



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE CHIAPAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**



Evaluación de la técnica de gas *in vitro* para estimar gases
efecto invernadero *in vivo* en ovinos

TESIS

que para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y SUSTENTABILIDAD

presenta

ROSELIA RAMÍREZ DÍAZ PS1539

Director de tesis

DR. RENÉ PINTO RUIZ

Codirector de tesis

DR. LUIS ALBERTO MIRANDA ROMERO

Villaflores, Chiapas, México; noviembre de 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIAPAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS, CAMPUS V.
DIRECCIÓN



Villaflores, Chiapas
12 de noviembre de 2021
Oficio N° D/0380/21

C. ROSELIA RAMÍREZ DÍAZ
DOCTORANTE EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y SUSTENTABILIDAD
DE LA FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS CAMPUS V
P R E S E N T E.

En atención a que usted ha presentado los votos aprobatorios del Honorable Jurado, designado para su evaluación de posgrado, de la tesis titulada: **“EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA DE GAS *in vitro* PARA ESTIMAR GASES EFECTO INVERNADERO *in vivo* EN OVINOS”**, por este conducto le comunico que se le autoriza la impresión del documento, de acuerdo a los lineamientos vigentes de la Universidad.

Sin otro particular, le envío un cordial saludo.

FACULTAD DE
CIENCIAS AGRONÓMICAS

ATENTAMENTE
“POR LA CONCIENCIA DE LA NECESIDAD DE SERVIR”



M. C. CARLOS ALBERTO VELÁZQUEZ SANABRIA
ENCARGADO DE LA DIRECCIÓN

C. c. p. Archivo

CAVS*MARH.

Carretera Ocozocoautla-Villaflores Km. 84.5 C.P. 30470 Villaflores, Chiapas. Teléfono y Fax 01 (965) 65 2 14 77, 65 5 32 72
Correo electrónico: fac.agronomicas@unach.mx



Código: FO-113-09-05

Revisión: 0

CARTA DE AUTORIZACIÓN PARA LA PUBLICACIÓN ELECTRÓNICA DE LA TESIS DE TÍTULO Y/O GRADO.

El (la) suscrito (a) Roselia Ramírez Díaz,
Autor (a) de la tesis bajo el título de "Evaluación de la técnica de gas in vitro para estimar gases efecto invernadero in vivo en ovinos"
presentada y aprobada en el año 2021 como requisito para obtener el título o grado de Doctora en Ciencias Agropecuarias y Sustentabilidad, autorizo a la Dirección del Sistema de Bibliotecas Universidad Autónoma de Chiapas (SIBI-UNACH), a que realice la difusión de la creación intelectual mencionada, con fines académicos para que contribuya a la divulgación del conocimiento científico, tecnológico y de innovación que se produce en la Universidad, mediante la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

- Consulta del trabajo de título o de grado a través de la Biblioteca Digital de Tesis (BIDITE) del Sistema de Bibliotecas de la Universidad Autónoma de Chiapas (SIBI-UNACH) que incluye tesis de pregrado de todos los programas educativos de la Universidad, así como de los posgrados no registrados ni reconocidos en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad del CONACYT.
- En el caso de tratarse de tesis de maestría y/o doctorado de programas educativos que sí se encuentren registrados y reconocidos en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), podrán consultarse en el Repositorio Institucional de la Universidad Autónoma de Chiapas (RIUNACH).

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas; a los 16 días del mes de noviembre del año 2021.

Roselia Ramírez Díaz

Nombre y firma del Tesista o Tesistas

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Chiapas, en particular la Facultad de Ciencias Agronómicas, Campus V, institución en la que realicé todos mis estudios profesionales (desde 2006) y después de tantos aprendizajes, en 2021 concluyo mi formación académica con el Doctorado en Ciencias en Agropecuarias y Sustentabilidad.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo de beca para realizar estudios de Doctorado en Ciencias en Agropecuarias y Sustentabilidad, durante el periodo 2018-2021.

Al Instituto de Ciencia, Tecnología e Innovación del Estado de Chiapas (ICTI) por el apoyo de la Beca Tesis Posgrado 2021.

Al programa de Doctorado en Ciencias Agropecuarias y Sustentabilidad.

Al Dr. René Pinto Ruiz, por toda su enseñanza, dedicación y compromiso que adquirió en mi formación por más de 11 años. Su enseñanza trascendió de más allá de transmitir conocimiento, me inspiró para ser mejor cada día, siguiendo su ejemplo. Gracias.

Al Dr. Luis Alberto Miranda Romero, por su guía durante todo el proceso doctoral, quién desde la distancia me acompañó en este camino, fortaleciendo el trabajo y mi formación.

A los Doctores Deb Raj Aryal, Francisco Guevara Hernández y David Hernández Sánchez, por su asesoramiento y fortalecimiento el trabajo de investigación.

A los integrantes del Cuerpo Académico en Agroforestería Pecuaria, maestros que contribuyeron con consejos, recomendaciones e incluso porras para la culminación de este gran proyecto.

CONTENIDO GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS	II
ÍNDICE DE FIGURAS	III
RESUMEN	IV
ABSTRACT	VI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Objetivos específicos	3
1.2 Hipótesis	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 Emisión de gases efecto invernadero emitidos por rumiantes	4
2.3 Técnicas para estimar la emisión de metano.....	5
2.3.1 Cámaras respiratorias	5
2.3.2 Hexafluoruro de azufre (SF ₆).....	6
2.3.3 Técnicas micrometeorológicas	7
2.3.4 Modelos matemáticos.....	8
2.3.5 Cálculos de inventario del Panel Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (IPCC).....	8
2.3.6 Técnica de producción de gas <i>in vitro</i> y su aplicación en la estimación de gases efecto invernadero	9
3. MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1 Características del área de estudio.....	11
3.2 Prueba de ensayo y ajuste 1. Efecto del método de extracción de líquido ruminal en la técnica de gas <i>in vitro</i>	11

3.2.1 Tratamientos experimentales	12
3.2.2 Sustrato	12
3.2.3 Extracción de líquido ruminal.....	12
3.2.4 Fermentación y degradación ruminal <i>in vitro</i>	13
3.2.5 Análisis estadístico	14
3.3 Prueba de ensayo y ajuste 2. Predicción de metano de <i>Leucaena collinsii</i> y <i>Guazuma ulmifolia</i> por cromatografía de gases y gas <i>in vitro</i>	15
3.3.1 Selección y obtención de los frutos evaluados	15
3.3.2 Producción de gas <i>in vitro</i>	15
3.3.2 Determinación de la producción de metano	16
3.3.3 Análisis químico de los frutos arbóreos tropicales	16
3.3.4 Parámetros de fermentación <i>in vitro</i>	17
3.3.6 Análisis estadístico	17
3.4 Correlación de metano de dietas con diferentes niveles de forraje-concentrado obtenido por cromatografía de gases con metano por la Técnica de Producción de gas <i>in vitro</i>	19
3.4.1 Análisis químico de dietas con distinta proporción de forraje-concentrado	19
3.4.2 Cinética, fracciones de fermentación y degradación de la materia seca por la técnica de gas <i>in vitro</i>	19
3.4.3 Determinación de la producción de metano.	20
3.4.4 Tratamientos experimentales y variables evaluadas	20
3.4.5 Análisis estadístico.	20
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
4.1 Prueba de ensayo y ajuste 1. Efecto del método de extracción de líquido ruminal en la técnica de gas <i>in vitro</i>	23
4.2 Prueba de ensayo y ajuste 2. Predicción de metano de <i>Leucaena collinsii</i> y <i>Guazuma ulmifolia</i> por cromatografía de gases y gas <i>in vitro</i>	24

4.2.1 Producción de metano de frutos arbóreos tropicales.....	24
4.3 Correlación de metano de dietas con diferentes niveles de forraje-concentrado obtenido por cromatografía de gases con metano por la Técnica de Producción de gas <i>in vitro</i>	33
5. CONCLUSIONES	38
6. LITERATURA CITADA.....	39

ÍNDICE DE CUADROS

Núm.		Pág.
1	Dietas con distinta proporción de forraje-concentrado (%).....	19
2	Efecto de LR obtenido por cánula y sonda oro-ruminal sobre la degradación de la materia seca, parámetros y fracciones de fermentación de harina de <i>Elaeis guineensis</i>	24
3	Estimación de metano (mL g ⁻¹ de sustrato) por cromatografía de gases y la técnica de producción de gas <i>in vitro</i> de frutos arbóreos del trópico seco.....	26
4	Modelos de regresión simple entre las técnicas de estimación de metano por cromatografía de gases y la técnica de producción de gas <i>in vitro</i>	27
5	Composición química de frutos arbóreos del trópico seco (%).....	29
6	Parámetros de la cinética y fracciones de fermentación <i>in vitro</i> de frutos arbóreos tropicales del trópico seco.....	30
7	Correlación de la composición química, cinética y fracciones de fermentación con metano por técnica de gas <i>in vitro</i> y cromatografía de gases.....	32
8	Composición química (%) de dietas con diferentes proporciones de forraje-concentrado.....	33
9	Parámetros de la cinética de fermentación y degradación <i>in vitro</i> de dietas con diferente nivel de forraje-concentrado (%).....	34
10	Fracciones de fermentación (g kg ⁻¹ de materia seca) <i>in viro</i> de dietas con diferente proporción de forraje-concentrado (%).....	35
11	Modelos matemáticos para estimar metano entérico en rumiantes.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Núm.		Pág.
1	Correlación entre metano estimado por cromatografía de gases y la técnica de gas <i>in vitro</i> de frutos arbóreos del trópico seco.....	25

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue evaluar la técnica de producción de gas *in vitro* como una herramienta para predecir gases efecto invernadero en rumiantes. Para obtener resultados precisos, también se evaluó el efecto de la técnica de extracción de líquido ruminal por sonda oro-ruminal en los resultados derivados de la técnica de producción de gas *in vitro* (TPG). La harina de *Elaeis guineensis* se utilizó como sustrato. El líquido ruminal se obtuvo de dos formas: de animales canulados y sonda oro-ruminal. Se estimó la degradación de la materia seca (DGRMS), parámetros de la cinética de fermentación y volumen fraccional por la TPG. La comparación de medias se realizó utilizando el procedimiento de Tukey ($P < 0.05$). Los resultados indicaron la falta de diferencias estadísticas significativas ($P > 0.05$). Por otro lado, se realizó una prueba de ajuste y ensayo en el cual se predijo metano de frutos arbóreos por cromatografía de gases y metano obtenido a partir de la captura de bióxido de carbono por hidróxido de potasio (KOH) en la técnica de producción de gas *in vitro*. Los sustratos fueron frutos de *Leucaena collinsii* y *Guazuma ulmifolia*. A los frutos se realizó un análisis químico (materia seca, proteína cruda, materia orgánica, fibra detergente neutra, fibra detergente ácido, fenoles totales y taninos condensados) y parámetros de fermentación *in vitro* (volumen máximo, tasa y fase lag). Se utilizó un diseño completamente al azar. La comparación de medias se realizó utilizando el procedimiento de Tukey ($P < 0.05$) y se hizo un análisis de correlación y regresión para conocer las ecuaciones y los coeficientes de determinación (R^2) entre CH_4 por cromatografía de gases y estimación de CH_4 a partir de la técnica de producción de gas *in vitro*. Se encontró una tendencia entre la estimación de metano por cromatografía de gases y por la técnica de producción de gas *in vitro*, en el cual el fruto de *G. ulmifolia* presentó menor emisión de metano ($P < 0.05$). En el análisis de correlación se observó que ambas técnicas se correlacionan positiva y significativamente ($R = 0.99.89$, $P = 0.000003$). En un tercer experimento, el metano producido en la fermentación de dietas con diferentes niveles de forraje-concentrado y medido por cromatografía de gases se correlacionó con el estimado por la técnica de producción de gas *in vitro*. Se obtuvieron nueve modelos matemáticos para predecir CH_4 . Los mejores coeficientes de determinación (R^2) se obtuvieron con los modelos

que incluyeron la proporción de F:C, composición química, fracciones de fermentación y parámetros de fermentación de las dietas. Se concluye que, la técnica de extracción de líquido ruminal no modificó la DGRMS, los parámetros y fracciones de fermentación de *Elaeis guineensis*, por lo que el método de extracción se puede usar indistintamente, por otro lado, el fruto de *G. ulmifolia* emitió menor cantidad de metano y la técnica de gas *in vitro* es promisorio para la determinación de metano de frutos de *Leucaena collinsii* y *Guazuma ulmifolia* con respecto a la técnica convencional de referencia, cromatografía de gases. A partir de los modelos matemáticos se puede predecir la emisión de metano por cromatografía de gases a partir de la técnica de producción de gas *in vitro*. Los modelos más precisos son los que consideran la calidad nutritiva, fracciones y parámetros de fermentación. Sin embargo, se recomienda validar los modelos matemáticos.

Palabras claves: metano, predicción, correlación, degradación, fermentación.

ABSTRACT

The objective of the work was to evaluate the *in vitro* gas production technique as a tool to predict greenhouse gases in ruminants. To obtain precise results, the effect of the ruminal fluid extraction technique by oro-ruminal probe on the results derived from the *in vitro* gas production (TPG) technique was also evaluated. *Elaeis guineensis* flour was used as a substrate. The ruminal fluid was obtained in two ways: from cannulated animals and oro-ruminal probe. Dry matter degradation (DGRMS), fermentation kinetic parameters and fractional volume were estimated by TPG. The comparison of means was carried out using the Tukey procedure ($P < 0.05$). The comparison of means was carried out using the Tukey procedure ($P < 0.05$). The results indicated the lack of significant statistical differences ($P > 0.05$). On the other hand, an adjustment and trial test was carried out in which methane from arboreal fruits was predicted by gas chromatography and methane obtained from the capture of carbon dioxide by Potassium Hydroxide (KOH) in the Technique of production of *in vitro* gas. The substrates were fruits of *Leucaena collinsii* and *Guazuma ulmifolia*. The fruits were subjected to a chemical analysis (dry matter, crude protein, organic matter, neutral detergent fiber, acid detergent fiber, total phenols and condensed tannins) and *in vitro* fermentation parameters (maximum volume, rate and lag phase). A completely randomized design was used. The comparison of means was carried out using the Tukey procedure ($P < 0.05$) and a correlation and regression analysis was made to know the equations and the determination coefficients (R^2) between CH_4 by gas chromatography and estimation of CH_4 from the *in vitro* gas production technique. A trend was found between the methane estimation by gas chromatography and by the *in vitro* gas production technique, in which the *G. ulmifolia* fruit presented lower methane emission ($P < 0.05$). In the correlation analysis, it was observed that both techniques were positively and significantly correlated ($R = 0.99.89$, $P = 0.000003$). In a third experiment, methane from diets with different forage levels was correlated: concentrate obtained by gas chromatography with methane by the *in vitro* Gas Production Technique and nine mathematical models were obtained to predict CH_4 . The best coefficients of determination (R^2) were obtained from the models that included

the F: C ratio, chemical composition of the diets, fractions and fermentation parameters. It is concluded that the ruminal liquid extraction technique did not modify the DGRMS, the parameters and fermentation fractions of *Elaeis guineensis*, therefore, the extraction method can be used interchangeably, on the other hand, the fruit of *G. ulmifolia* emitted less methane and the *in vitro* gas technique is promising for the determination of methane from *Leucaena collinsii* and *Guazuma ulmifolia* fruits compared to the conventional reference technique, gas chromatography. From mathematical models, the emission of methane can be predicted by gas chromatography from the *in vitro* gas production technique. The most accurate models are those that consider nutritional quality, fractions and fermentation parameters. However, it is recommended to validate the mathematical models.

