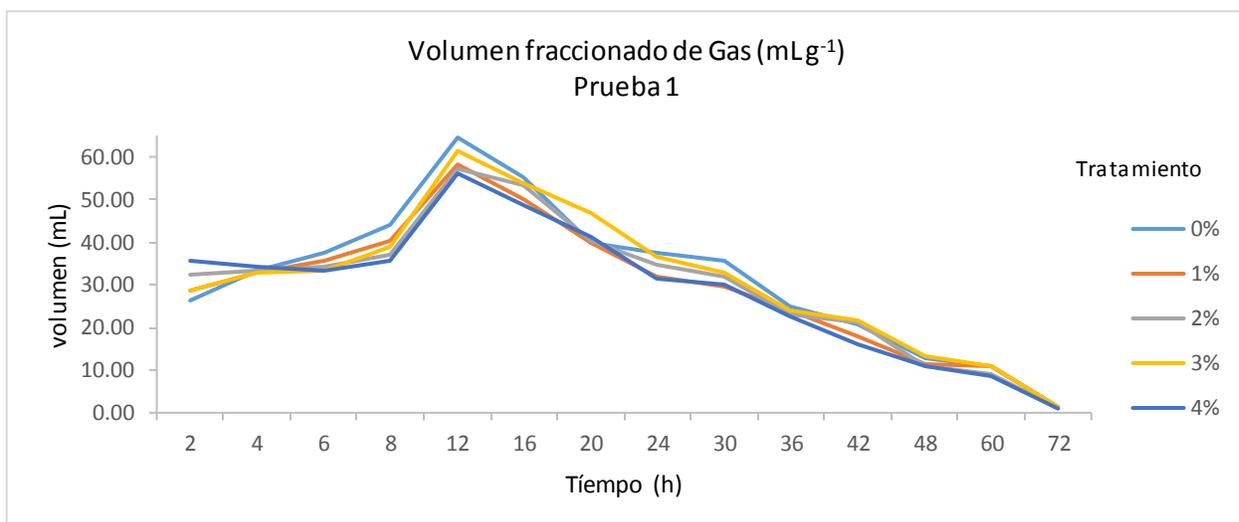


Figura 6. Primera prueba, volumen fraccionado de gas (72 h) de cinco tratamientos.

