

# Producción de metano y bióxido de carbono in vitro de pastos tropicales de la costa de Oaxaca, México

## In vitro methane and carbon dioxide production of tropical grasses of the coast of Oaxaca, Mexico

Marco Antonio Camacho-Escobar<sup>1</sup> , Mónica Marcela Galicia-Jiménez<sup>2</sup> ,  
Edgar Iván Sánchez-Bernal<sup>3</sup> , Narciso Ysac Ávila-Serrano<sup>4</sup>  y Serafín Jacobo López-Garrido<sup>4\*</sup> 

<sup>1</sup> Cuerpo Académico Ciencias Agropecuarias, <sup>2</sup> Instituto de Genética, <sup>3</sup> Instituto de Ecología, <sup>4</sup> Posgrado en Producción y Sanidad Animal, Universidad del Mar, Campus Puerto Escondido. Carretera Sola de Vega km 1.5 Puerto Escondido. 71980 San Pedro Mixtepec, Oaxaca, México.

\*Autor para correspondencia (serafin@zicatela.umar.mx)

### RESUMEN

Los pastos tropicales poseen baja concentración de proteína cruda y mayor fibra detergente neutra. Los pastos fermentados en el rumen, presentan diferentes valores de digestibilidad, concentración de ácidos grasos volátiles (AGV), producción de metano (CH<sub>4</sub>) y bióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Objetivo: determinar la composición química, caracterizar la fermentación y estimar la producción de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> in vitro en pastos tropicales de Oaxaca. Materiales y métodos. Los pastos (0.5 g de materia seca): *Cynodon nlemfuensis*, *Andropogon gayanus*, *Pennisetum purpureum* cv. Taiwán Morado, *Pennisetum purpureum* cv. Maralfalfa y *Panicum maximum*, fueron incubados con 45 mL de medio para microorganismos anaerobios, y depositados en viales de vidrio de 100 mL mantenidos en condiciones anaerobias con CO<sub>2</sub>. Los pastos fueron inoculados con cinco mL de fluido ruminal de bovino e incubados a 39 °C durante 72 h. A las 6, 12, 24, 48 y 72 h se determinó la producción de biogás y la población de microorganismos. La concentración de AGV, pH y degradación de la materia seca in vitro (DIVMS) se determinaron a 72 h. A 24, 48 y 72 h se midió la producción de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>. Las variables se evaluaron mediante un diseño completamente aleatorizado utilizando cinco repeticiones por tratamiento, la comparación de medias se realizó mediante la prueba de Tukey. *Cynodon nlemfuensis* tuvo el mayor contenido de proteína cruda ( $P = 0.05$ ).

Las poblaciones de bacterias celulolíticas presentaron menor conteo en *Andropogon gayanus* así como en *Panicum máximum* ( $P < 0.05$ ). *Cynodon nlemfuensis*, *Andropogon gayanus* y *Pennisetum purpureum* cv. Taiwán Morado presentaron menores concentraciones de acetato ( $P < 0.05$ ), *Panicum maximum* tuvo mayor concentración de propionato ( $P < 0.05$ ). *Pennisetum purpureum* cv. Maralfalfa presentó la mayor DIVMS y produjo menor volumen de CH<sub>4</sub> ( $P < 0.05$ ), *Cynodon nlemfuensis* y *Panicum maximum* produjeron menores volúmenes de CO<sub>2</sub> ( $P < 0.05$ ).

**Palabras clave:** degradabilidad in vitro, fermentación, gramíneas, producción de GEI.

### SUMMARY

Tropical grasses have different chemical composition; when they are fermented in rumen, they show different values in digestibility, volatile fatty acid concentration (VFA), and methane (CH<sub>4</sub>) and carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) production. The objective of this study was to determine the chemical composition, characterize fermentation, and estimate CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> emissions in vitro in tropical grasses of Oaxaca. For the experiment, 0.5 g of dry matter of the grasses *Cynodon nlemfuensis*, *Andropogon gayanus*, *Pennisetum purpureum* cv. Taiwan Morado, *Pennisetum purpureum* cv. Maralfalfa and *Panicum maximum* were incubated with 45 mL of culture medium for anaerobic microorganisms and

#### Cita recomendada:

Camacho Escobar, M. A., M. M. Galicia Jiménez, E. I. Sánchez Bernal, N. Y. Ávila Serrano y S. J. López Garrido. 2020. Producción de metano y bióxido de carbono in vitro de pastos tropicales de la costa de Oaxaca, México. Terra Latinoamericana Número Especial 38-2: 425-434.  
DOI: <https://doi.org/10.28940/terra.v38i2.628>

Recibido: 24 de agosto de 2019.

Aceptado: 27 de marzo de 2020.

Publicado en Terra Latinoamericana 38: 425-434.

deposited in 100 mL glass vials with CO<sub>2</sub> flow. The grasses were inoculated with 5 mL of rumen fluid and incubated at 39 °C for 72 h. Biogas production and microorganism population were determined at 6, 12, 24, 48, and 72 h. Volatile fatty acid (VFA) concentrations, pH and in vitro dry matter degradability (IVDMD) were determined at 72 h. CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> emissions were estimated at 24, 48, and 72 h. The response variables were evaluated by a completely randomized design with five replicates per treatment; the comparison of means was made with Tukey's test. *C. nlemfuensis* had the highest ( $P < 0.05$ ) crude protein content. The cellulolytic bacterial population was lower ( $P < 0.05$ ) in *Andropogon gayanus* and *Panicum maximum*. *Cynodon nlemfuensis*, *Andropogon gayanus* and *Pennisetum purpureum* cv. Taiwan Morado had lower ( $P < 0.05$ ) acetate concentrations; *Panicum maximum* had higher ( $P < 0.05$ ) propionate concentration. *Pennisetum purpureum* cv. Maralfalfa showed the highest ( $P < 0.05$ ) IVDMD and produced the lowest ( $P < 0.05$ ) CH<sub>4</sub> volumes; *Cynodon nlemfuensis* and *Panicum maximum* produced lower CO<sub>2</sub> volumes.