Keywords: methane, prediction, correlation, degradation, fermentation

1. INTRODUCCIÓN

Las actividades antropogénicas han generado el aumento en la emisión de gases efecto invernadero (GEI) y acelerado el calentamiento global (Mendoza *et al.*, 2020; Chassoul *et al.*, 2017). El dióxido de carbono (CO₂), el metano (CH₄) y el óxido nitroso (N₂O) son los principales GEI (Gao *et al.*, 2019). De ellos, se ha estimado que las actividades agrícolas y pecuarias emiten 25% de los flujos de CO₂, 55-60% del total de las emisiones de CH₄, y 65-80% de los flujos de N₂O (Santillán *et al.*, 2016) siendo el sector ganadero el principal responsable de las emisiones de CH₄ (Ugbogu *et al.*, 2019).

El metano es un producto de la fermentación ruminal de los alimentos y constituye una pérdida de energía del alimento consumido que repercute en la producción animal. En términos ambientales, el metano contribuye al calentamiento y cambio climático global (Yáñez *et al.*, 2016). La producción de CH₄ en los rumiantes está determinada por el consumo, selectividad del alimento por parte de los animales y, la composición química de la dieta (Martínez, 2019; Valencia y Rojas, 2019).

Para conocer la emisión de metano se han propuestos métodos *in situ*, *in vivo* e *in vitro*, considerándose más exactos los métodos *in vivo* (Rodríguez *et al.*, 2019). Entre los métodos *in vivo* destacan la técnica del gas trazador hexafluoruro de azufre (SF₆), cámaras respiratorias y técnicas micrometeorológicas (Islam y Lee, 2019; Okpara, 2019), pero su implementación es limitada debido a ser muy laboriosas y al costo alto por la adquisición, establecimiento y mantenimiento del equipo específico como el cromatógrafo de gases (Ribessi *et al.*, 2020; Storm *et al.*, 2012; Islam y Lee, 2019; Crosby-Galván y Ramírez-Mella, 2018). Aunque las técnicas *in vivo* se han utilizado en diversas investigaciones, éstas se centran en lugares específicos que limita la evaluación integral de los alimentos de manera global (Ribessi *et al.*, 2020).

En contraste, las técnicas *in vitro* son prácticas y de bajo costo (Danielsson *et al.*, 2017). La técnica de producción de gas (TPG) *in vitro* se ha utilizado ampliamente para evaluar la cinética de fermentación de los alimentos, fracciones de fermentación, degradación de la materia seca y, recientemente, para predecir la producción de metano (Ramírez *et al.*, 2020; Jiménez-Santiago *et al.*, 2019; Danielsson *et al.*, 2017;

Blummel *et al.*, 2005). Para esto último se ha medido el metano directamente por cromatografía, e indirectamente mediante atrapar el bióxido de carbono de la mezcla de gases, con una solución de hidróxido de potasio para posteriormente medir el gas residual constituido por más del 70% de metano (REF). Son escasos los estudios en los que se compare la determinación de metano por este último método con otro de referencia como la cromatografía de gases (REF), aunque existe la necesidad de correlacionar la estimación de metano por cromatografía de gases con técnicas alternativas de menor costo (Garnsworthy *et al.*, 2019; Difford *et al.*, 2018; Huhtanen *et al.*, 2015). Se ha demostrado que se pueden crear modelos matemáticos para estimar la emisión de metano a partir de la correlación entre datos una técnica menos costosa y precisa con datos obtenidos por cromatografía de gases (Ribessi *et al.*, 2020), lo que permitirá realizar estudios a mayor escala y conocer las emisiones de metano de rumiantes en diferentes sistemas de producción con datos confiables, factibles y de bajo costo (Jonker *et al.*, 2020; Sorg *et al.*, 2018). Por ello, generar un modelo matemático que permita estimar la emisión de metano entérico con la TPG fomentaría el número de investigaciones a nivel global y obtener un inventario de emisiones de metano emitidos por rumiantes; así también se podrían establecer índices que permitan calcular de forma precisa la emisión de GEI (Eugéne *et al.*, 2019).

Por otro lado, se recomienda utilizar animales canulados como donadores del inóculo ruminal, para la TPG (Vargas-Bayona *et al.*, 2013), lo que también limita su implementación en diversos laboratorios, principalmente por el costo que implica la cirugía, las instalaciones apropiadas para el cuidado, el manejo sanitario y alimenticio de los animales (Martín *et al.*, 2005) por lo qué, debe considerarse las ventajas del uso de sondas oro-ruminal para obtener líquido ruminal de animales no canulados.

Por lo anterior, el objetivo general fue evaluar la Técnica de Producción de Gas *in vitro* como una herramienta para predecir la emisión de gases efecto invernadero en rumiantes.

1.1 Objetivos específicos

- a) Evaluar y comparar los resultados obtenidos en la técnica de gas *in vitro* al utilizar líquido ruminal obtenido por cánula o sonda oro-ruminal.
- b) Comparar la predicción de metano de *Leucaena collinsii* y *Guazuma ulmifolia* por cromatografía de gases y metano obtenido a partir de la captura de bióxido de carbono por Hidróxido de Potasio (KOH) en la Técnica de producción de gas *in vitro*.
- c) Correlacionar metano obtenido por cromatografía con metano obtenido a partir de la captura de dióxido de carbono por Hidróxido de Potasio (KOH) con dietas con diferentes niveles de forraje-concentrado con la Técnica de Producción de gas *in vitro*.

1.2 Hipótesis

La Técnica de Producción de Gas *in vitro* es útil y confiable para estimar el impacto ambiental por la emisión de gases efecto invernadero en la producción de rumiantes.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Emisión de gases efecto invernadero emitidos por rumiantes

La acumulación de gases efecto invernadero (GEI) ha provocado problemas ambientales y ha dado origen al cambio climático (Cardona-Iglesias *et al.*, 2017). Las actividades antropogénicas como la producción agropecuaria y especialmente la ganadería con rumiantes, está estrechamente relacionada con el calentamiento global (Ku, 2019). Se estima que los rumiantes contribuyen con aproximadamente 115 millones de toneladas de metano (CH_4) al año (Sandoval-Pelcastre *et al.*, 2020). En los rumiantes, las emisiones de metano se originan de la fermentación entérica y es liberado a través de eructos (Hook *et al.*, 2010; Verge *et al.*, 2007), mientras que las emisiones de bióxido de carbono provienen de la respiración animal (metabolismo de nutrientes) y una parte (alrededor del 20%) de la respiración microbiana en el rumen (Vermorel, 1995). La producción de GEI por fermentación entérica está estrechamente relacionada con el consumo del alimento, calidad nutritiva digestibilidad, procesamiento previo del alimento y frecuencia de alimentación (Alayón-Gamboa *et al.*, 2018; Yáñez *et al.*, 2016; Bonilla y Lemus, 2012). En este sentido, se menciona que los alimentos que se degradan más lentamente (como los carbohidratos estructurales) producen más metano que aquellos que se fermentan a tasas más rápidas (Eun *et al.*, 2004), esto se debe a que la fibra favorece a la metanogénesis ruminal, debido a la reducción de la pasa de pasaje, incrementado la fermentación y la producción de ácido acético e hidrógeno (Montenegro-Ballesteros *et al.*, 2020). Por lo que, los principales determinantes de la producción diaria de metano, son la ingesta de materia seca y la composición de la dieta: cuanto más alimento se consume y/o mayor es el contenido de fibra de la dieta, más metano se produce por día (Garnsworthy *et al.*, 2019). Esta situación ha llevado a la búsqueda de alternativas alimenticias que permitan reducir las emisiones de metano y por tanto su impacto en el medio ambiente (Alejos *et al.*, 2018).

2.3 Técnicas para estimar la emisión de metano

La medición objetiva de metano es importante para desarrollar y evaluar las estrategias de mitigación, así como para realizar inventarios nacionales de emisión de GEI (Jaurena *et al.*, 2019). Existen técnicas *in vivo* e *in vitro* que permiten estimar la eficiencia de las estrategias de mitigación de la metanogénesis ruminal (Soliva y Hess, 2007), entre las que destacan las cámaras de respiración, el trazador SF₆, técnicas micrometeorológicas y estimación de metano por modelos matemáticos predictivos (Yáñez *et al.*, 2016; Patra, 2016; Storm *et al.*, 2012). Estas técnicas difieren en su aplicación, costo, exactitud y precisión.

2.3.1 Cámaras respiratorias

Las cámaras de ambiente controlado o de respiración se han usado desde hace más de 115 años (Armsby, 1903). Inicialmente se utilizaron para conocer el metabolismo energético en rumiantes, sin embargo, en las últimas décadas se ha empleado para estimar la emisión de GEI, principalmente de CH₄ (Robinson *et al.*, 2020). Existen variantes de este método, como las cámaras de cabeza (head box systems), politúneles y cámaras herméticas (Place *et al.*, 2011). Es importante señalar que, en este método, se debe minimizar la pérdida de aire del sistema o la entrada de aire del exterior.

Las cámaras de respiración se utilizan para cuantificar la producción de metano, dióxido de carbono, consumo de oxígeno, y en algunos casos producción de hidrógeno (Gardiner *et al.*, 2015). El principio de funcionamiento de esta técnica consiste en coleccionar todo el aire exhalado y eructado, y medir la concentración de los GEI junto con el flujo de aire del sistema (Brouček, 2014). En esta técnica, es necesario controlar y corregir el flujo y concentración de humedad, temperatura y presión. Estas correcciones son fundamentales debido a sus efectos sobre el volumen de gas, así mismo, se debe considerar el contenido de metano en el aire, antes y después de las pruebas (Hammond *et al.*, 2016). En este sistema se pueden realizar mediciones continuas (24h) de un individuo por varios días (7 días secuenciales) (Schwarm *et al.*, 2015). Sin embargo, es necesario que los animales tengan un periodo de adaptación,

lo que permitirá disminuir el estrés en los animales y evitar sesgos en las mediciones (Storm *et al.*, 2012).

Las cámaras de respiración están calibradas para ser exactas y es considerada como una técnica estándar para evaluar métodos alternativos de medición de GEI (Philip *et al.*, 2019). No obstante, su implementación es limitada, debido, principalmente al alto costo de instalación (Roman y Hernández-Medrano, 2016).

2.3.2 Hexafluoruro de azufre (SF₆)

La técnica del trazador hexafluoruro de azufre (SF₆) fue desarrollada por Zimmerman (1993) y el primer uso reportado para estimación de CH₄ de rumiantes fue por Johnson *et al.* (1994). El SF₆ es utilizado como un gas marcador (no tóxico, inerte y estable) y consiste en suministrar a los animales capsulas intraruminales por medio de una sonda esofágica como mínimo 15 días previos al primer muestreo (Montenegro-Ballester y Barrantes-Guevara, 2016). El SF₆ que se libera en forma lenta y con una tasa de liberación conocida. Durante la etapa de medición se colectan muestras del aire exhalado y eructado por los animales, por succión, mediante una línea de muestreo conectada a través de una columna reguladora de flujo, a un tanque o recipiente que se encuentra al vacío (Johnson *et al.*, 1994). Las muestras se analizan por cromatografía gases (Rodríguez *et al.*, 2019).

Esta técnica se ha utilizado ampliamente para realizar estudios con animales en pastoreo, con periodos de evaluación de 24 h por cinco días consecutivos (Moscoso *et al.*, 2017), sin embargo, se ha reportado que el tamaño del equipo influye significativamente sobre el comportamiento de los animales, por lo que, se recomienda adecuar el tamaño del equipo de acuerdo a la especie y tamaño de los animales (Pinares-Patiño y Clark, 2008). Así mismo, se recomienda realizar la calibración del equipo cada 30 a 90 días y calcular la tasa de liberación de SF₆ (1 y 4 mg SF₆ día⁻¹ para ovinos y bovinos, respectivamente; Deighton *et al.*, 2014; Pinares-Patiño *et al.*, 2011).

Por otro lado, la estimación de CH₄ por SF₆ se ha comparado con los obtenidos por cámaras respiratorias (técnica de referencia) y se ha reportado concordancia estadística y resultados comparables entre sí (Pinares-Patiño y Clark, 2008; Johnson

et al., 2007). Sin embargo, las emisiones de metano obtenidas con SF₆ son generalmente menores a las de las cámaras respiratorias (Harper *et al.*, 2011). Las subestimaciones con la técnica SF₆ pueden ser explicadas, al no considerar las emisiones de las excretas de los animales (Hindrichsen *et al.*, 2005).

2.3.3 Técnicas micrometeorológicas

Las técnicas micrometeorológicas son del tipo no intrusivo y permiten las mediciones de metano, y otros gases, en condiciones representativas de manejo y alimentación y a nivel de grupos de animales, sin embargo, el área de medición es dependiente de la velocidad y dirección del viento (McGinn, 2013; Harper *et al.*, 2011). El uso de estas técnicas permite obtener emisiones promedio en condiciones naturales y representativas de manejo, que es un requerimiento en los inventarios nacionales de GEI (McGinn *et al.*, 2006). Entre las técnicas micrometeorológicas está la denominada Covarianza de Vórtices (EC, por sus siglas en ingles), que permite cuantificar los flujos de GEI a escala de ecosistema (Baldocchi, 2003) y permite captar la variabilidad temporal de los flujos de gases. Esta técnica se ha utilizado para medir metano con animales en pastoreo (Felber *et al.*, 2015; Tomkins *et al.*, 2011) y estabulados (Prajapati y Santos, 2017; Sun *et al.*, 2015; Baum *et al.*, 2008). La técnica requiere de condiciones de homogeneidad de las fuentes de emisión, topografía plana y flujo del viento sin obstáculos (Verma, 1990; Baldocchi *et al.*, 1988). El área muestreada por esta técnica, pueden oscilar desde cientos de metros hasta varios kilómetros, lo que permite integrar la variabilidad espacial que suelen mostrar las diversas fuentes de GEI que integran los agroecosistemas.