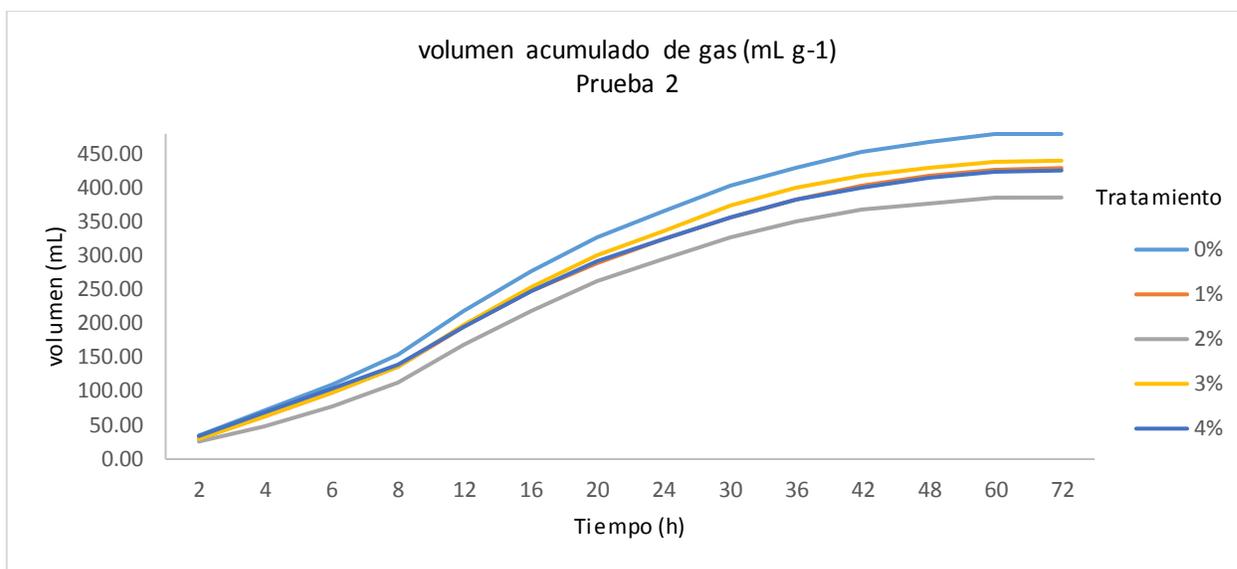


Figura 7. Segunda prueba, producción acumulada de gas de fermentación (72 h) de cinco tratamientos con ácido maleico.

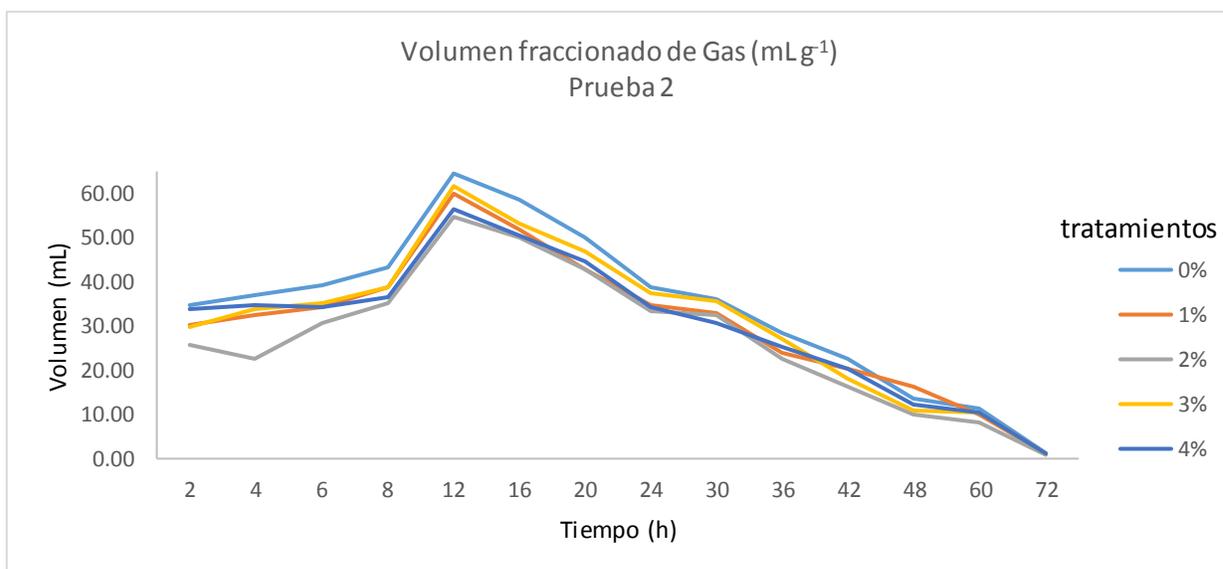


Figura 8. Segunda prueba, producción fraccional de gas (72 h) de cinco tratamientos con ácido maleico.

Cuadro 7. Análisis de la digestibilidad *in situ* en bovino

Tratamiento	6h	12h	24h	48h	72h
0%	50.19	53.32	69.66	70.57	73.35
1%	54.72	61.20	68.93	71.74	75.24
2%	52.79	59.15	67.94	70.08	75.08
3%	53.54	58.67	64.69	70.15	74.19
4%	47.70	57.84	70.59	73.25	75.98

Las medidas no son diferentes ($P>0.05$)

Cuadro 8. Análisis de pH *in vitro* con líquido ruminal de bovino

Tratamientos	pH
0 %	6.37
1 %	6.35
2 %	6.35
3 %	6.37
4 %	6.32

Las medidas no son diferentes ($P>0.05$).