**Index words:** *degradability, fermentation, grasses, GHG production.*

## INTRODUCCIÓN

Los forrajes de las zonas tropicales de México tienen menor porcentaje de proteína cruda y mayor proporción de carbohidratos estructurales celulosa, hemicelulosa y lignina; (Barboza *et al.*, 2009) que los pastos de las regiones templadas. Cuando los rumiantes se alimentan con forrajes de gramíneas los componentes de la pared celular son fermentados por bacterias celulolíticas que liberan endoglucanasas, exoglucanasas y β-glucosidasas que realizan su actividad de forma sinérgica para degradar la celulosa hasta glucosa en el rumen (Cai *et al.*, 2010). Posteriormente la glucosa es transformada en acetato y butirato, esta ruta metabólica produce hidrógeno (H<sub>2</sub>) y bióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), que son los sustratos para la producción de CH<sub>4</sub> por las arqueas metanogénicas como *Methanobacterium formicum*, *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanococcus mobilis* y *Methanosarcina mazei* (Hill *et al.*, 2016). El CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> y óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) forman parte de los gases de efecto invernadero (GEI). El de mayor impacto es el CH<sub>4</sub>, que tiene un potencial de calentamiento 28 veces mayor al del

CO<sub>2</sub> y puede permanecer en la atmósfera por 15 años (IPCC, 2013). Se ha reportado que del 3 al 10 % de la energía bruta consumida por un bovino se convierte a CH<sub>4</sub> y se elimina principalmente por el eructo (Eckard *et al.*, 2010), por lo que reducir sus emisiones puede tener dos efectos directos, por un lado, puede ayudar a reducir el calentamiento global, y por otro lado, evita las pérdidas de energía para aumentar la producción animal. Cuando se realiza la cosecha o el pastoreo de las gramíneas a la edad adecuada, éstas tienen menor contenido de paredes celulares y mayor contenido de proteína cruda y azúcares solubles, lo que puede ayudar a reducir la generación de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> (Stolaroff *et al.*, 2008). Realizar la cosecha o el pastoreo en un periodo adecuado de rebrote en las gramíneas forrajeras es importante para hacer un aprovechamiento óptimo, consiguiendo un equilibrio entre producción de materia seca y calidad del alimento (Sánchez, 2007). La edad óptima a la que se deben cosechar los forrajes tropicales varía de acuerdo a la especie, variedad, velocidad de crecimiento, época del año y manejo. Los pastos de rápido crecimiento como el *Cynodon nlemfuensis* tienen una edad de cosecha entre 25 y 30 días, los de mediano crecimiento como *Andropogon gayanus* y *Pennisetum purpureum* cv. Taiwan morado entre 42 y 56 días y los de crecimiento más lento como el *Pennisetum purpureum* cv. Maralfalfa y *Panicum máximum* entre 60 y 90 días (Villalobos y Arce, 2013; Hinojosa *et al.*, 2014). En las regiones ganaderas del trópico en México existen escasos estudios a nivel regional sobre la emisión de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> de las gramíneas forrajeras que consume el ganado. Por lo tanto, se carecen de programas para implementar estrategias de alimentación para reducir la producción de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> (Molina *et al.*, 2013). En nuestro país numerosas investigaciones han generado información sobre la producción de CH<sub>4</sub> de forrajes y de los insumos que componen las dietas de los rumiantes en distintas regiones y variados sistemas de producción; sin embargo, se requieren estudios más detallados a nivel regional, para implementar de forma eficiente estrategias de alimentación para disminuir la producción de metano (Bonilla y Lemus, 2012). La síntesis de metano en el rumen está influenciada por los factores que afectan al forraje, tales como temperatura, humedad precipitación pluvial, tipo de suelo, fertilización, disponibilidad de agua y características del forraje como especie, variedad, días a la cosecha lo que influye en el porcentaje de proteína cruda, carbohidratos solubles, paredes celulares y

degradabilidad. Además, los propios del animal como la talla, el componente genético, consumo de materia seca y metabolismo. Rivera *et al.* (2015) enfatizan que la producción de metano varía entre países, regiones, incluso entre prácticas productivas. Por lo que existe la necesidad de evaluar las características químicas, fermentativas y las emisiones de metano de los pastos tropicales de cada región en particular para identificar las alternativas que resulten eficaces para reducir la producción de metano según las condiciones de producción (Carmona *et al.*, 2005). El objetivo del presente estudio fue determinar la composición química, las características de la fermentación ruminal *in vitro* y estimar la producción de metano y dióxido de carbono de los pastos de la costa de Oaxaca.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Descripción del Sitio de Estudio

Las parcelas y los laboratorios donde se realizó el estudio se encuentran ubicados en el Campo Experimental, los Laboratorios de Nutrición y Microbiología son parte de la Licenciatura en Zootecnia de la Universidad del Mar, Campus Puerto Escondido. Se localiza en la comunidad de Bajos de Chila del municipio de San Pedro Mixtepec, Juquila, Oaxaca, en el kilómetro 128.1 de la carretera Federal Pinotepa Nacional-Puerto Escondido, ubicado entre las coordenadas 15° 55' 27.54" N y 97° 09' 04.09" O y altitud de 12 m. El clima predominante es cálido subhúmedo, clasificado como A(c) w2 y Aw0 (García, 2004), con dos estaciones marcadas, lluviosa y de secas, con intervalos de temperatura media anual entre 22 a 26 °C y una precipitación pluvial de 930.8 a 1668.0 mm por año. El tipo de suelo predominante corresponde al tipo regosol éutrico con una fertilidad moderada, su textura varía desde arena hasta migajón arcillo-arenoso. La actividad predominante corresponde a la agricultura y la ganadería debido a la abundancia de gramíneas presentes en este tipo de suelo (CRENCO, 2007).

### Obtención de las Muestras y Tratamientos

Se seleccionaron cinco parcelas, una para cada tipo de pasto en estudio, con superficie de 20 m<sup>2</sup> para cada pasto. Inicialmente los pastos de cada parcela fueron cortados a 15 cm de altura, se dejaron crecer

y posteriormente fueron cosechados para su análisis. Los tratamientos evaluados fueron los siguientes: Cn26 = *Cynodon nlemfuensis*, cosechado a 26 días de rebrote. Ag35 = *Andropogon gayanus*, cosechado a los 35 días de rebrote, Pptm45 = *Pennisetum purpureum* cv. Taiwan Morado, cosechado a los 45 días de rebrote, Ppm40 = *Pennisetum purpureum* cv. Maralfalfa, cortado a los 40 días de rebrote y Pm35 = *Panicum maximum*, cosechado a los 35 días de rebrote.