No obstante, existen factores que alteran los datos obtenidos por esta técnica, entre las que destacan los factores que no son manejables como la velocidad y dirección del viento, nivel de turbulencia y estabilidad de la atmósfera, por lo que la sensibilidad de las emisiones calculadas disminuye (McGinn, 2013), por ello, se debe aplicar correcciones para cumplir con los estándares de calidad requeridos (Foken *et al.*, 2012).

2.3.4 Modelos matemáticos

Se ha demostrado que se puede calcular la emisión de metano entérico a partir de modelos matemáticos. Para ello, se requiere conocer la composición química de la dieta, parámetros de digestibilidad y alimento ingerido por los animales (Restrepo *et al.*, 2016), así como las características de los animales (peso vivo, condición corporal, estado fisiológico, especie y raza).

Por su parte, Feldkamp *et al.* (2014), mencionan que modelos matemáticos utilizados para calcular las emisiones del ganado estiman la cantidad de metano generada en el rumen en base al consumo de materia seca del animal y al factor Y_m que indica la fracción de la energía bruta ingerida que es transformada en metano en el tracto gastrointestinal.

En los últimos años, se han publicado diversos trabajos de investigación con el objeto de lograr modelos predictivos que permitan obtener el cálculo de las emisiones de metano (Charmley *et al.*, 2015; Cambra López *et al.*, 2008; Ellis *et al.*, 2007; Mills *et al.*, 2003), lo que ha permitido predecir la producción de metano para grandes regiones o países. En este sentido, el Panel Intergubernamental para el Cambio Climático (IPCC; Intergovernmental Panel on Climate Change, por sus siglas en inglés), realiza estimaciones de la emisión de GEI a partir de modelos matemáticos a nivel mundial, lo que ha permitido establecer y evaluar estrategias de mitigación de GEI y su impacto a grandes escalas.

2.3.5 Cálculos de inventario del Panel Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático (IPCC)

El IPCC ha sido el responsable de establecer la técnica de cálculo de los inventarios que permite que los resultados sean comparables a nivel mundial. La aplicación de estos procedimientos requiere de inventarios de poblaciones animales, superficies dedicadas a la actividad, y predecir la cantidad de GEI emitidos por cada unidad.

El IPCC propone tres estrategias de cálculo (Niveles) para estimar las emisiones de CH_4 y N_2O por parte de los rumiantes:

Nivel 1: Método de cálculo simplificado que sólo requiere el tamaño de la población de ganado por especie, subcategoría animal, y el clima de la región, a los cuales se les aplica los FE indicados por el IPCC.

Nivel 2: Este método es más complejo y requiere información detallada sobre las características de los animales o condiciones de producción.

Nivel 3: Se utiliza en algunos países en los que las emisiones del ganado son particularmente importantes, y donde se han desarrollado modelos específicos del país, o empleando métodos basados en mediciones para los FE alternativos y validados propios del país.

El método aplicado depende de la disponibilidad de datos y de las circunstancias nacionales. Independientemente del método elegido, en primer lugar, se debe conocer la población animal por categorías, luego se emplean los valores indicados por el IPCC (Niveles 1 y 2), o se aplican FE específicos del país para cada subcategoría de ganado, según la metodología seleccionada (Nivel 3). Cada gas tiene un potencial de calentamiento global específico, índice que combina la fuerza radiactiva del gas con el tiempo de persistencia en la atmósfera (GWP, Global Warming Potential; índice que mide la fuerza radiativa de un gas por unidad de masa, acumulada a lo largo de un tiempo especificado, relativo al del CO₂). Consecuentemente para contar con una base objetiva y comparable de las emisiones de los diferentes gases, las emisiones se suelen expresar como Emisión de CO₂-equivalente (CO₂eq.) que representa la cantidad de CO₂ emitido que causa la misma fuerza radiactiva integrada sobre un determinado horizonte temporal. El CO₂-eq. se obtiene multiplicando la emisión de los GEI por su GWP para un determinado período de tiempo. Sin embargo, no existe un consenso absoluto sobre cómo transformar los diferentes gases en CO₂-eq (IPCC, 2006).

2.3.6 Técnica de producción de gas *in vitro* y su aplicación en la estimación de gases efecto invernadero

La técnica de producción de gas (TPG) *in vitro* es práctica y de bajo costo (Danielsson *et al.*, 2017). Esta técnica se ha utilizado ampliamente para evaluar el efecto de diferentes forrajes, alimentos, dietas y aditivos en la fermentación ruminal, así como

para determinar la cinética de degradación del alimento a través del volumen de gas liberado, también permite conocer las fracciones de fermentación y analizar modelos para estimar la energía metabolizable, energía neta, digestibilidad de la materia orgánica y biomasa microbiana de los alimentos (Jiménez-Santiago *et al.*, 2019; Martínez-Hernández *et al.*, 2019). No obstante, debido al creciente interés en el Cambio Climático y de la contribución de la ganadería en las emisiones de gases de efecto invernadero, recientemente también se le ha utilizado para estimar CH₄ (Yáñez *et al.*, 2016; Storm *et al.*, 2012), sin embargo, hace falta conocer la viabilidad, reproducibilidad y confiabilidad de la técnica.

Esta técnica, destaca en comparación a las técnicas *in vivo* por la velocidad en obtener los resultados (24 h) y la uniformidad de las condiciones microbiológicas y bioquímicas (Bhatta *et al.*, 2008; Getachew *et al.*, 2005).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Características del área de estudio

La producción de gas *in vitro* y análisis químicos se realizaron en el Laboratorio de Nutrición Animal perteneciente a la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad Autónoma de Chiapas, localizada en el municipio de Villaflores, en la región Frailesca, en Chiapas, México, el cual cuenta con un clima cálido subhúmedo, con lluvias en verano, una precipitación de 1100 mm anuales, y una temperatura media anual de 25 °C. Por otro lado, el metano se determinó en el laboratorio de Cromatografía de gases del Colegio de la Frontera Sur, unidad San Cristóbal de las Casas, Chiapas, localizado en la región Altos a una altitud de 2,120 msnm, con un clima templado subhúmedo con lluvias en verano, una precipitación anual de 1,000 a 2,000 mm y una temperatura media anual de 14.4°C con heladas invernales (INEGI, 2012).

3.2 Prueba de ensayo y ajuste 1. Efecto del método de extracción de líquido ruminal en la técnica de gas *in vitro*

Recientemente se ha utilizado la técnica de gas *in vitro* para estimar gases efecto invernadero por fermentación entérica (Jiménez-Santiago *et al.*, 2019, Ramírez *et al.*, 2020). Sin embargo, para realizar este tipo de investigaciones, es necesario contar con animales canulados para obtener inóculo a partir del líquido ruminal (Vargas-Bayona *et al.*, 2013), lo que limita su implementación en diversos laboratorios, debido a los altos costos de la cirugía, el manejo sanitario de los animales (Martín *et al.*, 2005) y, en algunos casos, la mortalidad post cirugía, debido a la susceptibilidad los animales a enfermedades. Por tal razón se han utilizado otras técnicas para obtener líquido ruminal (LR), como es el uso de la sonda oro-ruminal, la cual es económica, práctica y menos invasiva (Shen *et al.*, 2012). Si bien, el uso de animales canulados para la extracción de LR es considerada una forma convincente con relación a los resultados de los estudios que arroja, también deben considerarse las ventajas del uso de sondas oro-ruminales. Sin embargo, no existe información que indique la eficiencia del método

de extracción de líquido ruminal por sonda oro-ruminal en los resultados derivados de la técnica de gas *in vitro*, pero se demostró su eficacia al obtener muestras ruminales para conocer el desarrollo de poblaciones microbianas del rumen, determinación de ácidos grasos volátiles, minerales y pH (Ramos-Morales *et al.*, 2014, Lourenco *et al.*, 2019). Por lo anterior, se realizó una prueba de ensayo y ajuste con el objetivo de evaluar y comparar los resultados obtenidos en la técnica de gas *in vitro* al utilizar líquido ruminal obtenido por cánula o sonda oro-ruminal.

3.2.1 Tratamientos experimentales

Se evaluaron dos tratamientos experimentales, correspondientes a extracción de líquido ruminal por cánula (T1) y por sonda oro-ruminal (T2). Cada tratamiento contó con nueve repeticiones.

3.2.2 Sustrato

Se utilizó como sustrato harina de palmiste (*Elaeis guineensis*) y fue analizada para determinar materia seca (MS), proteína cruda (PC) según AOAC (2000), fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácida (FDA) de acuerdo con la técnica descrita por Van Soest *et al.* (1991).

3.2.3 Extracción de líquido ruminal

El líquido ruminal (LR) fue extraído de tres ovinos machos canulados (CR) y de tres ovinos por sonda oro-ruminal (SR), todos de la raza Katahdin de 42 ± 1.5 kg y de aproximadamente un año de edad. Los animales se alimentaron con una dieta isoproteíca e isoenergéticas compuesta de 60% de pasto *C. nlemfuensis*, 26% maíz y 14% harina de palmiste, la cual fue formulada para satisfacer sus necesidades nutricionales de acuerdo al NRC (National Research Council) (NRC, 2007) y en todo momento tuvieron un trato de acuerdo con los protocolos de la Ley Federal de Sanidad Animal vigente, NOM-062-ZOO-1999 y bajo las normas de bienestar animal establecidas en la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad Autónoma de

Chiapas. Antes de la extracción de LR, los ovinos tuvieron un periodo de ayuno de 12 h, ello con la finalidad de conseguir un fluido ruminal mas consistente en composición y actividad (Williams, 2000; Posada y Noguera, 2005). Para la extracción de LR por SR se utilizó una manguera de 1.25 m de longitud con un diámetro externo de una pulgada y 3 mm de pared, con perforaciones en el extremo que fue introducido en el saco ruminal, el extremo opuesto se conectó a un matraz kitasato para colectar el LR y el cual a su vez fue conectado a una bomba de succión. Para introducir la sonda, se utilizó un abre bocas metálico cubierto con una banda de caucho para evitar lesiones. Se extrajo 100 mL de LR/ animal/muestreo, el exceso de saliva se retiró previo a usar el LR.

3.2.4 Fermentación y degradación ruminal *in vitro*

La cinética de fermentación, fracciones fermentables y degradación de la materia seca *in vitro* se determinó mediante el procedimiento descrito por Menke y Steigass (1988), para lo cual se usaron frascos color ámbar de 125 mL de capacidad a los que se les colocó 0.5 g de MS de harina de palmiste. Se preparó una solución mineral reducida compuesta de K_2HPO_4 (0.45 g/L), KH_2PO_4 (0.45 g/L), $NaCO_3$ (0.6 g/L), $(NH_4)_2SO_4$ (0.45 g/L), $NaCl$ (0.9 g/L), $MnSO_4$ (0.18 g/L), $CaCl_2$ (0.12 g/L), L-cisteína (0.25 g /L) y Na_2S (0.25 g/L) y se usaron dos fuentes de líquido ruminal, correspondiente a cada método de extracción (cánula y sonda oro-ruminal), posteriormente y bajo un flujo continuo de bióxido de carbono (CO_2), a cada frasco se le agregaron 90 mL de inóculo ruminal diluido (1:10) de acuerdo al tratamiento. La presión del gas producido se midió con un manómetro marca Infra modelo 63100/1-4 (0 a 1 kg cm^{-2}) a 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 54, 60, 66 y 72 horas de incubación. Los valores de presión (kg cm^{-2}) se transformaron a volumen de gas (mL g^{-1} materia seca) con la ecuación de regresión (volumen= presión/0.019 con $R^2=0.98$), y se estimaron los parámetros de la cinética de producción de gas: volumen máximo ($V_{m\acute{a}x}$; mL/g), tasa (S; h) y fase de retardo (L; h), para el modelo logístico $V = V_{m\acute{a}x}/1+e^{(2-4*S*(T-L))}$ (Schofield y Pell, 1995), utilizando el SAS (2011). La degradación *in vitro* de la materia seca (DGRMS) se determinó a 72 h. Se calculó por diferencia entre el peso de la materia seca inicial, antes de ser incubada, y el peso de la materia seca residual

después de 72 h de incubación. Al final del periodo de incubación, el contenido de cada frasco se filtró a través de papel de filtrado previamente pesado. Los papeles con residuo se secaron a 65 °C por 48 h, se pesaron y se restó el peso del papel filtro. Las fracciones de fermentación se obtuvieron mediante el volumen fraccional (Vf) de gas de fermentación producido a tres intervalos de tiempo: 0 h a 8 h (Vf₀₋₈), 8 h a 24 h (Vf₈₋₂₄) y 24 h a 72 h (Vf₂₄₋₇₂) de incubación, que corresponden a carbohidratos solubles, carbohidratos de reserva y carbohidratos estructurales, respectivamente (Sandoval *et al.*, 2016). Estos volúmenes fraccionales (mL g⁻¹) fueron transformados a fracciones (g kg⁻¹) de rápida (FR), media (FM) y lenta (FL) fermentación mediante las siguientes ecuaciones de regresión (Miranda *et al.*, 2015): FR (g kg⁻¹) = Vf₀₋₈/0.4266 (R²=0.9441), FM (g kg⁻¹) = Vf₈₋₂₄/0.6152 (R²= 0.998), FL (g kg⁻¹) = Vf₂₄₋₇₂/0.3453 (R²= 0.9653). Se evaluaron dos tratamientos con nueve repeticiones en cada uno, las cuales fueron obtenidas de los valores medios, productos de la repetición por tres veces consecutivas del experimento, según recomienda Udén *et al.* (2012).

3.2.5 Análisis estadístico

Se realizaron análisis de varianza (ANOVA), considerando el efecto simple del método de obtención del líquido ruminal (LR), utilizando un diseño completamente al azar con dos niveles del factor LR y nueve repeticiones, de acuerdo con el Modelo (1). El análisis se realizó utilizando el Procedimiento General Lineal (PROC GLM) del paquete estadístico SAS (Statistical Analysis System, V. 9.0; 2011). Se reportan la Desviación Estándar de la Media (DE), obtenidos con la instrucción LsMeans.

Las medias de tratamientos fueron comparadas con la prueba de Tukey (P<0.05).

Modelo (1)

$$Y_i = \mu + LR_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde: Y_i = DGRMS, V_{máx}, S, L, FR, FM, FL, FT; LR_i= el efecto del i-ésimo método de extracción de líquido ruminal (LR); ε_{ij} , error aleatorio.