Cuadro 9. Concentración de nitrógeno amoniacal (mg dL^{-1}) en líquido ruminal de bovino

in vitro

Horario (h)	Ácido maleico					EEM
	0 %	1 %	2 %	3 %	4 %	
12 h	10.89	9.36	12.65	13.15	11.02	2.18
24 h	15.78 ^b	18.14 ^a	17.25 ^a	14.58 ^b	13.25 ^c	2.89

a, b, c = medias con literales diferentes en una hilera, son diferentes ($P<0.05$)

Cuadro 10. Concentración de ácidos grasos volátiles (mM) en líquido ruminal de bovino*in vitro.*

Ácido maleico	12 h			24 h		
	acetato	propionato	butirato	acetato	propionato	butirato
0 %	25.14	18.56a	11.52	35.15	25.15b	7.89
1 %	23.58	17.59a	12.15	32.25	27.51a	9.18
2%	26.82	19.04a	10.58	33.68	28.68a	8.15
3%	28.56	19.64a	11.95	34.78	26.15b	8.69
4%	25.68	16.58b	12.25	33.12	24.58 b	7.58
EEM	2.98	1.78	2.18	3.15	2.87	3.15

a, b = medias con literales diferentes en una hilera, son diferentes (P<0.05).

Cuadro 11. Concentración de bacterias totales (10^{10} mL⁻¹) en líquido ruminal de bovino*in vitro.*

Horario (h)	Ácido maleico					
	0 %	1 %	2 %	3 %	4 %	EEM
12 h	3.58	3.97	3.19	3.08	3.25	0.45
24 h	4.11	3.98	3.87	3.58	3.88	0.45

Las medias no son diferentes (P<0.05)

Cuadro 12. Concentración de protozoarios totales (10^5 mL⁻¹) en líquido ruminal de bovino*in vitro.*

Horario (h)	Ácido maleico					
	0 %	1 %	2 %	3 %	4 %	EEM
12 h	4.57 ^b	4.68 ^b	5.04 ^b	5.14 ^b	6.04 ^a	1.05
24 h	5.24 ^a	3.56 ^c	5.56 ^a	5.23 ^a	4.25 ^b	1.25

a, b, = medias con literales diferentes en una hilera, son diferentes (P<0.05)

V. DISCUSIÓN

En los cuadros 2 y 3 en los resultados no hay diferencias ($p>0.05$) y son estadísticamente similares y n ($p>0.05$) en V, Fr, Fm, FI, S, L, DIMS. (Rosales, 1996) reportó una DIMS de 92.7% a las 72 h, igualmente se resalta que esta fue muy similar a la encontrada por (Mhecha y Rosales, 2005), quienes encontraron una DIMS del 63.3% y en prueba realizada de degradabilidad *in sacco*. (Rodríguez, 2009) reportó que la degradación de la MS a las 72 h de incubación fue similar ($p>0.05$) entre un cultivo de bacterias ruminales y un inóculo de bacterias formatotróficas más el cultivo de bacterias ruminales (60.84 vs 60.51%).

En el cuadro 4, los resultados de CH_4 *in vitro*, mostraron diferencias significativas ($p<0.05$), en el horario 12 h hubo mayor incremento de CH_4 , la menor producción de gas de obtuvo del tratamiento 0% a las 6 h. Los tratamientos 1% y 2% tuvieron menor producción de gas a las 24 h. en el cuadro 5, también hubo diferencias ($p<0.05$), en el horario 12 h hubo mayor incremento de gas en todos los tratamientos. (Valenciaga *et al.*, 2006) demostraron que la producción de gas total aumenta a medida que transcurre el tiempo de incubación del forraje (*Pennisetum purpureum*). En los rumiantes el hidrógeno producido por microorganismos hidrolíticos y fermentadores es utilizado principalmente por bacterias metanogénicas para reducir el CO_2 a CH_4 , en general las poblaciones celulolíticas, los hongos anaerobios y bacterias ruminales del género *Ruminococcus* son los principales productores de hidrógeno como parte de su metabolismo energético (Chaucheyras, 2010). También este último autor sugiere que tras la hidrólisis de polímeros, casi todo el hidrógeno se involucra en la producción de CH_4 lo que confirma el dominio de las bacterias metanogénicas en el ecosistema ruminal por la utilización de hidrógeno. Un factor que afecta la producción de gas *in vitro* es la especie donadora del inóculo, la actividad microbiana difiere entre especie, su composición depende del tipo de dieta e intervalos de alimentación (Posada y Noguera, 2005).