### Análisis Químico de los Pastos

A las muestras de los pastos se les determinó humedad en un horno de secado (Felisa®, México) a 65 °C durante 48 h (Herrera, 2014). Las muestras secas fueron molidas en un molino industrial (Ika® Werke MF 10, U.S.A.) equipado con malla de 1 mm (Williams, 2000). A las dietas por quintuplicado se les determinó el porcentaje de proteína cruda (PC) por el método de Kjeldahl (AOAC, 1990); fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) de acuerdo a la metodología descrita por Van Soest *et al.* (1994). Los análisis fueron realizados en el Laboratorio de Nutrición Animal del Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, México.

### Fermentación Ruminal *in vitro*

**Preparación de los medios de cultivo.** Para cuantificar las poblaciones de microorganismos ruminales, AGV, degradabilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) y generación de biogás (CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>), se utilizó el medio de cultivo para bacterias totales que contenía glucosa, celobiosa, almidón y fluido ruminal fresco (GCA-FR), el cual se elaboró según los métodos de Cobos y Yokoyama (1995), fue preparado en condiciones de esterilidad y bajo flujo de CO<sub>2</sub>. La fuente de inóculo utilizado fue fluido ruminal fresco extraído 2 h después de ser alimentado, de un bovino adulto cruzado de Cebú × Pardo Suizo, de 500 kg con cánula ruminal, el cual fue alimentado con 90% de *Panicum máximum* y 10% de alimento concentrado cuyo contenido fue de 2.6 Mcal de EM y 14% de proteína cruda.

**Microorganismos ruminales.** La población de bacterias ruminales se determinó por conteo directo mediante una muestra obtenida directamente de los biofermentadores a las 6, 12, 24, 48 y 72 h de incubación en una cámara Petroff Houser® (U.S.A.) en un microscopio óptico Motich® (México), a

1000 magnificaciones. El procedimiento se realizó de acuerdo a lo reportado por Cobos *et al.* (2011). La población de bacterias celulolíticas se cuantificó a 72 h de incubación mediante la técnica del número más probable (NMP) descrita por Harrigan y McCance (1979). Se inoculó líquido proveniente de los biofermentadores en tubos de ensayo de 13 × 100 mm que contenían medio de cultivo líquido para bacterias celulolíticas preparado de acuerdo a las técnicas de Hungate (1969) y Cobos *et al.* (2011). El desarrollo microbiano se confirmó por la degradación del papel Whatman 541 durante 10 d a 39.0 °C. La población de protozoarios fue calculada a 6, 12, 24, 48 y 72 h por método directo (Cobos *et al.*, 2011) mediante una cámara Neubauer-improved (Marienfeld, U.S.A.) en un microscopio óptico (Motic®, México), a 400 magnificaciones. El pH se midió directamente del fluido de los biodigestores obtenido a 72 h de fermentación con potenciómetro portátil (Orion®, U.S.A.).

**Ácidos Grasos Volátiles (AGV).** Las muestras de los biodigestores fueron obtenidas a 72 h y depositadas en viales Eppendorf® (U.S.A) de 2 mL, con ácido meta-fosfórico (Merck®, U.S.A.) al 25% con una proporción 4:1, y se congelaron a -4 °C. Posteriormente se midió la concentración molar de los AGV de acuerdo a las técnicas reportadas por Erwin *et al.* (1961). Utilizando un cromatógrafo de gases (Perkin Elmer®, U.S.A.) con un detector de ionización con flama. Las condiciones de trabajo fueron: temperatura de horno 130 °C, y del inyector y la columna capilar (15 × 0.32 m) 250 °C. Los tiempos de retención fueron 1.26 min para acetato, 1.6 min propionato y 2.09 min butirato. Los análisis fueron realizados en los Laboratorios de Microbiología Ruminal y Genética Microbiana del Colegio de Postgraduados, México.

**Determinación de pH.** A 72 h de incubación se determinó el pH del fluido de los biofermentadores con un potenciómetro portátil (Orion®, U.S.A.), calibrado a pH cuatro y siete.

### **Degradabilidad *in vitro* de la Materia Seca y Producción de Biogás (CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>)**

**Degradación *in vitro* de la materia seca (DIVMS).** Para determinar la degradabilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) el contenido del biofermentador se filtró a 72 h de incubación en papel Whatman® 541 para recuperar la materia seca no degradada y por diferencia

de peso se calculó la digestibilidad de acuerdo a las técnicas reportadas por Mellenberger *et al.* (1970).

**Determinación de las emisiones de biogás (CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>).** Se pesaron 0.5 g de MS de cada tratamiento y fueron agregadas por quintuplicado en viales serológicos de 120 mL. A cada vial se le agregó 45 mL de medio de cultivo estéril para bacterias totales (Cobos y Yokoyama, 1995). Los viales fueron inoculados en condiciones anaerobias con CO<sub>2</sub>, a cada vial se le agregó 5 mL de fluido ruminal fresco. Cada vial se consideró un biofermentador y una unidad experimental. La producción de biogás se cuantificó mediante la técnica descrita por Krabill *et al.* (1969), cuya modificación fue reportada por Cobos *et al.* (2018). Los biofermentadores se colocaron en un baño María a 39 °C, se conectaron con las trampas de captura de biogás por medio de una manguera Tygon® con un diámetro interior de 3/32". La manguera fue adaptada con dos agujas marca Terumo® de calibre 20 GX1" en cada extremo. Una aguja del extremo de la manguera se colocó en el biofermentador y la otra a la trampa de captura de biogás, la que contenía una aguja como válvula de liberación. La trampa se colocó en forma invertida en una probeta de plástico. Se cuantificó el volumen de biogás a 6, 12, 24, 48 y 72 h de incubación. Para medir las proporciones de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> se tomó una muestra de 500 µL del biogás atrapado en las trampas, el cual se inyectó en un cromatógrafo de gases (Perkin Elmer®, U.S.A.) provisto con un indicador de conductividad térmica y una columna empacada Poropack. Las condiciones de detección fueron las siguientes: temperaturas de horno 80 °C, columna empacada 170 °C y detector de conductividad térmica 130 °C; los tiempos de retención fueron 0.71 min y 1.005 min para CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>, respectivamente. El gas transportador fue helio con una circulación de 23 mL m<sup>-1</sup>. Los análisis fueron realizados en el Laboratorio de Microbiología Ruminal y Genética Microbiana del Colegio de Postgraduados, México.