3.3 Prueba de ensayo y ajuste 2. Predicción de metano de *Leucaena collinsii* y *Guazuma ulmifolia* por cromatografía de gases y gas *in vitro*

Se realizó una prueba de ensayo y ajuste con el objetivo de comparar la predicción de metano de los frutos de *L. collinsii* y *G. ulmifolia* por cromatografía de gases y metano obtenido a partir de la captura de bióxido de carbono por Hidróxido de Potasio (KOH) en la Técnica de producción de gas *in vitro*, con la finalidad de generar experiencia en el manejo, transporte y análisis de las muestras, previo a realizar el primer experimento del trabajo de investigación: Correlación de metano de dietas con diferentes niveles de forraje-concentrado obtenido por cromatografía de gases con metano por la técnica de producción de gas *in vitro*.

3.3.1 Selección y obtención de los frutos evaluados

Para la selección de los frutos se consideró su contenido de taninos, pues se conoce que estos metabolitos tienen una importancia en la disminución de GEI (Molina-Botero *et al.*, 2019; Jafari *et al.*, 2020). Los frutos considerados fueron de *Leucaena collinsii* y *Guazuma ulmifolia*, estos se encuentran de manera abundante en la región de estudio (Pinto *et al.*, 2008) y fueron cosechados una vez que estaban fisiológicamente maduros, de manera manual y al azar en distintos árboles. Posteriormente, se depositaron en bolsas de papel con la identificación respectiva y se trasladaron al laboratorio de Nutrición Animal, en donde se deshidrataron a 60 °C en una estufa de aire forzado hasta peso constante.

3.3.2 Producción de gas *in vitro*

La fermentación se realizó utilizando la técnica de producción de gas *in vitro* descrita en el Prueba de ensayo y ajuste 1. El inóculo ruminal se obtuvo de tres ovinos cánulados de la raza Katahdin.

Se realizaron tres series de incubación de manera simultánea, cada serie comprendía tres repeticiones (viales) por cada fruto y fue repetida tres veces a través del tiempo, según recomienda Udén *et al.* (2012).

3.3.2 Determinación de la producción de metano

Para conocer la producción de metano por la técnica de producción de gas *in vitro* y por cromatografía de gases, se midió el gas de fermentación (mL/g) cada seis h durante las primeras 24 h con la primera y segunda serie de incubación.

Para estimar CH₄ por la técnica de producción de gas *in vitro* (TPG), se estimó el metano más gases menores (CH₄+GM). Para ello, al gas de fermentación se le realizó la separación del CO₂ por medio de una trampa (frasco de vidrio herméticamente sellado con tapón de hule y aro de aluminio) que contenía 40 mL de hidróxido de potasio (KOH) a una concentración de uno molar y una dilución de 56.10 g de KOH en un litro de agua destilada (Bartha y Pramer, 1965). El volumen residual fue considerado como ml de CH₄+GM y fueron ajustados como metano teórico (CH₄) multiplicando cada valor por 0.77 (Moate *et al.*, 1997).

Por otro lado, para estimar CH₄ por cromatografía de gases, el gas de fermentación que se obtuvo de la fermentación de los frutos cada 6 h por 24 h, se colocó al vacío en viales estériles que contenían una solución salina saturada con NaCl, en los que se conservó y traslado para su posterior análisis. Para cuantificar la producción de CH₄ se utilizó un cromatógrafo de gases marca Agilent Modelo 7890 B GC, con inyección manual que posee un detector de ionización por llama (FID, flame ionization detector), Software Versión 01.07SR2, diámetro de columna 2 mm y 1.83 m de largo, con una temperatura de inyección de 75 °C. Se inyectaron 3 mL de gas de fermentación de cada una de las 12 muestras analizadas. En ambos métodos de estimación de metano, las concentraciones de este gas se corrigieron restando la producción de metano promedio de tres blancos. La producción de CH₄ se expresó en ml de CH₄/g de MS.

3.3.3 Análisis químico de los frutos arbóreos tropicales

Se midió el contenido de materia seca (MS) de los frutos arbóreos en una estufa de aire forzado a 55 °C por 48 h (peso constante) según la NOM-116-SSA1-1994,

posteriormente fueron molidos en un molino tipo Wiley con malla de 1 mm (Thomas Wiley Mill 4-1/2). Se determinó el contenido de proteína cruda (PC), de materia orgánica (MO) y cenizas (Ce) siguiendo la metodología descrita por la AOAC (2000). También se analizaron los valores de Fibra Detergente Neutro (FDN) y Fibra Detergente Acido (FDA) (Van-Soest *et al.*, 1991) y la presencia de Fenoles Totales (FT) y Taninos Condensados (TC) (Makkar, 2003).

3.3.4 Parámetros de fermentación *in vitro*

Para explicar el comportamiento en la producción de metano derivado de la *técnica in vitro*, se evaluaron los parámetros de fermentación *in vitro* con las muestras de la tercera serie de incubación. Para conocer los parámetros de fermentación, la presión de gas se midió con un manómetro marca Infra modelo 63100/1-4 (0 a 1 kg/cm²) a 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 34, 40, 48, 54, 60 y 72 h de incubación y se estimaron los parámetros de la cinética de producción de gas: volumen máximo (Vmáx; mL/g), tasa (S; h) y fase lag (L; h).

3.3.5 Tratamientos experimentales y variables evaluadas

Se evaluaron dos técnicas de medición de metano entérico, que correspondieron a cromatografía de gases (T1) y Técnica de producción de gas *in vitro* (T2). Se utilizaron frutos de *Leucaena collinsii* y *Guazuma ulmifolia* y a estos se les estimó MS, MO, Ce, PC, FDN, FDA, FT, TC, Vmáx, S, L, FR, FM, FL y FT.

3.3.6 Análisis estadístico

3.3.6.1. Análisis de varianza y prueba de medias. Se realizaron ANOVA considerando el efecto del tipo de fruto (TF), de acuerdo con el Modelo (2); posteriormente se analizaron los efectos simples y combinatorios de la técnica de medición (Tec) y TF, considerando 9 repeticiones por tratamiento. Se utilizaron diseños completamente al azar (2x2x9, Tec*TF*Rep), de acuerdo con el Modelo (3). El análisis

se ejecutó utilizando Proc GLM del paquete SAS (Statistical Analysis System, 2011), las medias de los efectos simples se compararon utilizando Tukey ($P=0.05$) y las interacciones utilizando diferencia mínima significativa (DMS) calculada a partir de los errores estándar (EE) obtenidos con Proc Mixed (SAS, 2011), los grados de libertad del error y los valores de la significancia reportada en el ANOVA. Se muestran medias ajustadas (LsMeans) (SAS, 2011), los coeficientes de variación (CV) y determinación (R^2).

Modelo (2)

$$Y = \mu + TF_i + \varepsilon_{ijk}$$

Donde: Y= FDN, FDA, Ce, PC, MS, MO, TC, FT, Vmáx, S, L, FL, FM, FR, VT; TF_i = i-ésimo efecto del tipo de fruto; y ε_{ij} = error aleatorio.

Modelo (3)

$$Y = \mu + Téci + TF_j + (Téc*TF)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde: Y= CH₄; MS, MO, Ce, PC, FDN, FDA, FT, TC, Vmáx, S, L, FR, FM, FL, FT; $Téci$ = i-ésimo efecto del tipo de técnica de evaluación; TF_j = j-ésimo efecto del tipo de fruto; $(Téc*TF)_{ij}$, la interacción entre el i-ésimo tipo de técnica de evaluación y el j-ésimo tipo de fruto; ε_{ijk} = error aleatorio.

3.3.6.2. Análisis de regresión. Se obtuvieron modelos de Regresión (Proc Reg; SAS, V.9.0) simple y múltiple; para la regresión múltiple se utilizó Forward del procedimiento Stepwise (22). Los modelos se eligieron considerando los criterios de validez CP de Mallow, R^2 y R^2 ajustada.

3.3.6.3. Correlaciones de Pearson. Se comprobó la relación entre variables a través de los coeficientes de correlación de Pearson (Proc Corr; SAS, V. 9.0) (2011).

3.4 Correlación de metano de dietas con diferentes niveles de forraje-concentrado obtenido por cromatografía de gases con metano por la Técnica de Producción de gas *in vitro*

3.4.1 Análisis químico de dietas con distinta proporción de forraje-concentrado

El análisis químico se realizó en el Laboratorio de Nutrición Animal perteneciente a la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad Autónoma de Chiapas. Se utilizaron cuatro dietas con distinta proporción de forraje-concentrado (Cuadro 1).

Cuadro 1. Dietas con distinta proporción de forraje-concentrado (%).

Ingrediente	D1 (100-0)	D2 (80-20)	D3 (60-40)	D4 (40-60)
Pasto estrella	100	80	60	20
Maíz	0	10	26	40
Palmiste	0	10	14	14
Soya	0	0	0	6
Rastrojo de maíz	0	0	0	20
Total	100	100	100	100

Las muestras fueron analizadas por triplicado para determinar materia seca (MS), proteína cruda (PC), materia orgánica y cenizas, según AOAC (2000), fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácida (FDA) de acuerdo con la técnica descrita por Van Soest *et al.* (1991).

3.4.2 Cinética, fracciones de fermentación y degradación de la materia seca por la técnica de gas *in vitro*.

Para conocer la cinética de fermentación, fracciones y degradación de la materia seca a 24 h (DGRMS) se utilizó la técnica de producción de gas *in vitro* (Menke y Steingass, 1988), descrita en los experimentos anteriores.

El inóculo ruminal se obtuvo por medio de sonda oro-ruminal de tres ovinos de la raza Katahdin, que en todo momento tuvieron un trato de acuerdo con los protocolos de la Ley Federal Sanidad Animal vigente, NOM-062-ZOO-1999 y bajo las normas de bienestar animal establecidas en la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad Autónoma de Chiapas.

Se realizaron tres series de incubación de manera simultánea, cada serie comprendía de diez repeticiones (viales) por cada dieta y fue repetida tres veces a través del tiempo, según recomienda Udén *et al.* (2012). Con los frascos de la primera serie se estimó la cinética y fracciones de fermentación. En la segunda y tercera serie se obtuvo la DGRMS a 24 h, metano por la TPG y cromatografía de gases.

3.4.3 Determinación de la producción de metano.

Para conocer la producción de metano por la cromatografía de gases y la Técnica de producción de gas *in vitro* se analizaron 40 muestras por técnica, siguiendo la metodología descrita anteriormente en la prueba de ensayo y ajuste 2.

3.4.4 Tratamientos experimentales y variables evaluadas

Se utilizaron dos técnicas de medición de metano entérico, que correspondieron a cromatografía de gases (T1) y Técnica de producción de gas *in vitro* (T2) y se utilizaron cuatro dietas con diferentes niveles de forraje-concentrado con 40 repeticiones (Cuadro 1).

Las variables evaluadas fueron: MS, PC, MO, Ce, FDN, FDA, V_{máx}, S, L, FR, FM, FL, FT y DGRMS a 24 h.

3.4.5 Análisis estadístico.

3.4.5.1. Análisis de varianza y prueba de medias. Se realizó un ANOVA considerando los efectos los efectos simples y combinatorios de la técnica de medición (Tec) y relación forraje-concentrado (FC), considerando diez repeticiones por

tratamiento. Se utilizaron diseños completamente al azar (2x2x10, Tec*TD*Rep), de acuerdo con el Modelo (4), posteriormente se analizaron los efectos simples y combinatorios de la técnica de medición (Tec) y TD, considerando 40 repeticiones por tratamiento. Se utilizaron diseños completamente al azar (2x2x40, Tec*TD*Rep), de acuerdo con el Modelo (5). El análisis se ejecutó utilizando Proc GLM del paquete SAS (Statistical Analysis System, 2011), las medias de los efectos simples se compararon utilizando Tukey (P=0.05) y las interacciones utilizando diferencia mínima significativa (DMS) calculada a partir de los errores estándar (EE) obtenidos con Proc Mixed (2011), los grados de libertad del error y los valores de la significancia reportada en el ANOVA. Se muestran medias ajustadas (LsMeans) (2011), los coeficientes de variación (CV) y determinación (R²).

Modelo (4)

$$Y = \mu + \text{Téc}_i + \text{TD}_j + (\text{Téc} * \text{TD})_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde: Y= CH₄, V_{máx}, S, L, FR, FM, FL, FT, DGRMS, PC, MO, Ce, FDN, FDA; Téc_i = i-ésimo efecto del tipo de técnica de evaluación; TD_j = j-ésimo efecto del tipo de dieta; $(\text{Téc} * \text{TD})_{ij}$, la interacción entre el i-ésimo tipo de técnica de evaluación y el j-ésimo tipo de dieta; ε_{ijk} = error aleatorio.

Modelo (5)

$$Y = \mu + D_i + M_j + (\text{TD} * M)_{ij} + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

Y= metano; TD_i , efecto de la i-ésima-dieta; M_j , efecto del j-ésimo método de medición; $(\text{TD} * M)_{ij}$, interacción entre factores; ε_{ij} , error aleatorio.

3.4.5.2. Selección de los datos. Los datos fueron divididos en dos partes iguales, utilizando un método de muestreo con reemplazo los datos que conformarían cada base de datos. Una de las bases de datos fue utilizada para la obtención de modelos, y la segunda, para la validación de los mismos a través del análisis de residuales.

3.4.5.3. Análisis de regresión. Se obtuvieron modelos de Regresión (Proc Reg; SAS, V.9.0) simple y múltiple; para la regresión múltiple se utilizó Forward del procedimiento

Stepwise (2011). Los modelos se eligieron considerando los criterios de validez CP de Mallows, R^2 y R^2 ajustada.

3.4.5.4. Correlaciones de Pearson. Se comprobó la relación entre variables a través de los coeficientes de correlación de Pearson (Proc Corr; SAS, V. 9.0).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Prueba de ensayo y ajuste 1. Efecto del método de extracción de líquido ruminal en la técnica de gas *in vitro*.