En el cuadro 6, en N-NH_3 Los tratamientos 0%. 1% y 4% son similares mientras que hubo un aumento de nitrógeno amoniacal en el tratamiento 2% y 3%, lo que se relaciona con la utilización del N-NH_3 por bacterias del rumen para sintetizar proteína microbiana (Abdoun *et al.*, 2007, Antonelli, 2007). En bacterias totales no se encontraron diferencias ($p>0.05$). En los resultados e protozoarios hubo dos diferencias, los tratamientos 0% y 4% son parecidos de igual manera los tratamientos 1%, 2% y 3%.

En la figura 5, de producción acumulada de gas se obtuvo valores muy similares, en todos los tratamientos empiezan la producción de gas a las 2 h, el tratamiento 0% es el que tiene una mayor producción de gas a las 16 h, mientras que el tratamiento 4% tuvo mayor producción de gas de las 2 a las 8 h en comparación con los otros tratamientos. En la figura 7, todos los tratamientos empiezan a producir gas desde las 2 h, el

tratamiento 0% muestra en todos los horarios mayor producción de gas, mientras que el tratamiento 2% es el de menor producción. Con esto se demostró que la digestibilidad no es equivalente a la cantidad de gas producido, los autores Díaz *et al.*, 2013, Pell y Schofield 1993 demostraron que la digestibilidad no es equivalente a la cantidad de gas producido y que hay una tendencia al aumento de la producción de gas en aquellos forrajes donde el contenido de FDN es mayor. En la figura 6, muestra un inicio de producción de gas a las 2 h en todos los tratamientos, de las 8 a las 12 h todos los tratamientos muestran una elevación en la producción de gas, es a partir de las 12 h donde empieza a descender hasta los 72 h. Para la figura 8 muestra un inicio de producción de gas a las 2 h en todos los tratamientos, de las 8 a 12 h tiene un incremento de volumen fraccional siendo el tratamiento 0% el de mayor cantidad producida, y a partir de ese horario en cuando empieza a declinarse. Se ha demostrado que la digestibilidad *in vitro* de materia seca y de la materia orgánica tienen una alta correlación con el volumen de gas. Por otra parte una producción importante de gas se produce cuando el sustrato se fermenta a acetato o butirato mientras que la menor producción de gas se asocia con producción de propionato (Ngamsaeng *et al.*, 2006).

En el cuadro 7, de análisis de la digestibilidad *in situ*. No hay diferencias, en el horario 48 h y 72 h hubo un aumento de la digestibilidad en todos los tratamientos. (Ruiz *et al.*, 2002) reportan que la adición de urea de lenta liberación en dietas totalmente mezcladas mejora la desaparición de la MS. (Beever *et al.*, 1985; Donaldson *et al.*, 1989; Cervantes *et al.*, 2000), indican que concentraciones altas de nutrientes nitrogenados y carbohidratos solubles en el rumen favorecen la digestibilidad de las dietas.

En el cuadro 8, no se encontraron diferencias significativas de pH en los cinco tratamientos. Se podría esperar que los resultados de pH se correlacionan con la concentración de AGV. Cuando la formación de AGV es muy rápida, estos se acumulan y bajan el pH pudiendo causar el desorden metabólico denominado acidosis bovina (Tajima *et al.* 2000, Fernando *et al.* 2010). La técnica de producción de gas *in vitro* es un sistema cerrado, no permite simular la absorción a través de las paredes del rumen y la eliminación selectiva de los productos de fermentación (Martínez, 2009).