### **Análisis Estadístico**

Se utilizó un diseño completamente aleatorio utilizando cinco tratamientos y cinco repeticiones en cada uno de ellos. Las variables evaluadas se examinaron mediante el análisis de varianza con el procedimiento PROC GLM del paquete estadístico SAS (SAS, 2003) y para la comparación de medias se

usó la prueba de Tukey, (Steel y Torrie, 1988)  $\alpha = 0.05$ . Para las variables de población de bacterias totales, bacterias celulolíticas y protozoarios, se realizó una transformación logarítmica para normalizar los datos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Composición Química de los Pastos

En el Cuadro 1 se muestran los resultados de la composición química de los pastos evaluados. Los pastos con los mayores ( $P < 0.05$ ) contenidos de materia seca (MS) fueron el *Andropogon gayanus*, *Cynodon nlemfuensis* y *Panicum maximum*, cuyos valores oscilaron entre 17 y 20%. Se observa que el contenido de MS de *Pennisetum purpureum* cv. Taiwán morado fue menor a 10% y *Pennisetum purpureum* cv. Maralfalfa fue menor a 12%. Van Soest (1994) indica que la diferencia de MS en los pastos se debe a la edad fisiológica al momento del corte, un mayor contenido de MS a una edad fenológica temprana indica mayor contenido de materia orgánica, lo que implica mayor contenido de nutrientes. Los pastos del presente estudio fueron cortados a la edad de rebrote recomendada por Villalobos y Arce (2013) e Hinojosa et al. (2014). El Cuadro 1 también muestra los resultados de proteína cruda (PC) de los pastos, el contenido de PC fue menor ( $P < 0.05$ ) a seis por ciento en *Pennisetum purpureum* cv. Taiwán morado y *Pennisetum purpureum* cv. Maralfalfa, mientras que en *Panicum maximum* fue de 13% y en *Cynodon nlemfuensis* fue mayor a nueve por ciento ( $P < 0.05$ ). En general, las gramíneas tienen un bajo porcentaje de proteína cruda, menor

contenido de nitrógeno que limita el desarrollo de los microorganismos del rumen (Dijkstra et al., 2005). Ley de Coss et al. (2018) reportan valores de 9.56% para *Cynodon nlemfuensis* cosechado a 75 d de edad que son similares a los resultados del presente estudio. El porcentaje de Fibra Detergente Neutro (FDN) presentó diferencias ( $P < 0.05$ ) entre los pastos. El valor más bajo de FDN lo tuvieron *Pennisetum purpureum* cv. Taiwán Morado, *Pennisetum purpureum* cv. Maralfalfa y *Cynodon nlemfuensis* que fluctuó de 66.87 a 73.97%, mientras que *Panicum maximum* tuvo el contenido más alto de FDN (86.31%). Juárez et al. (2009) y Ley de Coss et al. (2018) han determinado en *Panicum maximum* un contenido de 67.24% y 72.70 de FDN respectivamente, que son valores menores a los obtenidos en el presente experimento. En general, la fibra detergente ácido (FDA) presentó la misma tendencia que la FDN como se observa en el Cuadro 1. Villalobos y Arce (2013) enfatizan que cuando el contenido de FDN y FDA es mayor en los pastos disminuye la digestibilidad de la MS, lo que reduce el aporte de nutrientes.

### Evaluación de la Fermentación Ruminal *in vitro* (Microorganismos, AGV y pH)

**Microorganismos ruminales.** La población de bacterias ruminales totales y protozoarios no mostraron diferencias ( $P > 0.05$ ), como se observa en el Cuadro 2. La población de bacterias fue de  $10^9$  células por mL del medio, de acuerdo con Yokoyama y Johnson (1988) las bacterias están en el rango adecuado de la población de bacterias ruminales.

**Cuadro 1. Composición química de los pastos tropicales evaluados.**

**Table 1. Chemical composition of the evaluated tropical grasses.**

Nutriente (%)	Cn26	Ag35	Pptm45	Ppm40	Pm35	EEM
Materia seca	17.29b <sup>†</sup>	20.79a	9.50d	11.50c	18.33b	0.27
Proteína cruda	9.59b	7.61c	5.71d	5.86d	13.11a	0.19
FDN	73.95c	77.24b	66.87d	73.97c	86.31a	0.16
FDA	46.91e	66.21a	54.80d	62.35b	61.43c	0.12

<sup>†</sup> Letras diferentes en la misma hilera indican diferencias significativas, de acuerdo con la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ). Cn26 = *Cynodon nlemfuensis* cosechado a los 26 días, Ag35 = *Andropogon gayanus* cosechado a los 35 días, Pptm45 = *Pennisetum purpureum* cv. Taiwan morado cosechado a los 45 días, Ppm40 = *Pennisetum purpureum* cv. Maralfalfa cosechado a los 40 días, Pm35 = *Panicum maximum* cosechado a los 35 días de rebrote, EEM = error estándar de la media.

<sup>†</sup> Different letters in the same row indicate significant differences according to Tukey's test ( $P < 0.05$ ). Cn26 = *Cynodon nlemfuensis* harvested at 26 days; Ag35 = *Andropogon gayanus* harvested at 35 days; Pptm45 = *Pennisetum purpureum* cv. Taiwan purple harvested at 45 days; Ppm40 = *Pennisetum purpureum* cv. Maralfalfa harvested at 40 days; Pm35 = *Panicum maximum* harvested at 35 days of regrowth; EEM = standard error of the mean.

**Cuadro 2. Población de microorganismos y características de la fermentación ruminal in vitro de los pastos tropicales a las 72 h de incubación.****Table 2. Microorganism population and in vitro characteristics of ruminal fermentation of tropical grasses at 72 h of incubation.**

Variable	Cn26	Ag35	Pptm45	Ppm40	Pm35	EEM
Microorganismos ruminales						
Bacterias totales (109 mL <sup>-1</sup> )	6.67a	5.08a	6.25a	6.92a	3.50a	0.67
Protozoarios (105 mL <sup>-1</sup> )	5.12a	5.09a	5.14a	5.00a	5.16a	0.13
Bacterias celulolíticas (106 mL <sup>-1</sup> )	151.60c <sup>†</sup>	1.52e	1120.00b	1420.00a	111.33d	3.70
Ácidos grasos volátiles (mM L <sup>-1</sup> )						
Acetato	24.86b	25.01b	23.07 c	26.25 a	26.09 a	0.27
Propionato	12.22c	13.10b	11.31d	12.88b	14.24a	0.03
Butirato	7.21c	7.27 c	6.72 d	7.72 b	8.38a	0.05
ph	6.57a	6.42a	6.49 a	6.48 a	6.55 a	0.72

<sup>†</sup> Letras diferentes en la misma hilera indican diferencias significativas, de acuerdo con la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ). Cn26 = *Cynodon nlemfuensis* cosechado a los 26 días, Ag35 = *Andropogon gayanus* cosechado a los 35 días, Pptm45 = *Pennisetum purpureum* cv. Taiwan morado cosechado a los 45 días, Ppm40 = *Pennisetum purpureum* cv. Maralfalfa cosechado a los 40 días, Pm35 = *Panicum maximum* cosechado a los 35 días de rebrote, EEM = error estándar de la media.