El contenido de MS de la harina de palmiste fue de 91.9%, con 14.47% de PC, 69.7% de FDN y 45.56% de FDA. Los parámetros de la cinética de fermentación y las fracciones (rápida, media y lenta) de harina de *Elaeis guineensis* inoculada con LR obtenido por cánula y por sonda ruminal no presentaron diferencias estadísticas ($P > 0.05$; Cuadro 2). La tasa de fermentación promedio fue de 0.0275 h^{-1} , con una L de 6.575 h, mientras que el $V_{\text{máx}}$ promedio fue de 316.81 mL g^{-1} . Por su parte, la DGRMS de la harina de *E. guineensis* a las 72 h de incubación mostró un comportamiento similar en ambos métodos de extracción ($P > 0.05$). La falta de diferencias entre ambas técnicas de extracción de LR sobre las variables evaluadas, probablemente se deba a que el LR obtenido por SR, no se contaminó con saliva y fue representativo. Lo que concuerda con Martín *et al.* (2005), quienes cuantificaron las poblaciones de bacterias y hongos ruminales en muestras de contenido ruminal obtenidos por CR y SR en bovinos y señalaron que, mientras el LR no se contamine por saliva los resultados serán similares entre sí. Por su parte, Shen *et al.* (2012) y Ramos-Morales *et al.* (2014), no encontraron diferencias en la estimación de ácidos grasos volátiles, amoníaco, lactato, potasio, cloruro, calcio y fósforo y pH, cuando usaron SR y animales canulados, por lo que concluyeron que el uso de SR podría ser una alternativa para tomar muestras ruminales. Por otro lado, Terré *et al.*, (2013), no encontraron diferencias en la cuantificación de bacterias gramnegativas y grampositivas al extraer LR por CR y SR, sin embargo, si se presentaron diferencias en la cuantificación de pH y AGV, concluyendo que, a pesar de las diferencias encontradas los resultados obtenidos con las dos técnicas están altamente correlacionadas, por lo que, se puede utilizar un factor de corrección para aproximar ambos métodos y permitir comparaciones entre estudios.

Cuadro 2. Efecto de LR obtenido por cánula y sonda oro-ruminal sobre la degradación de la materia seca, parámetros y fracciones de fermentación de harina de *Elaeis guineensis*.

Variables	Cánula	Sonda oro ruminal	Promedio
DGRMS 72 h (%)	43,45 ± 2,70	45,59 ± 1,80	44,520
S (h ⁻¹)	0,028 ± 0,02	0,027 ± 0,03	0,0275
L (h)	6,52 ± 1,90	6,63 ± 0,25	6,575
V _{máx} (mL g ⁻¹)	323,26 ± 21,64	310,36 ± 4,44	316,810
FR (g kg ⁻¹)	131,08 ± 26,08	150,99 ± 2,30	141,035
FM (g kg ⁻¹)	167,70 ± 19,07	142,01 ± 4,92	154,855
FL (g kg ⁻¹)	476,93 ± 18,14	482,83 ± 49,80	479,880
FT (g kg ⁻¹)	775,71 ± 49,98	753,02 ± 16,20	764,365

S: Tasa de fermentación, L: Fase de retardo, V_{máx}: Volumen máximo de gas, FR: Fracción rápida, FM: Fracción media, FL: Fracción lenta, FT: Fracción Total, DGRMS: Degradación de la materia seca, ±: desviación estándar.

4.2 Prueba de ensayo y ajuste 2. Predicción de metano de *Leucaena collinsii* y *Guazuma ulmifolia* por cromatografía de gases y gas *in vitro*

4.2.1 Producción de metano de frutos arbóreos tropicales

En el Cuadro 3 se reportan valores de CH₄ de los frutos arbóreos estimado por cromatografía de gases y la técnica de gas *in vitro*. Se encontró interacción entre la técnica de medición y el tipo de fruto (P<0.004), y en general, la *L. collinsii* mostró valores más altos de CH₄ que la *G. ulmifolia* (7.03 vs. 2.12 mL g⁻¹ MS; P<0.0001) y la TPG mostró valores subestimados de CH₄ con respecto a la de cromatografía (4.15 vs. 4.99 mL g⁻¹ MS) (P<0.0001). Por otro lado, el error esperado con la TPG *in vitro*, con respecto a cromografía de gases es de 0.84 mL de CH₄. La dispersión de los datos demuestra que ambas técnicas tuvieron un alto nivel de concordancia. Por lo que, a partir de la técnica de gas *in vitro* se podría pronosticar la emisión de metano en los

frutos arbóreos evaluados (Figura 1). Sin embargo, es necesario continuar trabajando en la normalización de la técnica alternativa, para mejorar la precisión en la estimación de metano por la TPG *in vitro*, para ello, es necesario aumentar el número de repeticiones, lo que permitirá conseguir un buen estimador de los coeficientes de regresión (Concato *et al.*, 1995). Lo que concuerda con otra investigación (Ribessi *et al.*, 2020), en la que correlacionaron la emisión de CH₄ de una dieta con 14.2 % de PC por cromatografía de gases y por espectroscopia de absorción infrarroja y encontraron un R²=0.99, y concluyen que el número de repeticiones es fundamental para mejorar los coeficientes de correlación y regresión entre ambas técnicas.

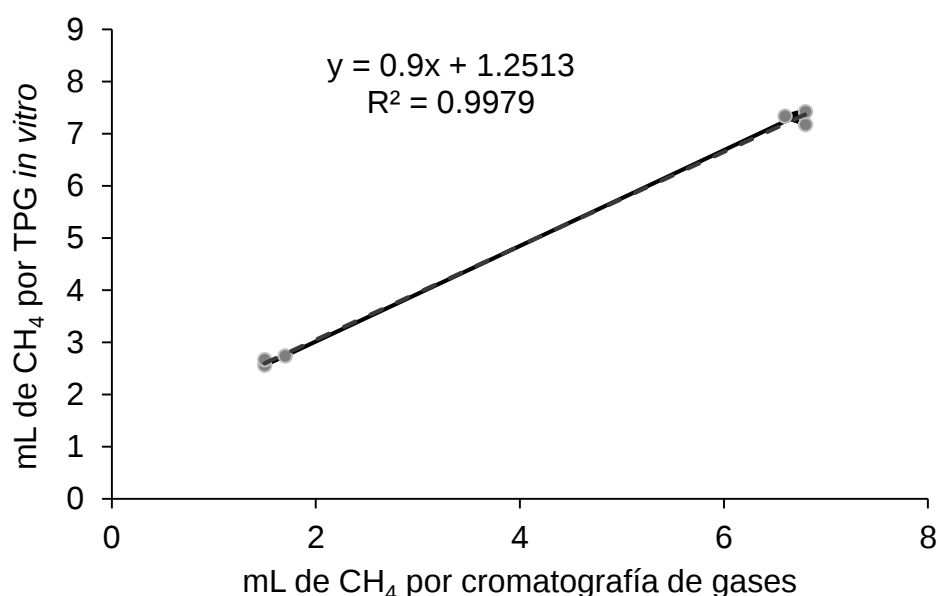


Figura 1. Correlación entre metano estimado por cromatografía de gases y la técnica de gas *in vitro* de frutos arbóreos del trópico seco.

Cuadro 3. Estimación de metano (mL g⁻¹ de sustrato) por cromatografía de gases y la técnica de producción de gas *in vitro* de frutos arbóreos del trópico seco.

	Metano		R ²	CV (%)	P de F			DSM 0.05=
	TPG	Cro			Téc	TF	Téc*TF	
<i>Lc</i>	6.73	7.32	0.9979	2.45	<0.0001	<0.0001	0.004	0.17
<i>Gu</i>	1.56	2.66						
DMS	0.17	0.17						
0.05=								

Lc: *Leucaena collinsii*; *Gu*: *Guazuma ulmifolia*; TPG: técnica de producción de gas *in vitro*; Cro: cromatógrafo de gases; CV: coeficiente de variación; Téc: técnica de medición; TF: tipo de fruto; DSM: diferencia mínima significativa; p de F: probabilidad de Fisher.

En el Cuadro 4, se muestra el modelo de regresión simple entre las técnicas de cromatografía de gases y TPG *in vitro*. El modelo CH_4 (Cro)=1.25+0.9 CH_4 (TPG)+ E_{ij} permite obtener las estimaciones de CH_4 obtenidas por la técnica de cromatografía a través de la TPG ($R^2=0.99$; $P<0.0001$). En este sentido, diversos autores han señalado la factibilidad de usar la TPG *in vitro* para estimar metano entérico (Ángeles-Mayorga *et al.*, 2019; Crosby-Galván *et al.*, 2018; Ramin *et al.*, 2012). Por su parte, Miranda-Romero *et al.* (2018) sugieren que a partir de la TPG se puede determinar el efecto de los alimentos sobre la emisión potencial de GEI. Por otro lado, algunas investigaciones señalan que utilizando la TPG *in vitro* se puede obtener un indicador de calentamiento global a partir de la producción de CO₂ y CH₄, concluyendo que la técnica *in vitro* es útil para estimar el impacto ambiental por la fermentación de los alimentos para rumiantes (Jiménez-Santiago *et al.*, 2019; Martínez-Hernández *et al.*, 2019), así también, esta técnica se ha empleado para estimar la emisión de metano en subproductos pecuarios como la cerdaza (Pérez *et al.*, 2018). Además, es una técnica práctica, poco contaminante y de bajo costo (Storm *et al.*, 2012). En contraste, la cromatografía de gases es más exacta, pero costosa.

Por otro lado, independientemente del tipo de técnica de medición, la producción potencial de CH₄ se puede predecir a través de los contenidos de taninos de los TF ($R^2=0.99$ y $P<0.0001$), otros modelos de regresión múltiple válidos incluyeron los efectos de las proporciones de FDA y la producción de gas de la FM, estos modelos no incrementaron los coeficientes de determinación ni los valores de P de F (Cuadro 4).

Cuadro 4. Modelos de regresión simple entre las técnicas de estimación de metano por cromatografía de gases y la técnica de producción de gas *in vitro*.

Y	β_0	β_1X_1	B_2X_2	B_3X_3	R^2	P de F
Cro	1.25	0.9 TPG			0.99	<0.0001
Cro	2.34	1.38 TC			0.99	<0.0001
Cro	2.01	1.12 TC	0.019 FM		0.99	<0.0001
Cro	3.45	- 0.03 FDA	1.1 TC	0.016 FM	0.99	<0.0001
TPG	1.22	1.53 TC			0.99	<0.0001

TC: taninos condensados; FDA: fibra detergente ácida; FM: fermentación media.

Por otra parte, se conoce que el potencial para mitigar la emisión de metano entérico en frutos arbóreos, dependerá de su composición química (Anantasook *et al.*, 2014; Meale *et al.*, 2011). En este sentido, el fruto de *L. collinsii* presentó mayor concentración de PC y menor en *G. ulmifolia*, con 19.14 y 8.35 %, respectivamente ($P<0.0001$; Cuadro 5), resultados consistentes con el rango reportado de PC en frutos arbóreos, lo cuales van de 6 a 21 % (Hernández *et al.*, 2018; Cortez *et al.*, 2016; Alzate *et al.*, 2008). Por otro lado, el contenido de MS y FDN fueron similares entre los frutos evaluados ($P>0.15$), pero tuvo menor cantidad de MO y FDA ($P<0.05$). Respecto al contenido de metabolitos secundarios, la concentración de FT y TC fue mayor para los frutos de *L. collinsii* ($P<0.007$). El contenido de TC de los frutos evaluados en este trabajo (3.6 y 0.23 % para *L. collinsii* y *G. ulmifolia*, respectivamente) coincide con los rangos reportados en otras investigaciones, en las que se indica que el contenido de TC en frutos arbóreos puede variar de 0.21 a 3.63 % (Pinto-Trinidad *et al.*, 2019; Rojas-Hernández *et al.*, 2015; Pinto-Ruiz *et al.*, 2009), dependiendo del tipo de especie, condiciones climáticas, sitio de muestreo y etapa vegetativa de las plantas (Augustine *et al.*, 2018). Sin embargo, el fruto de *L. collinsii* emitió mayor volumen de metano ($P<0.05$; Cuadro 3), independientemente de presentar mayor contenido de PC, FT y TC

($P < 0.05$; Cuadro 5), lo que contrasta con lo reportado en investigaciones en las que se documentado ampliamente el potencial de follaje y frutos de *Leucaena* para mitigar metano entérico, principalmente, por ser ricos en TC (Schultze-Kraft *et al.*, 2018; Melesse *et al.*, 2017; Molina *et al.*, 2016). Pero concuerda con lo reportado en otra investigación, en la cual estimaron la emisión de gases efecto invernadero (GEI) de frutos arbóreos tropicales por medio de la ecuación de gases ideales, y se reportó que el fruto de *L. leucocephala* emitió mayor cantidad de GEI en comparación a frutos de *G. ulmifolia* con 5.2 y 4.56 mMol, respectivamente (Torres-Salado *et al.*, 2018). Así mismo, en otro trabajo se evaluó el efecto del follaje de *L. leucocephala* y *G. ulmifolia* al 30% de inclusión en una dieta de pasto *Cynodon plectostachyus* sobre la producción de metano, la cual se determinó por la captura de CO_2 por NaOH (1N) y concluyeron que, aunque la dieta con follaje de *L. leucocephala* tuvo mayor contenido de PC, no existieron diferencias en la emisión de metano (Ángeles-Mayorga *et al.*, 2019). Esto podría explicarse a que el efecto de los TC sobre la mitigación de CH_4 entérico dependerá de la especie de la que proviene (Saminathan *et al.*, 2017; Paengkoum *et al.*, 2015). En este sentido, se ha documentado que TC con la misma concentración, pero de diferentes plantas pueden mostrar variaciones en la producción de CH_4 (Gemeda *et al.*, 2015; Barahona-Rosales *et al.*, 2006). Estas variaciones son atribuidas principalmente al peso molecular y composición química de los TC (Huyen *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2010). Al respecto, se ha reportado el efecto del peso molecular de los TC de cáscara de *Garcinia mangostana* L y *L. leucocephala* sobre la producción de CH_4 , mismas que contenían TC con un peso molecular de 0.154 y 0.310 Da, respectivamente, encontrando menor emisión de metano en *L. leucocephala*, concluyendo que a mayor peso molecular menor emisión del gas (Paengkoum *et al.*, 2015). Así también, recientemente, se ha señalado que el impacto de los TC sobre la emisión de CH_4 , dependerá de la estabilidad química y vida útil del TC a nivel ruminal (Naumann *et al.*, 2018). Por lo que, es necesario comprender que la actividad biológica de los TC y, por lo tanto, su efecto en la mitigación de metano, dependerá principalmente de su composición química.

Cuadro 5. Composición química de frutos arbóreos del trópico seco (%).

	<i>L. collinsii</i>	<i>G. ulmifolia</i>	R ²	CV (%)	P de F	Tukey 0.05
MS	96.07±0.3 ^a	94.8±1.2 ^a	0.99	0.91	0.15	1.97
PC	19.14±0.6 ^a	8.35±0.3 ^b	0.67	3.47	<0.0001	1.08
MO	93.25±0.1 ^b	94.3±0.6 ^a	0.99	0.49	0.05	1.04
Ce	6.74±0.1 ^a	5.67±0.6 ^b	0.44	7.38	0.05	1.04
FDN	52.32±0.6 ^a	51.82±3.4 ^a	0.01	0.01	0.82	5.68
FDA	37.64±1.1 ^b	44.54±1.2 ^a	0.93	2.9	0.002	2.7
FT	1.3±0.2 ^a	0.73±0.13 ^b	0.87	13.75	0.007	0.32
TC	3.6±0.1 ^a	0.23±0.04 ^b	0.99	4.8	<0.0001	0.21

Medias en la misma fila con letras distintas difieren estadísticamente (Tukey, P<0.05). ±; Desviación estándar. MS: Materia seca; PC: proteína cruda; MO: materia orgánica; Ce: cenizas; FDN: fibra detergente neutro; FDA: fibra detergente ácido; FT: fenoles totales; TC: taninos condensados.