En el cuadro 9, de N-NH₃, se tomaron muestras en dos horarios a las 12 h y a las 24 h, se obtuvo concentraciones diferentes ($p < 0.05$), pero el horario de las 24 h fue de mayor concentración en todos sus tratamientos en comparación al horario de las 12 h. Cuando la concentración de N-NH₃ puede variar de 8.8 hasta 56.1 mMol dL⁻¹ de fluido ruminal, (Sánchez, 2010) (Rogers *et al.*, 1986) y (Mehrez y Orskov, 1977) observaron que la concentración *in vitro* de N-NH₃ requerida para una máxima síntesis de proteína microbiana por unidad de sustrato fermentada varía de 5 a 6 mMol dL⁻¹ en líquido ruminal.

Cuadro 10, en los resultados de AGV, en los dos horarios 12 h y 24 h hubo diferencias ($p < 0.05$), ambos con mayor producción de acetato, continuando el propionato

y butirato. La composición de AGV es un parámetro que ha sido sugerido para estimar la producción de gas en ambientes anóxicos, existe una relación directa entre la producción de ácido acético y de CH₄; cuando la cantidad de piruvato que se incorpora a la ruta del ácido acético va en aumento, debe haber un incremento simultáneo en la producción de CH₄. Asimismo, existe una relación recíproca entre la producción de CH₄ y la de ácido propiónico; cuando el piruvato se desvía hacia la producción del ácido propiónico, hay menor síntesis de CH₄ (Cunningham y Bradley, 2009). Por otra parte (Engelking, 2002; Calsamiglia *et al.*, 2008) observaron que cuando decrece el pH ruminal, altera la relación acetato, propionato, butirato, y aumenta la proporción de propionato: butirato, pero también puede provocar trastornos metabólicos como acidosis ruminal, generalmente ocasionado con dietas altas en granos.

En el cuadro 11, en los cinco tratamientos no hubo diferencias en la concentración de bacterias totales ($p > 0.05$) autores (Abrego, 2012) redactan que esto es probablemente a la diversidad de especies microbianas del rumen. (Borrego *et al.*, 2001) no existe información que permita comparar los resultados entre diferentes concentraciones bacterianas de un mismo inóculo, en las variables interés para el investigador.

En el cuadro 12 de concentración de protozoarios en ambos horarios 12 h y 24 h se encontraron diferencias ($p < 0.05$) el tratamiento 4% del horario 12 h fue el que obtuvo mayor concentración. Mientras que Galindo (*et al.*, 2005 y 2006) demostraron que los taninos condensados y los polifenoles totales, entre otros metabolitos, son capaces de reducir los protozoos, así como las saponinas.

VI. CONCLUSIONES

La adición de ácido maleico evaluada mediante la técnica gas *in vitro* en una dieta que cubre los requerimientos diarios por animal no disminuyó la producción de metano (CH₄).

Con o sin la adición de ácido maleico las determinaciones de digestibilidad *in situ*, pH ruminal, concentraciones de N-NH₃, AGV, bacterias totales y protozoarios fueron estadísticamente iguales.

Se sugiere continuar con las investigaciones de la utilización del ácido maleico como un aditivo en la elaboración de dietas para reducir la producción de metano (CH₄).

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Germán Buendía Rodríguez, asesor externo de mi tesis y director del proyecto:

Reducción de la emisión de metano en rumiantes mediante la caracterización química, nutricional y metanogénica de ingredientes energéticos, proteícos y fibrosos, así como su incorporación en la formulación y evaluación de raciones con diferentes potencial de producción animal. Con número de identificación INIFAP: 13161533079, número de CONACYT CVU: 94171 SIN: 50533.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abdoun, K., F. Stumpff and H. Martens, 2007. Ammonia and urea transpor across the rumen ephitelium: a rewiee. *Animal Health Research Reviews* 7:43-59.
- Abrego, G.A., 2012. Evaluación de una bacteria ruminal acetogénica en la producción de metano *in vitro*. Tesis de M.C. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Edo. De México.
- Antonelli, A.C., A.S. Torres G., C. Soares P., S. Mori C., C.A. Sucupira M. and L. Ortonali E., 2007. Ammonia poisoning causes muscular but not liver damager in cattle. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 59: 8-13.
- Beever, D.E., J. Thomson D., J. Uliyatt M., B. Cammell S. and C. Spooner M., 1985. The digestión of fresh perennial ryegrass (*Lolium perenne* L. cv. Melle) and White clover (*Trifolium repens* L. cv. Blanca) by growing cattle fed indoors. *Bristish Journal of Nutrition*. 54: 763-775.
- Beyer, W. 1987. Manual de química orgánica. Versión española de la 19ª edición alemana. Editorial Reverté, S.A., España. ISBN-84-291-7066-9.
- Bonilla C., J.A. y C. L. Lemus F. 2012. Emisión de metano entérico por rumiantes y su contribución al calentamiento global y al cambio climático. *Rev. Mex Cienc Pecu*; 3(2):215-246.
- Borregos, S., E. Espinosa M., E. Carballo M., T. Moreira, E. Martí y A. Ramírez, 2001.comportamiento de tres mutantes de microbaterías productoras de percursores esteriodes conservadas por liofilización durante 10 años. *Bioteconología Aplicada*. 18 (2):85-87.

- Caja, G., González, E., Flores, C., Carro M.D. y Albanell E., 2003. Alternativas a los antibióticos de uso alimentarios en rumiantes: probióticos, enzimas y ácidos orgánicos. Departamento de Producción Animal, Universidad de León.
- Calsamiglia, S., P. Cardozo W., A. Ferret and A. Bach, 2008. Changes in rumen microbial fermentation are due to a combined effect of type of diet and pH. *J. Anim. Sci.* 86:702-711.
- Carmona, J.C., Bolívar, D.M., 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* Vol. 18:1.
- Carro, M.D., Ranilla M.J. y Tejido, M.L., 2006. Utilización de aditivos en la alimentación del ganado ovino y caprino. *pR* 7, núm. 3:26-37.
- Cervantes, R.M., E. Alvarez C., N. Torrentera O., G. Mendoza M., S. Espinoza S., A. Velderrain F. y S. González, 2000. Época de corte y composición nutricional, sitio y grado de digestión de ballico anual (*Lolium multiflorum*) en novilos. *Agrociencia* 34:413-422.
- Chaucheyras, D.F., S. Masséglia, G. Fonty and E. Forano. 2010. Influence of the composition of the cellulolytic flora on the development of hydrogenotrophic microorganisms, hydrogen utilization, and methane production in the rumens of gnotobiotically reared lambs *J. Appl. Environ. Microbiol.* 76(24):7931-7937.
- Cunningham, J.G., y K. Bradley G., 2009. *Fisiología veterinaria*. Ed. Elsevier. 4ª edición. Barcelona, España. 675 p.

- Díaz A., M.N., V.M. García G. y J.C. Penagos L., 2013. Producción de gas in vitro como método rápido para determinar la cinética de fermentación ruminal de forrajes en campo. Colegio de Posgrado en producción animal, UACH.
- Donaldson, R.S., A. McCann M., E. Amos H. and S. Hoveland C., 1989. Effects of implant and protein supplementation on steers grazing Winter annuals. *Journal of Animal Science* 67 (supplement 2): 34-38.
- Engelking, L.R., 2002. Review of veterinary physiology, Ed. Teton New Media. Alpine, WY. 645 p.
- Fernando, S., H. Purvis, F. Najjar, L. Sukharnikov, C. Krehbiel, T. Nagaraja, B. Roe, and U. Desilva, 2010. Rumen microbial population dynamics during adaptation to a high-grain diet. *Appl Environ Microbiol* 76:7482-90.
- Galindo, J., A. Sosa, N. González, D. Delgado, R. González, I. Aldana A., O. Moreira, O. Cueto y J.Cairo, 2005. Effect of ruminal fermentation activator on the population of protozoa, methanogenic and cellulolytic bacteria and fungi in the rumen, informe OIEA.
- Galindo, J., I. Scull, D. Delgado, N. González, Y. Marrero, G. Febles, T. Ruiz, A. Sosa, I. Aldana A., O. Moreira, V. Torres, L. Sarduy L., A. Noda, G. Achang, B. Chongo y R. Pedraza, 2006. Efecto de los metabolitos secundarios de árboles, arbustos y otras leguminosas como agentes defaunantes del rumen y su repercusión en el metabolismo energético de los rumiantes. Premi CITMA provincial. La Habana, Cuba.
- García W. M., 2011. La ganadería en México: su contribución a la seguridad alimentaria. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. Miami, FL, USA.