<sup>†</sup> Different letters in the same row indicate significant differences according to Tukey's test ( $P < 0.05$ ). Cn26 = *Cynodon nlemfuensis* harvested at 26 days; Ag35 = *Andropogon gayanus* harvested at 35 days; Pptm45 = *Pennisetum purpureum* cv. Taiwan purple harvested at 45 days; Ppm40 = *Pennisetum purpureum* cv. Maralfalfa harvested at 40 days; Pm35 = *Panicum maximum* harvested at 35 days of regrowth; EEM = standard error of the mean.

La población de protozoarios en el rumen puede fluctuar de  $10 \times 10^4$  a  $20 \times 10^5$  células por mililitro de fluido ruminal (Yokoyama y Jonhson, 1988), lo que corresponde con los valores obtenidos en este estudio. La mayor concentración de bacterias celulolíticas la tuvieron *Pennisetum purpureum* cv. Taiwán Morado y *Pennisetum purpureum* cv. Maralfalfa, mientras que *Cynodon nlemfuensis*, *Andropogon gayanus* y *Panicum maximum* mostraron una menor ( $P < 0.05$ ) población de bacterias celulolíticas. Una menor población de bacterias celulolíticas se ha relacionado con una reducción de la degradabilidad de la materia seca en rumen (Yogianto *et al.*, 2014), debido a que las bacterias celulolíticas degradan polisacáridos estructurales de la pared celular, para lo cual requieren pH cercano al neutro para su adecuado metabolismo (Barboza *et al.*, 2009). Además, en un pH inferior a 6.0 se inhibe el crecimiento de las bacterias celulolíticas (Chen *et al.*, 2011).

**Producción de ácidos grasos volátiles (AGV).** La concentración de acetato fue mayor ( $P < 0.05$ ) en el pasto *Pennisetum purpureum* cv. Maralfalfa, mientras que la menor concentración ( $P < 0.05$ ) de acetato y propionato la tuvo *Cynodon nlemfuensis*; *Panicum maximum* tuvo mayor producción ( $P < 0.05$ ) de acetato y propionato. La concentración de butirato fue mayor ( $P < 0.05$ ) en *Panicum maximum*, la menor producción

( $P < 0.05$ ) la presentó *Pennisetum purpureum* cv. Taiwán Morado. Las bacterias celulolíticas que degradan en el rumen los carbohidratos estructurales de la pared celular de los pastos tropicales dan como productos finales acetato y CO<sub>2</sub> (Cai *et al.*, 2010). La mayor producción de acetato y butirato por la fermentación de los pastos en el rumen originan una mayor disponibilidad de CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub> que son sustratos para la síntesis de CH<sub>4</sub> (Ley de Coss *et al.*, 2018); mientras que la formación de propionato se considera una forma competitiva para captar H<sub>2</sub> que resulta en una menor síntesis de CH<sub>4</sub> (Gidlund *et al.*, 2015), se produce mayor concentración de propionato cuando los rumiantes consumen pastos con alto contenido de azúcares solubles o debido a un aporte de almidones en la dieta (Cobos *et al.*, 2018).

**Valores de pH de los de cultivos.** El pH de los cultivos no presentó diferencias ( $P > 0.05$ ) a 72 h de incubación, como se aprecia en el Cuadro 2. En general, los valores de pH variaron de 6.42 a 6.57. Se considera que un pH menor a 6.5 puede disminuir la población de bacterias celulolíticas y la producción de CH<sub>4</sub>, lo cual se debe a una reducción de la actividad de las bacterias que degradan paredes celulares (Russell *et al.*, 2009). Otra de las causas por las que puede disminuir el pH ruminal es por el aumento en la concentración de los AGV

(Sánchez y Cobos, 2016). La fermentación ruminal de los pastos con alto contenido de paredes celulares, como los evaluados en este estudio, no causan disminuciones de pH menores a 6.3 debido a que una gran proporción de la glucosa liberada se fermenta hasta acetato (Ley de Coss *et al.*, 2018).

**Producción de biogás.** La generación de biogás en los distintos pastos no presentó diferencias ( $P > 0.05$ ) entre las 6 y las 48 h como se muestra en el Cuadro 3. En general, la mayor producción de biogás se presentó entre las 6 y 24 h, lo que indica que en este periodo hubo gran actividad de las bacterias para degradar los sustratos (Ley de Coss *et al.*, 2018).

A 72 h los pastos *Cynodon nlemfuensis* y *Andropogon gayanus* produjeron la menor producción de biogás ( $P < 0.05$ ), mientras que *Panicum maximum* produjo la mayor producción ( $P < 0.05$ ). El volumen de biogás producido durante la fermentación es un buen indicador para predecir la degradabilidad y la síntesis de proteína microbiana por los microorganismos ruminales, también se ha demostrado que la DIVMS tienen una estrecha relación con el volumen de biogás emitido (Mould *et al.*, 2005; Rivera *et al.*, 2015). Los pastos evaluados del presente experimento produjeron en promedio 170.67 mL g<sup>-1</sup> MS, lo cual coinciden con lo reportado por Rivera *et al.* (2015) y contrastan con Ley de Coss *et al.* (2018), quienes reportaron mayor producción de biogás a las 72 h de incubación en pastos tropicales.