Por otro lado, la composición química también influye sobre el aprovechamiento a nivel ruminal de los sustratos y, por lo tanto, sobre la emisión de GEI. En el Cuadro 6, se presentan los parámetros de la cinética y fracciones de fermentación de los frutos arbóreos. Se observa que el fruto de *L. collinsii* tuvo mayor V_{máx} (169.17 mL g⁻¹ de MS), posiblemente por el mayor contenido de PC (Cuadro 5) y el gas producido por las fracciones de FM y FL (P<0.0001), así mismo la producción de gas derivada de la FR tendió a ser mejor en *L. collinsii* que en *G. ulmifolia* (P<0.07). En este sentido, se menciona que los niveles de PC por encima de 7% mejoran la actividad microbiana en el rumen, mejorando así el potencial de fermentación (Meale *et al.*, 2011). No se observaron diferencias estadísticas para la S (P>0.037), sin embargo, los frutos de *G. ulmifolia* se fermentaron más prontamente (L=1.966 h), pero con bajo potencial de fermentación (V_{máx}= 42.53 mL g⁻¹ de MS). Esto pudo deberse las características químicas de los FT y TC, lo que redujo el V_{máx}, pero permitió disminuir la emisión de metano (Cuadro 2). Por lo que, los resultados del presente estudio, confirmaron previas suposiciones, de que los frutos arbóreos poseen características nutritivas que podrían

mitigar la emisión de metano por fermentación entérica, principalmente por el efecto de TC sobre la metanogénesis (Naumann *et al.*, 2017; Hatew *et al.*, 2016).

Cuadro 6. Parámetros de la cinética y fracciones de fermentación *in vitro* de frutos arbóreos del trópico seco.

	<i>L. collinsii</i>	<i>G. ulmifolia</i>	R ²	CV (%)	P de F	Tukey 0.05
L (h)	9.67±1.6 ^a	1.966±1.8 ^b	0.9	29.8	0.006	3.9
S (h ⁻¹)	0.0216±0.001 ^a	0.0241±0.0009 ^a	0.2	18.8	0.37	0.009
V _{máx} (ml ⁻¹ g de MS)	169.17±2.7 ^a	42.53±5.1 ^b	0.99	3.85	<0.0001	9.23
FR (g/kg)	38.55±8.4 ^a	22.04±8.04 ^b	0.6	27.3	0.07	18.7
FM (g/kg)	66.22±3.5 ^a	20.66±2.4 ^b	0.99	6.9	<0.0001	6.8
FL (g/kg)	303.29±1.8 ^a	57.00±14.1 ^b	0.99	5.6	<0.0001	22.7
FT (g/kg)	408.06±11 ^a	99.70±8.4 ^b	0.99	3.9	<0.0001	22.3

Medias en la misma fila con letras distintas difieren estadísticamente (Tukey, P<0.05); ±: Desviación estándar; L: fase Lag; S: tasa de producción de gas; V_{máx}: volumen máximo de producción de gas; FR: fermentación rápida; FM: fermentación media; FL: fermentación lenta; FT: fermentación total.

En el Cuadro 7, se presentan las correlaciones de Pearson. Los valores de producción potencial de CH₄ medidos a través de la TPG *in vitro* correlacionaron positivamente con los obtenidos a través de cromatografía (r=0.99; P<0.0001). Además, el CH₄ medido a través de ambas técnicas correlacionó positivamente con PC (r=0.99; P<0.0001), con los contenidos de FT y TC (r>0.92; P<0.01) y con la producción de gas de la fermentación de las fracciones FM, FL y FT, así como con el V_{máx} (r=0.99;

$P < 0.0001$), en tanto que correlacionó negativamente con los contenidos de MO y FDA ($r = -0.83$ a -0.97 ; $P < 0.05$).

Cuadro 7. Correlación de la composición química, cinética y fracciones de fermentación con metano por técnica de gas *in vitro* y cromatografía de gases de frutos arbóreos del trópico seco.

	TPG	Cro	MS	MO	Ce	PC	FDN	FDA	FT	TC	Vmáx	S	L	FR	FM	FL
Cro	0.99***															
MS	0.66	0.65														
MO	-0.83*	-0.83*	-0.56													
Ce	0.83*	0.83*	0.55	-0.99***												
PC	0.99***	0.99***	0.66	-0.84	0.84*											
FDN	0.09	0.1	0.39	0.39	-0.39	0.11										
FDA	-0.97**	-0.97**	-0.61	0.89**	-0.89**	-0.95**	0.11									
FT	0.92**	0.93**	0.74§	-0.67	0.67	0.94**	0.39	-0.81*								
TC	0.99**	0.99**	0.67	-0.83**	0.83**	0.99***	0.12	-0.96**	0.93**							
Vmáx	0.99***	0.99***	0.64	-0.81*	0.81*	0.99***	0.13	-0.95**	0.94**	0.99***						
S	-0.46	-0.44	-0.8*	0.62	-0.62	-0.45	0.03	0.5	-0.42	-0.46	-0.41					
L	0.94**	0.94**	0.76	-0.83*	0.83*	0.94**	0.11	-0.93**	0.85*	0.95**	0.93**	-0.65				
FR	0.76	0.76	0.31	-0.52	0.52	0.77	0.16	-0.68	0.80*	0.76§	0.79	0.06	0.51			
FM	0.99***	0.99***	0.59	-0.79*	0.80*	0.99**	0.1	-0.96**	0.91*	0.99***	0.99***	-0.37	0.92**	0.79		
FL	0.99***	0.99***	0.66	-0.82*	0.82*	0.99***	0.12	-0.96**	0.93**	0.99***	0.99***	-0.45	0.95**	0.75	0.99	
FT	0.99***	0.99***	0.64	-0.81*	0.81*	0.99***	0.13	-0.96**	0.93***	0.99***	0.99***	-0.41	0.93	0.78	0.99***	0.99***

* P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.0001; MS: Materia seca; PC: proteína cruda; MO: materia orgánica; Ce: cenizas; FDN: fibra detergente neutro; FDA: fibra detergente ácido; FT: fenoles totales; TC: taninos condensados; L: fase Lag; S: tasa de producción de gas; Vmáx: volumen máximo de producción de gas; FR: fermentación rápida; FM: fermentación media; FL: fermentación lenta; FT: fermentación total.

4.3 Correlación de metano de dietas con diferentes niveles de forraje-concentrado obtenido por cromatografía de gases con metano por la Técnica de Producción de gas *in vitro*.

Las dietas evaluadas fueron formuladas teóricamente isoprotéicas e isoenergéticas, sin embargo, se encontraron diferencias estadísticas ($P<0.0001$). La dieta con proporción de F:C 40:60 tuvo mayor cantidad de PC y MO ($P<0.0001$), pero menor cantidad de Ce y FDN ($P<0.0001$). Mientras que las dietas con niveles de F:C de 60:40 y 40:60 tuvieron menor cantidad de FDA (35.5 y 31.83 %; Cuadro 8).

Cuadro 8. Composición química (%) de dietas con diferentes proporciones de forraje-concentrado.

F-C (%)	PC	MO	CE	FDN	FDA
100	10.33 ^c	88.77 ^d	11.23 ^a	77.14 ^a	43.73 ^a
80-20	10.06 ^d	90.72 ^c	9.28 ^b	77.69 ^a	41.14 ^a
60-40	10.55 ^b	92.95 ^b	7.052 ^c	76.98 ^a	35.5 ^b
40-60	11.18 ^a	95.378 ^a	4.622 ^d	72.26 ^b	31.83 ^b
R ²	0.95	0.96	0.96	0.97	0.99
CV (%)	0.99	0.56	6.4	0.52	0.58
V de P	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Tukey 0.05=	0.1891	0.9341	0.9323	0.7256	4.08

Medias en la misma columna con letras distintas difieren estadísticamente (Tukey, $P<0.05$). PC: proteína cruda; MO: materia orgánica; Ce: cenizas; FDN: fibra detergente neutro; FDA: fibra detergente ácido.

La proporción de forraje-concentrado (F:C) afectó la cinética de fermentación ruminal (S, L y V_{máx}) y la DGRMS a 24 h ($P<0.02$). En general, la relación F:C 40:60 tuvo mejor S, L y V_{máx} (0.0336 h⁻¹, 6.17 h y 462.02 mL⁻¹ g de MS) y, por lo tanto, mejor DGRMS a 24 h (52.56%) que el resto de las proporciones de forraje (0.324 h⁻¹, 8.01 h, 368.68 mL⁻¹ g de MS y 43.91 %, respectivamente; Cuadro 9).

Cuadro 9. Parámetros de la cinética de fermentación y degradación *in vitro* de dietas con diferente nivel de forraje-concentrado (%).

F-C (%)	S (h ⁻¹)	L (h)	V _{máx} (mL ⁻¹ g de MS)	DGRMS 24 h (%)
100	0.0314 ^b	8.84 ^a	332.72 ^c	40.76 ^c
80-20	0.0322 ^{ab}	7.92 ^{ab}	373.84 ^b	43.32 ^c
60-40	0.0336 ^a	7.27 ^b	399.50 ^{ab}	47.66 ^b
40-60	0.0336 ^a	6.17 ^c	462.02 ^a	52.56 ^a
R ²	0.44	0.79	0.85	0.91
CV (%)	3.62	7.25	4.22	3.38
V de P	0.02	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Tukey 0.05=	0.0021	0.9915	29.27	2.821

Medias en la misma columna con letras distintas difieren estadísticamente (Tukey, P<0.05); S: tasa de producción de gas; L: fase Lag; V_{máx}: volumen máximo de producción de gas; DGRMS: degradación de la materia seca a 24 h.

En el Cuadro 10, se presentan los valores medios de las fracciones de fermentación de las dietas con diferentes proporciones de F-C. Se observa que a medida que aumenta la proporción de concentrado, mejora la cantidad de fracciones de rápida y media fermentación (P<0.0001). Sin embargo, no se encontró efecto del nivel de F-C sobre la FL (P>0.1241). Respecto a la FT, presentó un aumento lineal con las proporciones de F:C (P<0.0001) y fue influenciado por la cantidad de gas producido por la FR y FM de las dietas evaluadas.

Cuadro 10. Fracciones de fermentación (g kg^{-1} de materia seca) *in viro* de dietas con diferente proporción de forraje-concentrado (%).

F-C (%)	g kg^{-1} de materia seca			
	FR	FM	FL	FT
100	75.58 ^c	222.96 ^d	418.35 ^a	716.89 ^c
80-20	95.82 ^{bc}	266.12 ^c	438.78 ^a	800.73 ^b
60-40	114.70 ^b	297.44 ^b	449.56 ^a	861.7 ^{ab}
40-60	143.31 ^a	323.80 ^a	448.46 ^a	915.58 ^a
R ²	0.83	0.89	0.29	0.84
C.V (%)	11.64	5.09	4.93	4.21
V de P	<0.0001	<0.0001	0.1241	<0.0001
Tukey 0.05=	22.616	25.571	39.177	62.863

FR: Fracción rápida, FM: Fracción media, FL: Fracción lenta, FT: Fracción Total

En el Cuadro 11, se muestran los modelos matemáticos que permiten predecir las estimaciones de CH_4 obtenidas por la técnica de cromatografía a través de la TPG *in vitro* (modelos 1, 2 y 3 con $R^2 = 0.56, 0.51, 0.64$, respectivamente). Se observa que los modelos que incluyen variables como la proporción de F:C, tasa de fermentación (S), fracción de fermentación lenta (FL) y proteína cruda (PC) mejoran el R^2 (modelos 4, 5 y 6 con $R^2 = 0.83, 0.93$ y 0.96 , respectivamente). La producción potencial de CH_4 se puede predecir a través de la proporción de F:C y PC (modelo 7 con $R^2 = 0.87$), $V_{\text{máx}}$ y FDN (modelo 8 con $R^2 = 0.64$) y a partir de FM y FDN (modelo 9 con $R^2 = 0.54$).

Cuadro 11. Modelos matemáticos para estimar metano entérico en rumiantes

Modelos	R ²
1. $CRO = 0.28 + 1.019 CH_4TPG_{24h}$	0.56
2. $CRO = 4.21 + 1.13 CH_4TPG_{24h}$	0.51
3. $CRO = 2.72 - 0.808 CH_4TPG_{0-12 h} + 1.203 CH_4TPG_{24h}$	0.64
4. $CRO = 58.14 - 0.37 \text{ Proporción F:C} - 0.77 CH_4TPG_{12-24 h}$	0.83
5. $CRO = 52.37 - 0.339 \text{ Proporción F:C} - 1.46 CH_4TPG_{12-24 h} + 0.72 CH_4TPG_{24h}$	0.93
6. $CRO = 263.46 - 0.47 \text{ Proporción F:C} - 1434.96 S - 0.038 FL - 14.32 PC + 0.29 CH_4TPG_{24h}$	0.96
7. $CRO = 167.95 - 0.40 \text{ Proporción F:C} - 11.22 PC$	0.87
8. $CRO = -278.47 + 0.26 V_{\text{máx}} + 2.65 FDN$	0.64
9. $CRO = -177.48 + 0.22 FM + 1.79 FDN$	0.54

Cro= metano por cromatografía de gases; CH_4TPG_{24h} = metano por la técnica de gas *in vitro* a 24 h; $CH_4TPG_{12-24 h}$ = metano por la técnica de gas *in vitro* de 12 a 24 h; F-C= forraje-concentrado; S= tasa de fermentación; FL= fracción de fermentación lenta; PC= proteína cruda; FDN= fibra detergente neutra; $V_{\text{máx}}$ = volumen máximo de producción de gas; FM= fracción de fermentación media.