García, Y.H., García, Y.C., 2015. Uso de aditivos en la alimentación animal: 50 años de experiencia en el Instituto de Ciencia Animal. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, vol. 49, núm. 2, pp. 173-177.

Hungate, R.E. 1966. *The Rumen and its Microbes*, Academic Press, New York.

IPCC, 2014 a: Cambio climático 2014: Informe de síntesis. Contribución de los Grupos de trabajo I, II y III al Quinto Informe de Evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático [Equipo principal de redacción, R.K. Pachauri y L.A. Meyer (eds.)]. IPCC, Ginebra, Suiza, 157 págs.

IPCC, 2014 b: Anexo II: Glosario [Mach, K.J., S. Planton y C. von Stechow (eds.)]. En: Cambio climático 2014: Informe de síntesis. Contribución de los Grupos de trabajo I, II y III al Quinto Informe de Evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático [Equipo principal de redacción, R.K. Pachauri y L.A. Meyer (eds.)]. IPCC, Ginebra, Suiza, págs. 127-141.

IPCC. 2011. Cambio climático 2001: Informe de síntesis. Tercer Informe de Evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático. [Robert T. Watson, R. T., Albritton, D. L., Barker, T., Bashmakov, I. A., Canziani, O., Christ, R., Cubasch, U., Davidson, O., Gitay, H., Griggs, D., Halsnaes, K., Houghton, J., House, J., Kundzewicz, Z., Lal, M., Leary, N., Magadza, Ch., McCarthy, J.J., Mitchell, J. F. B., Moreira, J. R., Munasinghe, M., Noble, I., Pachauri, R., Pittock, B., Prather, M., Richels, R. G., Robinson, J. B., Sathaye, J., Schneider, S., Scholes, R., Stocker, T., Sundararaman, N., Swart, R., Taniguchi, T., Zhou, D. (eds.)]. Organización Meteorológica Mundial, Ginebra, Suiza, 161 págs. (en árabe, chino, español, francés, inglés y ruso).

Ku V., J. C, A. J. Ayala B., C. A. Pérez A., J. Herrera C. y O. A. Castelán O. 2012. Emisiones de metano por rumiantes, implicaciones para el calentamiento global. [En línea] Disponible en

<http://www.cyd.conacyt.gob.mx/259/articulos/emisiones-de-metano.html>
(revisado el 15 de febrero de 2017).

Mahecha L. and M. Rosales, 2005. Valor nutricional del follaje de Botón de oro (*Tithonia diversifolia* (Hemsl). Gray), en la producción animal en el trópico. *Livestock Research for Rural Development* 17. <http://www.lrrd.org/lrrd17/9/mahe17100.htm>

Mehrez, A.Z. and R. Orskov E., 1977. A study of artificial bag technical for determination the digestibility of feed in the rumen. *Journal of Agricultural Science (Cambride)* 88:645-650.

Moss, A. R., Pierre, J.J. y Newbold, J., 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warning. *Annales de Zootechnie*. 49, 231-253.

Navarro, J. 2008. De qué manera las actividades humanas producen gases de efecto invernadero. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente y la Secretaría sobre el Cambio Climático (UNFCCC). [En línea] Disponible en <http://www.cambioclimatico.org/content/de-que-manera-las-actividades-humanas-producen-gases-de-invernadero> (revisado el 17 de marzo de 2017).