### Degradabilidad *in vitro* de la Materia Seca (DIVMS) y Emisiones de Biogás, CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>

**Degradación *in vitro* de la materia seca.** La DIVMS de los pastos presentó diferencias ( $P < 0.05$ ) como se muestra en el Cuadro 3. El pasto *Pennisetum purpureum* cv. Maralfalfa presentó la mayor ( $P < 0.05$ ) degradabilidad de la MS. El promedio de la degradabilidad de los pastos evaluados en el presente experimento es de 65.81%. La degradabilidad *in vitro* de los pastos tropicales es un indicador del potencial como aporte de nutrientes para el rumiante (Ruiz, 2011). La degradabilidad de los pastos es afectada por su contenido de FDN, la edad de cosecha o pastoreo, la madurez, y la época del año (Barahona y Sánchez, 2005). En el presente estudio la menor DIVMS de *Cynodon nlemfuensis* parece estar relacionada con la reducción de la población de las bacterias celulolíticas, por lo cual produjo menor concentración de acetato, debido a que estas bacterias degradan polisacáridos estructurales de la pared celular hasta acetato y CO<sub>2</sub> (Miron *et al.*, 2001).

**Producción de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>.** La producción de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> (Cuadro 4) presentaron diferencias ( $P < 0.05$ ). La producción de ambos gases fue menor entre las 24 h y las 72 h. El pasto *Pennisetum purpureum* cv. Maralfalfa produjo menor volumen ( $P < 0.05$ ) de CH<sub>4</sub>, comparado con *Andropogon gayanus* que produjo más gas ( $P < 0.05$ ). La producción de CH<sub>4</sub> es un indicador

**Cuadro 3. Producción de biogás a 6, 12, 24, 48 y 72 h durante la fermentación ruminal *in vitro* de pastos tropicales.**  
**Table 3. Biogas production at 6, 12, 24, 48, and 72 h during *in vitro* ruminal fermentation of tropical grasses.**

Tiempo	Cn26	Ag35	Pptm45	Ppm40	Pm35	EEM
Horas	----- mL g MS <sup>-1</sup> -----					
6	51.33a	56.13a	58.00a	40.00a	33.27a	8.77
12	60.13a	60.07a	57.00a	57.73a	44.00a	4.89
24	40.20a	50.00a	44.87a	48.27a	59.93a	4.96
48	21.53a	27.00a	18.20a	19.13a	19.87a	2.17
72	3.40b <sup>†</sup>	3.60b	4.27b	4.26b	8.20a	1.28
Acumulado	176.60a	196.80a	182.30a	169.39a	165.27a	15.87

<sup>†</sup> Letras diferentes en la misma hilera indican diferencias significativas, de acuerdo con la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ). Cn26 = *Cynodon nlemfuensis* cosechado a los 26 días, Ag35 = *Andropogon gayanus* cosechado a los 35 días, Pptm45 = *Pennisetum purpureum* cv. Taiwan morado cosechado a los 45 días, Ppm40 = *Pennisetum purpureum* cv. Maralfalfa cosechado a los 40 días, Pm35 = *Panicum maximum* cosechado a los 35 días de rebrote, EEM = error estándar de la media.

<sup>†</sup> Different letters in the same row indicate significant differences according to Tukey's test ( $P < 0.05$ ). Cn26 = *Cynodon nlemfuensis* harvested at 26 days; Ag35 = *Andropogon gayanus* harvested at 35 days; Pptm45 = *Pennisetum purpureum* cv. Taiwan purple harvested at 45 days; Ppm40 = *Pennisetum purpureum* cv. Maralfalfa harvested at 40 days; Pm35 = *Panicum maximum* harvested at 35 days of regrowth; EEM = standard error of the mean.

**Cuadro 4. DIVMS, producción de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> acumulados a 24, 48 y 72 h durante la fermentación ruminal in vitro de pastos tropicales.****Table 4. IVDMD, CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> production accumulated at 24, 48, and 72 h during in vitro ruminal fermentation of tropical grasses.**

Variable	Cn26	Ag35	Pptm45	Ppm40	Pm35	EEM
DIVMS	59.91b <sup>†</sup>	64.75b	69.32ab	72.87a	62.20b	1.72
CH <sub>4</sub> (mL g MS <sup>-1</sup> )						
24 h	52.26b	61.46a	41.80c	31.00d	39.53c	0.49
48 h	59.68b	71.44a	46.55c	35.06e	43.33d	0.57
72 h	60.86b	72.78a	47.66c	35.96d	47.70c	0.43
CO <sub>2</sub> (mL g MS <sup>-1</sup> )						
24 h	99.40d	104.74c	118.07a	115.00b	97.67d	0.52
48 h	113.51c	121.76b	131.52a	130.07a	113.74c	0.41
72 h	115.74c	124.02b	134.68a	133.46a	117.57c	0.38

<sup>†</sup> Letras diferentes en la misma hilera indican diferencias significativas, de acuerdo con la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ). Cn26 = *Cynodon nlemfuensis* cosechado a los 26 días, Ag35 = *Andropogon gayanus* cosechado a los 35 días, Pptm45 = *Pennisetum purpureum* cv. Taiwan morado cosechado a los 45 días, Ppm40 = *Pennisetum purpureum* cv. Maralfalfa cosechado a los 40 días, Pm35 = *Panicum maximum* cosechado a los 35 días de rebrote, EEM = error estándar de la media.

<sup>†</sup> Different letters in the same row indicate significant differences according to Tukey's test ( $P < 0.05$ ). Cn26 = *Cynodon nlemfuensis* harvested at 26 days; Ag35 = *Andropogon gayanus* harvested at 35 days; Pptm45 = *Pennisetum purpureum* cv. Taiwan purple harvested at 45 days; Ppm40 = *Pennisetum purpureum* cv. Maralfalfa harvested at 40 days; Pm35 = *Panicum maximum* harvested at 35 days of regrowth; EEM = standard error of the mean.

de la actividad fermentativa de las bacterias durante la fermentación anaerobia, en este proceso intervienen distintos grupos de bacterias, como las fibrolíticas que fraccionan los polisacáridos estructurales hasta azúcares, las formadoras de AGV y las arqueas metanogénicas que sinterizan CH<sub>4</sub> a partir de H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> (McAllister y Newbold, 2008; Morgavi *et al.*, 2010). El acetato y butirato originan la producción de CH<sub>4</sub> por la mayor disponibilidad de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> para las arqueas metanogénicas. Los protozoarios del rumen producen acetato e H<sub>2</sub> como productos finales de su metabolismo, además generan mayor producción de H<sub>2</sub> cuando las dietas son a base de forrajes, una alta proporción de acetato origina una mayor producción de CH<sub>4</sub>, lo que se traduce en una baja utilización de la energía por el rumiante (Ley de Coss *et al.*, 2018).