Se ha documentado que la TPG *in vitro* proporciona pautas para cuantificar la emisión de metano en rumiantes (Yañéz *et al.*, 2016). Sin embargo, no se han desarrollado modelos de predicción de metano por cromatografía de gases a partir de la TPG *in vitro*. De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación, con los modelos 1, 2 y 3 ($R^2 = 0.56, 0.51, 0.64$, respectivamente) se puede predecir CH_4 con la TPG *in vitro* (Cuadro 8). En relación con esto, Huhtanen *et al.* (2015) mencionan que los modelos con potencial de predicción moderado a sustancial deben tener un R^2 superior a 0.50. Por su parte, Ungerfeld *et al.* (2018) mencionan que la efectividad de los modelos dependerá de su precisión y para ello, se debe incluir variables como la composición de la dieta, calidad nutritiva, contenido de fibra y carbohidratos no fibrosos (Velarde-Guillén *et al.*, 2019). En este sentido, los modelos 4, 5, 6, 7, 8 y 9 en los que se incluyó la proporción de F:C, composición química de la dieta y fracciones de fermentación aumentaron el R^2 (Cuadro 8). Cersosimo y Wright (2015) indican que los

modelos matemáticos que se originen a partir de técnicas *in vitro* deben incluir parámetros de fermentación de los alimentos y estos modelos deben ser validados a partir del error de predicción, concordancia de los datos, análisis de los valores observados y valores predicho (Benaouda *et al.*, 2020). Por lo anterior, es necesario validar los modelos matemáticos propuestos en esta investigación.

5. CONCLUSIONES

Se concluye que, la extracción de líquido ruminal por cánula o sonda oro-ruminal no afecta los resultados obtenidos en la técnica de gas *in vitro*, por lo que podrían utilizarse indistintamente.

Por otro lado, el fruto de *G. ulmifolia* emitió menor cantidad de metano y la técnica de gas *in vitro* es promisorio para la determinación de metano de frutos de *Leucaena collinsii* y *Guazuma ulmifolia* con respecto a la técnica convencional de referencia, cromatografía de gases.

A partir de los modelos matemáticos se puede predecir la emisión de metano por cromatografía de gases a partir de la técnica de producción de gas *in vitro*. Los modelos más precisos son los que consideran la calidad nutritiva, fracciones y parámetros de fermentación. Sin embargo, se recomienda validar los modelos matemáticos.

6. LITERATURA CITADA

- Alayón-Gamboa, JA; Jiménez-Ferrer, G; Piñeiro-Vázquez, ÁT; Canul-Solís, J; Albores-Moreno, S; Villanueva-López, G; Nahed-Toral, J; Ku-Vera, JC. 2018. Estrategias de mitigación de gases de efecto invernadero en la ganadería. *AGROProductividad*. 11(2): 9.
- Alejos, JI; Almaraz-Buendía, I; Peralta-Ortiz, JJG; Sánchez-Santillán, P; Soriano-Robles, R; Torres-Cardona, MG. 2018. Consideraciones de bienestar animal en las estrategias para la disminución de la producción de metano entérico por rumiantes. *Agroproductividad*. 11(2): 57-63.
- Alzate, LM; Arteaga, DM; Jaramillo, Y. 2008. Propiedades farmacológicas del Algarrobo (*Hymenaea courbaril* Linneaus) de interés para la industria de alimentos. *Revista Lasallista de Investigación*. 5(2): 100-111.
- Anantasook, N; Wanapat, M; Cherdthong, A; Gunun, P. 2014. Effect of tannins and saponins in *Samanea saman* on rumen environment, milk yield and milk composition in lactating dairy cows. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. (99): 335-344.
- Ángeles-Mayorga, Y; Ramírez-Mella, M; Mayo-Hernández, R; Crosby-Galván, MM; Ramírez-Bribiesca, JE; Sánchez-Villareal, A. 2019. Evaluación *in vitro* del potencial antimetanogénico de follajes tropicales como estrategia de alimentación para rumiantes. *Agroproductividad*. 12(2): 61-65.
- AOAC. The Official Methods of Analysis of AOAC International. Association of Official Analytical Chemist. 17th ed. Washington, USA. 2000.
- Armsby, H.P., 1903. The Principles of Animal Nutrition. J. Wiley & Sons, New York.
- Augustine, C; Khobe, D; Madugu, AJ; Obidah, LU; Solomsi, AA; Tarimbuka, LI; Edward, A. 2018. Chemical Composition of *Gmelina* (*Gmelina arborea*) Fruits and Leaves and Their Adoption as Livestock Feed Resources in Mubi Area. *International Journal of Current Advanced Research*. 1 (2):5-11.
- Barahona-Rosales, R; Sánchez, S; Lascano, CE; Owen, E; Morris, P; Theodorou, MK. 2006. Effect of condensed tannins from tropical legumes on the activity of fibrolytic enzymes from the rumen fungus *Neocallimastix hurleyensis*. *Enzyme and Microbial Technology*. 39 (2): 281-288.

- Bartha, R; Pramer, D. 1965. Features of flask and method for measuring the persistence and biological effects of pesticides in soil. *Soil Science*. 100 (1): 68-70.
- Benaouda, M; González-Ronquillo, M; Appuhamy, JAD; Kebreab, E; Molina, LT; Herrera-Camacho, J; Ortega, OAC. 2020. Development of mathematical models to predict enteric methane emission by cattle in Latin America. *Livestock Science*. 104-177. doi:10.1016/j.livsci.2020.104177
- Blummel, M; Givens, DI; Moss, R. 2005. Comparison of methane produced by Straw feed sheep in open-circuit respiration with methane predicted by fermentation characteristics measured by an *in vitro* gas procedure. *Animal Feed Science and Technology*. 123-124 (1):379-390.
- Bonilla, JA; Lemus, 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.
- Brouček, J. 2014. Methods of methane measurement in ruminants. *Slovak Journal of Animal Science*. 47(1): 51-60.
- Cardona-Iglesias, JL; Mahecha-Ledesma, L; Angulo-Arizala, J. 2017. Arbustivas forrajeras y ácidos grasos: estrategias para disminuir la producción de metano entérico en bovinos. *Agronomía Mesoamericana*. 28(1): 273-288.
- Cersosimo, LM y Wright, ADG. 2015. Estimation Methodologies for Enteric Methane Emission in Ruminants. *Climate Change Impact on Livestock: Adaptation and Mitigation*. 209–220. doi:10.1007/978-81-322-2265-1_13
- Chassoul, MJ; Marín, R; Morales, MA; Fallas, MF. 2017. Cuantificación de gases de efecto invernadero en la Sede de Occidente de la Universidad de Costa Rica. *RevistaSEP-PyS*. 15(1): 69-77.
- Concato, J; Peduzzi, P; Holford, TR; Feinstein, AR. 1995. Importance of Events Per Independent Variable in Proportional Hazards Analysis I. Background, Goals, and General Strategy. *J Clin Epidemiol*. 48 (12): 1495-1501.
- Cortez, JG; Uribe, M; Cruz, A; Lara, A; Romo, JL. 2016. Árboles nativos para el diseño de tecnologías silvopastoriles en la Sierra de Huautla, Morelos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 7 (Suppl 16): 3371-3380.

- Crosby-Galván, MM; Ramírez-Mella, M. 2018. Técnica de producción de gas *in vitro* para estimar la producción de metano. *Agroproductividad*. 11(2):64-69.
- Danielsson, R; Ramin, M; Bertilsson, J; Lund, P; Huhtanen, P. 2017. Evaluation of a gas *in vitro* system for predicting methane production in vivo. *Journal of Dairy Science*. 100 (11):8881-8894.
- Danielsson, R; Ramin, M; Bertilsson, J; Lund, P; Huhtanen, P. 2017. Evaluation of a gas *in vitro* system for predicting methane production in vivo. *Journal of Dairy Science*. 100 (11):8881-8894.
- Doreau, M; Arbre, M; Popova, M; Rochette, Y, Martin, C. 2017. Linseed plus nitrate in the diet for fattening bulls: effects on methane emission, animal health and residues in offal. *Animal*. 12 (3): 501-507.
- Eugéne, M; Sauvant, D; Noziere, P; Viallard, D; Oueslati, K; Lherm, M; Doreau, M. 2019. A new Tier 3 method to calculate methane emission inventory for ruminants. *Journal of Environmental Management*. 231: 982–988.
- Eun, J; Fellner, V; Gumpertz, M. 2004. Methane production by mixed ruminal cultures incubated in dual-flow fermenters. *Journal of Dairy Science*. (87):112-121. doi: [https://doi.org/10.3168/jds. S0022-0302\(04\)73148-3](https://doi.org/10.3168/jds. S0022-0302(04)73148-3).
- Gao, G; Chen, M; Wang, J; Yang, K; Xian, Y; Shi X; Wang, K. 2019. Sufficient or insufficient: Assessment of the intended nationally determined contributions (INDCs) of the world's major greenhouse gas emitters. *Frontiers of Engineering Management*. 6(1): 19–37.
- García E. 1988. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Instituto Nacional de Geografía. 5ª edición. Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Libros., México, DF. 125 p.
- Gardiner, TD; Coleman, MD; Innocenti, F; Tompkins, J; Connor, A; Garnsworthy, PC; Moorby, JM; Reynolds, CK; Waterhouse, A; Wills, D. 2015. Determination of the absolute accuracy of UK chamber facilities used in measuring methane emissions from livestock. *Measurement*. (66): 272–279.
- Garnsworthy, P; Difford, GF; Bell MJ; Bayat, AR; Huhtanen, P; Kuhla, B; Lassen, J; Peiren, N; Pszczola, M; Sorg, D; Visker, MHPW; Yan, T. 2019. Comparison of Methods to Measure Methane for Use in Genetic Evaluation of Dairy Cattle. *Animals*. (9): 837-848; doi:10.3390/ani9100837.

- Gemeda, BS; Hassen, A. 2015. Effect of tannin and species variation on *in vitro* digestibility, gas, and methane production of tropical browse plants. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. (28): 188-199.
- Harper, LA; Denmead, OT; Flesch, TK. 2011. Micrometeorological techniques for measurement on enteric greenhouse gas emissions. Animal Feed Science and Technology. (166-167): 227-239.
- Hatew, B; Stringano, E; Mueller-Harvey, I; Hendriks, WH; Carbonero, CH; Smith, LMJ; Pellikaan, WF. 2016. Impact of variation in structure of condensed tannins from sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) on *in vitro* ruminal methane production and fermentation characteristics. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. 100(2): 348–360.
- Hernández, J; Sánchez, P; Torres, N; Herrera, J; Rojas, A; Reyes, I; Mendoza, MA. 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): 105-12.
- Hook, SE; Denis, A; Wright, G; McBride, BW. 2010. Methanogens: Methane Producers of the Rumen and Mitigation Strategies. Archaea. doi:10.1155/2010/945785
- Huang, XD; Liang, JB; Tan, HY; Yahya, R; Khamseekhiew, B; Ho, YW. 2010. Molecular weight and protein binding affinity of Leucaena condensed tannins and their effects on *in vitro* fermentation parameters. Animal Feed Science and Technology. (159): 81-87.
- Huhtanen, P; Cabezas-Garcia, EH; Utsumi, S; Zimmerman, S. 2015. Comparison of methods to determine methane emissions from dairy cows in farm conditions. Journal of Dairy Science. 98(5): 3394–3409. doi:10.3168/jds.2014-9118
- Huyen, NT; Fryganas, C; Uittenbogaard, G; Mueller-Harvey, I; Verstegen, MWA; Hendriks WH; Pellikaan, WF. 2016. Structural features of condensed tannins affect *in vitro* ruminal methane production and fermentation characteristics. Journal of Agricultural Science. 154: 1474–1487.
- INEGI. Instituto Nacional De Estadística y Geografía. México en cifras. 2012. <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/default.aspx?e=07>. Consultado 2 Abril, 2020.

- Islam, M; Lee, SS. 2019. Advanced estimation and mitigation strategies: a cumulative approach to enteric methane abatement from ruminants. *Journal of Animal Science and Technology*. 61(3): 122–137.
- Jafari, S; Ebrahimi, M; Goh, YM; Rajion, MA; Jahromi, MF; Al-Jumaili, WS. 2019. Manipulation of rumen fermentation and methane gas production by plant secondary metabolites (saponin, tannin and essential oil) – a review of ten-year studies. *Annals of Animal Science*. 19 (1): 3–29.
- Jaurena, G; Julianera, P; Erracart, PM; Arroquy, JI; Berone, G; Posse, G; Ricci, P. 2019. Técnicas para medir o estimar las emisiones de gases efecto invernadero. *Revista argentina de producción animal*. 39 (2): 61-76.
- Jiménez-Santiago, A; Jiménez-Ferrer, G; Alayón-Gamboa, A; Pérez-Luna, E; Piñeiro-Vázquez, A.T; Albores-Moreno, S; Pérez-Escobar, MG; Castro-Chan, R. 2019. Fermentación ruminal y producción de metano usando la técnica de gas *in vitro* en forrajes de un sistema silvopastoril de ovinos de Chiapas, México. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 10 (2): 298-314.
- Johnson, KA; Westberg, HH; Michal, JJ; Cossalman, MW. 2007. The SF₆ tracer technique: Methane measurement from ruminants. Pages 33–67 in *Measuring Methane Production from Ruminants*. H. P. S. Makkar and P. E. Vercoe, ed. Springer, Dordrecht, the Netherlands.
- Ku, JC. 2019. Mitigación de las emisiones de metano entérico en rumiantes alimentados con plantas que contienen metabolitos secundarios. *Revista Mexicana de Agroecosistemas*. 6 (Suplemento 2): 44-55.
- Makkar, HPS. 2003. Quantification of tannins in tree and shrubs foliage. *A Laboratory Manual*. Klumer Academic Publisher. Netherlands.
- Martín, E; Pérez, E; Cañón, S; Rodríguez, J; Rodríguez, F. 2005. Sonda oro-ruminal experimental como alternativa para la obtención de microorganismos anaeróbicos del rumen. *Revista Corpoica*. 6 (1):39-42.
- Martínez, GM; Suarez, VH; Olmos, LH; Alfaro, RJ; Alfaro, EJ; Yenes, RP; Orosco, SM. 2019. Efectos de taninos condensados de *Schinopsis balansae* en la dieta de cabra lecheras sobre parámetros productivos. *Ciencias Agrarias*. (18): 7-14.