New Zealand Agricultural Greenhouse Gas Research Centre (NZAGRC). 2013. Reduciendo las emisiones de gases de efecto invernadero de la ganadería: Mejores prácticas y opciones emergentes. Grupo de Investigación de Ganadería (LRG) de la Alianza Global de Investigación de Gases de Efecto Invernadero en la Agricultura (GRA) y Plataforma de Trabajo en Carne de la iniciativa para la Agricultura Sustentable (SAI). Nueva Zelanda. 41 p.

Ngamsaeng, A., M. Wanapat, and S. Khampa, 2006. Evaluation of local tropical plants by rumen fermentation and their effects on fermentation end-products. *Pakistan Journal of Nutrition* 5:414-418. <http://www.pjbs.org/pjnonline/ab525.htm>

- Ngamsaeng, A., M. Wanapat, and S. Khampa, 2006. Evaluation of local tropical plants by rumen fermentation and their effects on fermentation end-products. *Pakistan Journal of Nutrition* 5:414-418. <http://www.pjbs.org/pjnonline/ab525.htm>
- NRC. 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th revised edition. National Academy of Sciences, Washington. DC.
- Pell, A.N. and P. Schofield. 1993. Computerized Monitoring of Gas Production to Measure Forage Digestion *In Vitro*. *Journal of Dairy Science* 76:1063-1073. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8486838>.
- Pinares-Patiño, C. S. 2014. Mitigación de las emisiones de metano entérico de sistemas ganaderos al pastoreo. Primera conferencia de gases de efecto invernadero en sistemas agropecuarios de Latinoamérica (GALA). Gobierno de Chile / Ministerio de Agricultura/ INIA REMEHIE. 32 p. [En línea] Disponible en <http://www2.inia.cl/medios/biblioteca/serieactas/NR40147.pdf> (revisado el 25 de abril de 2017).
- Posada, S.L y R. Noguera R., 2005) técnica *in vitro* de producción de gases: una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. *Livestock Research for Rural Development*. 17:36. <http://www.lrrd.org/lrrd17/4/posa17036.htm>.
- Ramírez R., Pizzani P., Martino G. de., 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*, Vol. 35, No.1, 99-108.
- Ranilla, M.J. y Carro, M.D. 2000. Utilización de ácidos orgánicos en la alimentación de rumiantes. *Mundo ganadero*.

- Rodríguez C, J.A., 2009. Aislamiento y caracterización *in vitro* de una bacteria acetogénica ruminal. Tesis de Maestría. Colegio de Posgraduados. Programa de Ganadería. Montecillo, Texcoco, EDO. México. pp: 62-63
- Rodríguez, M.M., 2013. Caracterización de bacterias fibrolíticas como potenciales probióticos para rumiantes. Tesis. Licenciatura. Instituto de Investigaciones Biológicas. Clemente Estable.
- Rorales M., 1996. In vitro assessment of the nutritive value of mixtures of leaves from tropical fodder trees. Tesis de Doctorado Department of Plant Sciences, Oxford University, UK. 214 pp
- Russell, J.B., D. O'Connor J., G. Fox D., J. Van Soest P. and J. Sniffen C., 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. ruminal fermentation. *Journal of Animal Science* 70:3551-3561.
- Sánchez M., J.A. 2010. Evaluación de efectos biológicos y mecanismos de acción de la urea protegida para rumiantes. Tesis. Dr. En Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México.
- Tajima, K., S. Arai, K. Ogata, T. Nagamine, H. Matsui M. Nakamura, R. Aminov, and Y. Benno, 2000. Rumen bacterial community transition during adaptation to high-grain diet. *Anaerobe* 6:273-284.
- Valenciaga D., O.O., B. Chongo y A. Oramas, 2006. Efecto del tiempo de reposo en la degradabilidad ruminal *in situ* del complejo lignocelulósico y la producción de gas *in vitro* del Clon Cuba CT.115 (*Pennisetum purpureum* sp.). *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 40(1):71-81.