La menor ( $P < 0.05$ ) producción de CO<sub>2</sub> la presentaron los pastos *Cynodon nlemfuensis* y *Panicum maximum*, mientras que la mayor ( $P < 0.05$ ) producción la tuvieron *Pennisetum purpureum* cv. Taiwan morado y *Pennisetum purpureum* cv. Maralfalfa. La disminución de la emisión de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> en rumen es importante porque existe menor disponibilidad de estos sustratos para la producción de CH<sub>4</sub> (Morgavi *et al.*, 2010).

## CONCLUSIONES

*Panicum maximum* y *Cynodon nlemfuensis* fueron los pastos que presentaron más de 9% de proteína cruda y menor contenido de FDN. Durante la fermentación ruminal *in vitro* los pastos evaluados presentaron un adecuado desarrollo de microorganismos ruminales, lo que produjo una degradación promedio de la materia seca superior a 60%. Además, en los distintos pastos se obtuvo una producción de biogás menor a 200 mL g MS<sup>-1</sup>. *Pennisetum purpureum* cv. Taiwan morado, *Pennisetum purpureum* cv. Maralfalfa y *Panicum maximum* produjeron menos de 50 mL de CH<sub>4</sub> g MS<sup>-1</sup>. *Cynodon nlemfuensis* y *Panicum maximum* presentaron la menor producción de CO<sub>2</sub>.

## LITERATURA CITADA

- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1990. Official Methods of analysis. 15th ed. AOAC. Arlington, Virginia. USA.
- Barahona-Rosales, R. y S. Sánchez-Pinzón. 2005. Limitaciones físicas y químicas de la digestibilidad de pastos tropicales y estrategias para aumentarla. *Cienc. Tecnol. Agropec.* 6: 69-82. doi: [https://doi.org/10.21930/rcta.vol6\\_num1\\_art:39](https://doi.org/10.21930/rcta.vol6_num1_art:39).



- Barboza, P. S., K. L. Parke, and I. D. Hume. 2009. Integrative Wildlife Nutrition. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Heidelberg, Germany. doi: <https://doi.org/10.1007/978-3-540-87885-8>.
- Bonilla-Cárdenas, J. A. y C. Lemus-Flores. 2012. Emisión de metano entérico por rumiantes y su contribución al calentamiento global y al cambio climático. *Rev. Mex. Cienc. Pec.* 3: 215-246.
- Cai, S., J. Li, F. Ze Hu, K. Zhang, Y. Luo, B. Janto, R. Boissy, G. Ehrlich, and X. Dong. 2010. *Cellulosilyticum ruminicola*, a newly described rumen bacterium that possesses redundant fibrolytic-protein-encoding genes and degrades lignocellulose with multiple carbohydrate-borne fibrolytic enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 3818-3824. doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.03124-09>.
- Carmona, J. C., D. M. Bolivar y L. A. Giraldo. 2005. El gas metano en la producción ganadera y alternativas para medir sus emisiones y aminorar su impacto a nivel ambiental y productivo. *Rev. Col. Cienc. Pec.* 18: 49-63.
- Chen, Y., G. B. Penner, M. Li, M. Oba, and L. G. Guan. 2011. Changes in bacterial diversity associated with epithelial tissue in the beef cow rumen during the transition to a high grain diet. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 5770-5781. doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.00375-11>.
- Cobos, M. A. and T. Yokoyama. 1995. *Clostridium paratrificum* var. Ruminantium: colonization and degradation of shrimp carapaces *in vitro* observed by scanning electron microscopy. pp. 151-161. In: R. J. Wallace and Lahlou-Kassi. (eds.). Rumen ecology research planning. Proceedings of a workshop held at international livestock research institute (ILRI). Addis Ababa, Ethiopia.
- Cobos-Peralta, M. A., M. A. Mata-Espinosa, M. Pérez-Sato, D. Hernández-Sánchez y R. Ferrera-Cerrato. 2011. Envases de polietilentereftalato molidos y su función como sustituto de fibra en la dieta de borregos. *Agrociencia* 45: 33-41.
- Cobos-Peralta, M. A., K. R. Curzaynz-Leyva, M. I. Rivas-Martínez, E. A. Santillán-Gómez y J. R. Barcena. 2018. Efecto *in vitro* de dietas para corderos más un suplemento de granos secos de destilería en la fermentación ruminal y emisión de gases. *Agrociencia* 52: 203-215.
- Eckard, R. J., C. Grainger, and C. A. M. de Klein. 2010. Options for the abatement of methane and nitrous oxide from ruminant production: A review. *Livestock Sci.* 130: 47-56. doi: <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2010.02.010>.
- CRENCO (Comité de Regional de Recursos Naturales de la Costa A. C.). 2007. Estudio Regional Forestal-Unidad de Manejo Forestal "Costa Chica", Oaxaca. Oaxaca, Oaxaca, México.
- Erwin, E. S., G. J. Marco, and E. M. Emery. 1961. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. *J. Dairy Sci.* 44: 1768-1771. doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(61\)89956-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(61)89956-6).
- Dijkstra, J., J. Forbes, and J. France. 2005. Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism. CABI. Wallingford, U. K. ISBN: 1845931459.
- García, E. 2004. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Instituto de Geografía, UNAM. México, D. F.
- Harrigan, W. F. y M. E. McCance. 1979. Métodos de laboratorio en microbiología de alimentos y productos lácteos. Academia. León, España. ISBN: 84-7000-034-9.
- Gidlund, H., M. Hetta, S. J. Krizsan, S. Lemosquet, and P. Huhtanen. 2015. Effects of soybean meal or canola meal on milk production and methane emissions in lactating dairy cows fed grass silage-based diets. *J. Dairy Sci.* 98: 8093-8106. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9757>.
- Herrera G., R. S. 2014. Algunos aspectos que pueden influir en el rigor y veracidad del muestreo de pastos y forrajes. *Avances Invest. Agropec.* 18: 7-26.
- Hill, J., C. McSweeney, A. D. G. Wright, G. Bishop-Hurley, and K. Kalantar-zadeh. 2016. Measuring methane production from ruminants. *Trends Biotechnol.* 34: 26-35. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.10.004>.
- Hinojosa, Y. L. A., N. D. Yépez y P. M. A. Suárez. 2014. Frecuencia de corte de maralfalfa (*Pennisetum* sp.) durante la estación lluviosa, Trinidad, Bolivia. *Agroc. Amazonia* 4: 11-18.
- Hungate, R. E. 1969. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. *Methods Microbiol.* 3: 117-132. doi: [https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(08\)70503-8](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(08)70503-8).
- IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). 2013. Summary for policymakers. In: T. F. Stocker, D. Qin, G. K. Plattner, M. Tignor, S. K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex, and P. M. Midgley. (eds.). Climate change 2013: The physical science basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press. Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- Juárez-Reyes, A. S., M. A. Cerrillo-Soto, E. Gutiérrez-Ornelas, E. M. Romero-Treviño, J. Colín-Negrete y H. Bernal-Barragán. 2009. Estimación del valor nutricional de pastos tropicales a partir de análisis convencionales y de la producción de gas *in vitro*. *Téc. Pec. Méx.* 47: 55-68.
- Krabill, L. F., W. S. Alhassan, and L. D. Satter. 1969. Manipulation of the ruminal fermentation. II. Effect of sodium sulfite on bovine digestion and ruminal fermentation. *J. Dairy Sci.* 52: 1812-1816. doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(69\)86846-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(69)86846-3).
- Ley de Coss, A., E. Guerra-Medina, O. Montañez-Valdez, F. Guevara, R. Pinto y J. Reyes-Gutiérrez. 2018. Producción *in vitro* de gas metano por gramíneas forrajeras tropicales. *Rev. MVZ Córdoba* 23: 6788-6798. doi: <https://doi.org/10.21897/rmvz.1368>.
- McAllister, T. A. and C. J. Newbold. 2008. Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. *Aust. J. Exp. Agric.* 48: 7-13. doi: <https://doi.org/10.1071/EA07218>.
- Mellenberger, R. W., L. D. Satter, M. A. Millett, and A. J. Baker. 1970. An *in vitro* technique for estimating digestibility of treated and untreated wood. *J. Anim. Sci.* 30: 1005-1011. doi: <https://doi.org/10.2527/jas1970.3061005x>.
- Miron, J., D. Ben-Ghedalia, and M. Morrison. 2001. Invited review: Adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. *J. Dairy Sci.* 84: 1294-1309. doi: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)70159-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)70159-2).
- Molina-Botero, I. C., J. M. Cantet, S. Montoya, G. A. Correa-Londoño y R. Barahona-Rosales. 2013. Producción de metano *in vitro* de dos gramíneas tropicales solas y mezcladas con *Leucaena leucocephala* o *Gliricidia sepium*. *Rev. CES Med. Vet. Zootec.* 8: 15-31.
- Morgavi, D. P., E. Forano, C. Martin, and C. J. Newbold. 2010. Microbial ecosystems and methanogenesis in ruminants. *Animal* 4: 1024-1036. doi: <https://doi.org/10.1017/S1751731110000546>.