- Martínez-Hernández, BE; Salvador-Flores, O; Miranda-Romero, LA. 2019. Indicador de calentamiento global a partir de la fermentación ruminal de alimentos con diferentes niveles de energía y proteína. *Pastos y forrajes*. 42 (4): 285-289.
- Meale, SJ; Chaves, AV; Baah, J; McAllister, TA. 2011. Methane Production of Different Forages in *In vitro* Ruminal Fermentation. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 25 (1): 86-91.
- Melesse, H; Steingass, M; Schollenberger, J; Holstein, M. 2017. Rodehutscond. Nutrient compositions and *in vitro* methane production profiles of leaves and whole pods of twelve tropical multipurpose treespecies cultivated in Ethiopia. *Agroforestry Systems*. 93 (4): 1-13.
- Menke, K., and H. Steingass. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *LRRD*. 28:7-55.
- Miranda, LA; Sandoval-González, L; Améndola- Massioti, R. 2015. Producción de gas como método para estimar *in vitro* la concentración de carbohidratos fermentables en rumen, en Congreso Asociación Latinoamericana de producción animal. [En línea]. Disponible en: <http://www.sochipa.cl/uploads/media/ALPA2015>. Fecha de consulta: julio de 2020.
- Miranda-Romero, L. A; Vazquez-Mendoza, Paulina; Burgueño-Ferreira, J. A; Aranda-Osorio, G. 2018. Nutritive value of cactus pear silages for finishing lambs. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*. 20:196-215.
- Moate, PJ; Clarke, T; Davis, LH; Laby, RH. (1997). Rumen gases and bloat in grazing dairy cows. *Journal of Agricultural Science*, (129): 459–469.
- Molina, IC; Angarita, EA; Mayorga, OL; Chará, J; Barahona, R. 2016. Effect of *Leucaena leucocephala* on methane production of *Lucerna* heifers fed a diet based on *Cynodon plectostachyus*. *Livestock Science*. (185): 24-29
- Molina-Botero, IC; Arroyave-Jaramillo, J; Valencia-Salazar, S; Barahona-Rosales, R; Aguilar-Pérez, CF; Ayala, A; Ku-Vera, JC. 2019. Effects of tannins and saponins contained in foliage of *Gliricidia sepium* and pods of *Enterolobium cyclocarpum* on fermentation, methane emissions and rumen microbial population in crossbred heifers. *Animal Feed Science and Technology*. (251): 1–11.

- Montenegro-Ballester, J; Barrantes-Guevara, E; Ivankovich-Cruz, S. 2020. Cuantificación de metano entérico según estado fisiológico en vacas lecheras de alta producción en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 44(1): 79-92.
- Naumann, HD; Sepela, R; Rezaire, A; Masih, SE; Zeller, WE; Reinhardt, LA; Robe, JT; Sullivan, ML; Hagerman, AE. 2018. Relationships between structures of condensed tannins from Texas legumes and methane production during *In Vitro* rumen digestion. *Molecules*. 23 (9): 2123-2139.
- Naumann, HD; Tedeschi, LO; Zeller, WE; Huntley, NF. 2017. The role of condensed tannins in ruminant animal production: advances, limitations and future directions. *Revista brasileira de zootecnia*. 46(12): 929-949.
- NRC National Research Council. 2007. Nutrient Requirements of small ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids. The National Academies Press, Washington DC.
- Okpara, MO. 2019. Milk Fatty Acids Estimation by Mid-Infrared Spectroscopy as Proxy for Prediction of Methane Emission in Dairy Cows. *Russian Agricultural Sciences*. 45: 386–392.
- Paengkoum, P; Phonmun, T; Liang JB; Huang, XD; Tan, HY; Jahromi, MF. 2015. Molecular weight, protein binding affinity and methane mitigation of condensed tannins from mangosteen-peel (*Garcinia mangostana* L). *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 28(10): 1442-1448.
- Patra, AK. 2016. Recent advances in measurement and dietary mitigation of enteric methane emissions in ruminants. *Frontiers in Veterinary Science*. 3(39): doi: 10.3389/fvets.2016.00039
- Pérez, AA; Pinto, R; Ley, A; Ramírez, R; Molina, L; Guevara, F; Venegas, J. 2018. Estimación de la producción de metano (CH₄) y dióxido de carbono (CO₂) de la cerdaza. *Avances en Investigación Agropecuaria*. 22(2): 35-45.
- Pinares-Patiño, CS; Clark, HC. 2008. Reliability of the sulfur hexafluoride tracer technique for methane emission measurement from individual animals: An overview. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. (48): 223-229.
- Pinto, R; Gómez, H; Medina, F; Guevara, F; Hernández, A; Martínez, B; Hernández, D. Árboles forrajeros de Chiapas. 1a ed. Turrialba, Costa Rica: CATIE. Serie Técnica. Manual técnico/CATIE; no. 84).; 2008.

- Pinto-Ruiz, R; Hernández-Sánchez, D; Ramírez-Avilés, L; Sandoval-Castro, CA; Cobos-Peralta, M; Gómez-Castro, H. 2009. Taninos y fenoles en la fermentación *in vitro* de leñosas forrajeras tropicales. *Agronomía Mesoamericana*. 20(1): 81-89.
- Pinto-Trinidad, LR; Ramírez-Díaz, R; Sandoval-González, LM. 2019. Efecto del uso de semillas arbóreas forrajeras sobre la actividad fermentativa de los microorganismos ruminales. *BSAA*. 17(2): 46-5.
- Posada, SL; Noguera, RR. 2005. Técnica *in vitro* de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. *LRRD*. 17 (4). Disponible en: <http://www.lrrd.org/lrrd17/4/posa17036.htm>. Fecha de consulta: julio 2020.
- Ramin, M; Huhtanen, P. 2012. Development of an *in vitro* method for determination of methane production kinetics using a fully automated *in vitro* gas system-A modelling approach. *Anim Feed Sci Technol*. 174 (3-4):190-200.
- Ramírez-Díaz, R; Pinto-Ruiz, R; Medina-Jonapá, F; Guevara-Hernández, F. (2020). Efecto de inoculantes y aditivos sobre fracciones de fermentación ruminal y degradación *in vitro* en ensilaje de sorgo (*Sorghum* sp). *CienciaUAT*, 15(1), 172-179.<https://doi.org/10.29059/cienciauat.v15i1.1332>
- Ramos-Morales, E; Martín-García, AI; Jiménez, E; Arco-Pérez, A; Yáñez-Ruiz, DR; Frutos, P; Hervás, G. 2013. Comparación del muestreo a través de cánula ruminal o sonda esofágicas en ovejas y cabras: parámetros de fermentación y microorganismos del rumen. *XV Jornadas sobre Producción Animal*. II tomo. Zaragoza, España. Disponible en: <http://www.aida-itea.org/aida-itea/files/jornadas/2013/2013-%20XV%20Jornadas%20Prod.%20Animal%20TOMO%20II.pdf>. Fecha de consulta: agosto de 2020.
- Ribessi RL, Vanlierde A, Rodrigues JJ, Baeten V. Infrared Spectroscopy and Multivariate Method to Quantify Methane in Gas Sample Emitted by Cows. *Vib Spectrosc* 2020; <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2020.103059>. Consultado 30 de marzo, 2020.

- Ribessi, RL; Vanlierde A; Rodrigues JJ; Baeten V. 2020. Infrared Spectroscopy and Multivariate Method to Quantify Methane in Gas Sample Emitted by Cows. *Vib Spectrosc.* <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2020.103059>. Consultado 30 de marzo, 2020.
- Rivera, J.E; Molina, I.C; Donney`s, G; Villegas, G; Chará J; Barahona, R. 2015. Dinámica de fermentación y producción de metano en dietas de sistemas silvopastoriles intensivos con *L. leucocephala* y sistemas convencionales orientados a la producción de leche. *Livestock Research for Rural Development.* 27(4).
- Robinson, DL; Dominik, S; Donaldson, AJ; Oddy, VH. 2020. Repeatabilities, heritabilities and correlations of methane and feed intake of sheep in respiration and portable chambers. *Animal Production Science.* 60 (7): 880-892 <https://doi.org/10.1071/AN18383>.
- Rodríguez, JC; Paz, F; Watts, C; Lizárraga, C; Yépez, E; Jiménez, G; Castellanos, A; Hinojo C; Macías, CE. 2019. Mediciones de metano y bióxido de carbono usando la técnica de covarianza de vórtices en ganado lechero semiestabulado en Sonora, México. *Terra Latinamericana* 37: 69-80. DOI: <https://doi.org/10.28940/tl.v37i1.412>
- Rodríguez, R; Galindo, JL; Iraola, J; Gómez, S. 2017. Uso de la técnica de producción de gas para predecir la relación entre el nivel de consumo e indicadores de la fermentación ruminal *in vitro*. *Cuban J. Agric. Sci.* 51(3): 301-310.
- Rojas-Hernández, S; Olivares-Pérez, J; Avilés-Nova, F; Villa-Mancera, A; Reynoso-Palomar, A; Camacho-Díaz, LM. 2015. Productive response of lambs fed *Crescentia alata* and *Guazuma ulmifolia* fruits in a tropical region of Mexico. *Trop Anim Health Prod.* 47 (7):1431-1436.
- Saminathan, M; Gan, HM; Abdullah, N; Wong, CMVL; Ramiah, SK; Tan, HY; Sieo, CC; Ho YW. 2017. Changes in rumen protozoal community by condensed tannin fractions of different molecular weights from a *Leucaena leucocephala* hybrid *in vitro*. *J Appl Microbiol.* (123): 41-53.
- Sánchez, B; Flores, S; Rodríguez, E; Anaya, A.M; Contreras E.A. 2020. Causas y consecuencias del cambio climático en la producción pecuaria y salud animal. Revisión. *Revista mexicana de ciencias pecuarias.* 11(Supl. 2): 126-145.

- Sandoval, L; Miranda, LA; Lara, A; Huerta, M; Uribe, M; Martínez, M. 2016. Fermentación *in vitro* y la correlación del contenido nutrimental de leucaena asociada con pasto estrella. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 7(16): 3185-3196.
- Sandoval-Pelcastre, A; Ramírez-Mella, M; Rodríguez-Ávila, N; Candelaria-Martínez, B. 2020. Árboles y arbustos tropicales con potencial para disminuir la producción de metano en rumiantes. *Trop. Subtrop. Agroecosystems*. 23(33); <http://www.revista.ccba.uady.mx/ojs/index.php/TSA/article/view/3061>
- Santillán, S; Etchevers, V; Paz, J; Alvarado, F. 2016. Emisiones de gases de efecto invernadero en sistemas agrícolas de México. *Terra Latinoamericana*, 34(1): 83-96.
- SAS Institute, Inc. 2011. SAS user's guide: Statistics, Version 9.6th Edition. SAS Inst., Inc., Cary, NC.
- Schofield, P; Pell, AN. 1995. Measurement and kinetic analysis of the neutral detergent-soluble carbohydrate fraction of legumes and grasses. *Anim. Sci. J*. 73: 3455-3463.
- Schultze-Kraft, R; Rao, IM; Peters, M; Clements, RJ; Bai, C; Liu, G. 2018. Tropical forage legumes for environmental benefits: An overview. *Trop Grassl*. 6(1): 1-14.
- Schwarm, A; Schweigel-Röntgen, M; Kreuzer, M; Ortmann, S; Gill, F; Kuhla, B; Meyer, U; Lohölter, M; Derno, M. 2015. Methane emission, digestive characteristics and faecal rchaol in heifers fed diets based on silage from brown midrib maize as compared to conventional maize. *Archives of Animal Nutrition*. (69): 159-176.
- Shen, JS; Chai, Z; Song, LJ; Liu, JZ; Wu, YM. 2012. Insertion depth of oral stomach tubes may affect the fermentation parameters of ruminal fluid collected in dairy cows. *J. Dairy Sci*. 95 :5978–5984.
- Soliva, CR; Hess, HD. 2007. Measuring methane emission of ruminants by *in vitro* and *in vivo* techniques, Chapter 2 in: Makkar HPS and Vercoe PE (Editors).
- Storm I, Hellwing AL, Nielsen N, Madsen J. Methods for Measuring and Estimating Methane Emission from Ruminants. *Animals* 2012; (2): 160-183.
- Storm, I; Hellwing, A; Nielsen, N; Madsen, J. 2012. Methods for measuring and estimating methane emission from ruminants. *Animals* 2 (2): 160-183.

- Torres-Salado, N; Sánchez-Santillán, P; Rojas-García, AR; Herrera-Pérez, J; Hernández-Morales, J. 2018. Producción de gases efecto invernadero *in vitro* de leguminosas arbóreas del trópico seco mexicano. Arch Zootec. 67 (257): 55-59.
- Udén, P; Robinson, P; Mateos, G; Blank, R. 2012. Use of replicates in statistical analyses in papers sub-mitted for publication in Animal Feed Science and Technology. Anim Feed Sci Tech. 171(1): 1-5.
- Ugbogu, EA; Elghandour, MY; Ikpeazu, VO; Buendía, GR; Molina, OM; Arunsi, UO; Emmanuel, O; Salem, AZM. 2019. The potential impacts of dietary plant natural products on the sustainable mitigation of methane emission from livestock farming. 213: 915-925.
- Ungerfeld, EM; Escobar-Bahamondes, P; Muñoz, C. 2018. Predicción y mitigación de las emisiones de metano de los rumiantes. Agroproductividad. 11 (2): 34-39.
- Valencia, FL; Rojas, TA. 2019. Mecanismos de nutrición animal para reducir el efecto invernadero. Documentos De Trabajo ECAPMA, (2). Disponible en: <https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/workpaper/article/view/3459>. Consultado 22 de agosto, 2020.
- Van-Soest, P; Robertson, J; Lewis, B. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. J Dairy Sci 1991; 74:3583-3597.
- Vargas-Bayona, JG; Mejía-Porras, J; Bedoya-Mashuth, JF; Gómez-Patiño. 2013. Estimación de la técnica *in vitro* de gases frente a otras técnicas de digestibilidad. Spei Domus. 9(18): 59-70.
- Velarde-Guillén, J; Pellerin, D; Benchaar, C; Wattiaux, MA; Charbonneau, E. 2019. Development of an equation to estimate the enteric methane emissions from Holstein dairy cows in Canada. Canadian Journal of Animal Science. doi:10.1139/cjas-2018-0241
- Verge, XPC; De Kimpe, C; Desjardins, RL. 2007. Agricultural production, greenhouse gas emissions and mitigation potential. Agricultural and Forest Meteorology. 142 (2-4):255–69.
- Vermorel, M. 1995. Productions gazeuses et thermiques résultant des fermentations digestives. pp. 49-60. In: R. Jarrife, Y. Ruckebusch, C. Demarquilly, M. H. Farce

- et M. Journet (eds.). Nutrition des ruminants domestiques, ingestion et digestion. INRA Editions. Paris, France.
- Wallace, RJ. 1992. Rumen microbiology, biotechnology, and ruminant nutrition: The application of research findings to a complex microbial ecosystem. FEMS Microbiology Letters. 100 (1/3): 529-534.
- Yáñez, DR; Bannink, A; Dijkstra, J; Kebreab, E; Morgavi, DP; O’Kiely, P; Reynolds, CK; Schwarm, A; Shingfield, KJ; Yu Hristov, AN. 2016. Design, implementation and interpretation of *in vitro* batch culture experiments to assess enteric methane mitigation in ruminants: A review. Animal Feed Science and Technology. 216: 1-18.
- Zhong, RZ; Fang, Y; Sun, HX; Wang, M; Zhou, DW. 2016. Rumen methane output and fermentation characteristics of gramineous forage and leguminous forage at differing harvest dates determined using an *in vitro* gas production technique. Journal of Integrative Agriculture. 15(2): 414–423.