- Mould, F. L., K. E. Kliem, R. Morgan, and R. M. Mauricio. 2005. *In vitro* microbial inoculum: A review of its function and properties. *Anim. Feed Sci. Technol.* 123-124: 31-50. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.04.028>.
- Rivera, J. E., C. I. Molina, G. Donney's, G. Villegas, J. Chara y R. Barahona. 2015. Dinámica de fermentación y producción *in vitro* de metano en dietas de sistemas silvopastoriles intensivos con *L. leucocephala* y sistemas convencionales orientados a la producción de leche. *Liv. Res. Rural Develop.* 27: 1-76.
- Ruiz, P. R. 2011. Comparación de dos métodos *in vitro* para estimar la digestibilidad de pastos tropicales en rumiantes. *Revista CITECSA 2*: 13-25.
- Sánchez, J. M. I. 2007. Utilización Eficiente de las pasturas tropicales en la alimentación del ganado lechero. pp. 14-30. *In*: R. Trejos, C. Zambrano, W. García, C. Tobia, L. Mancilla, N. Valbuena y F. Ramírez (eds.). Memorias XI seminario manejo y utilización de pastos y forrajes en sistemas de producción animal. UPEL, Barquisimeto, Venezuela.
- Sánchez-Santillán, P. y M. A. Cobos-Peralta. 2016. Producción *in vitro* de ácidos grasos volátiles de bacterias celulolíticas reactivadas y bacterias ruminales totales en sustratos celulósicos. *Agrociencia* 50: 565-574.
- SAS Institute. 2003. Statistical Analysis System. SAS Release 9.1. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA.
- Steel, R. G. D. y J. H. Torrie. 1988. *Bioestadística: Principios*. McGraw Hill. México, D. F. ISBN: 968-451-495-6
- Stolaroff, J. K., D. W. Keith, and G. V. Lowry. 2008. Carbon dioxide capture from atmospheric air using sodium hydroxide spray. *Environ. Sci. Technol.* 42: 2728-2735. doi: <https://doi.org/10.1021/es702607w>.
- Van Soest, P. J. 1994. *Nutritional ecology of the ruminant*. Cornell University Press. New York, NY, USA. ISBN: 9780801427725.
- Villalobos, L. y J. Arce. 2013. Evaluación agronómica y nutricional del pasto Estrella africana (*Cynodon nlemfuensis*) en la zona de Monteverde, Puntarenas, Costa Rica. I. Disponibilidad de biomasa y fenología. *Agron. Costarricense* 37: 91-101.
- Williams, B. A. 2000. Cumulative gas-production techniques for forage evaluation. pp. 189-213. *In*: D. I. Givens, E. Owen, R. F. E. Axford, and H. M. Omed (eds.). *Forage evaluation in ruminant nutrition*. CABI Publishing Wallingford. UK. doi: <https://doi.org/10.1079/9780851993447.0000>. ISBN: 9780851993447.
- Yogianto, Y., A. Sudarman, E. Wina, and A. Jayanegara. 2014. Supplementation effects of tannin and saponin extracts to diets with different forage to concentrate ratio on *in vitro* rumen fermentation and methanogenesis. *J. Indonesian Tropic. Animal Agric.* 39: 144-151. doi: <https://doi.org/10.14710/jitaa.39.3.144-151>.
- Yokoyama, M. T y K. A. Johnson. 1988. Microbiología del rumen y el intestino. pp. 137-156. *In*: D. C. Church (ed.). *El rumiante: Fisiología digestiva y nutrición*. Acribia. Zaragoza, España. ISBN: 10: 8420007390.