

## Nivel de proteína y energía en la fermentación *in vitro* de dietas para borregos

### Level of protein and energy on the *in vitro* fermentation of diets for lambs

Asael Edem De la Rosa-Zariñana<sup>1</sup> ,  
Luis Alberto Miranda-Romero<sup>1\*</sup> ,  
Pedro Arturo Martínez-Hernández<sup>1</sup> ,  
Luis Manuel Vargas-Villamil<sup>2</sup> ,  
Amr Elmasry<sup>3</sup> 

<sup>1</sup> Posgrado en Producción Animal, Departamento de Zootecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Km. 38.5 Carretera México - Texcoco Chapingo, CP. 56230. Texcoco, Estado de México, México.

<sup>2</sup> Posgrado en Ciencias Agrícolas en el Trópico, Colegio de Posgraduados campus Tabasco. Periférico Carlos A. Molina S/N Km. 3, Ranchería Río Seco y Montaña, CP. 86500. Heroica Cárdenas, Tabasco, México.

<sup>3</sup> Botany Department, Faculty of Agriculture, Menoufia University. Shihin El-Kom 32514, Egypt.

\* Autor de correspondencia:  
microbiologia.pecuaria08@gmail.com

#### Artículo científico

Recibido: 24 de noviembre 2022

Aceptado: 01 de mayo 2023

**Como citar:** De la Rosa-Zariñana AE, Miranda-Romero LA, Martínez-Hernández PA, Vargas-Villamil LM, Elmasry A (2023) Nivel de proteína y energía en la fermentación *in vitro* de dietas para borregos. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios 10(2): e3545. DOI: 10.19136/era.a10n2.3545

**RESUMEN.** La eficiencia de utilización ruminal del alimento, entre otras razones, depende del nivel de energía y proteína contenida en el mismo. Con el objetivo de determinar el efecto del nivel de energía y proteína del alimento en la digestibilidad (DIVMS72h), el volumen (Vm), tasa (S) y fase Lag (L) de la producción de gas; las fracciones de fermentación rápida (FFR), media (FFM) y lenta (FFL); la producción de metano, el indicador del potencial de calentamiento global (IPCG) e índice de impacto ambiental (IIA), se formularon cinco dietas de acuerdo con el nivel de energía metabolizable (EM, Mcal kg<sup>-1</sup> MS) y proteína cruda (PC, %); BB; 2.6 y 13.8, MM; 2.8 y 16, AA; 3.0 y 17.2, AB; 2.8 y 14.5, BA; 2.6 y 17.2 en EM y PC. La S fue superior (p < 0.05) en las dietas AA y AB, el Vm fue menor (p < 0.05) para la dieta BA. La dieta AA tuvo las mayores (p < 0.05) FFR y FFM. Las dietas BA y BB tuvieron la mayor (p < 0.05) FFL, pero menor DIVMS72h (p < 0.05). Respecto al impacto ambiental, la dieta BB produjo la mayor proporción (p < 0.05) de CH<sub>4</sub>, IPCG e IIA. Se concluye que las dietas con mayor contenido de carbohidratos no estructurales tienen mejor cinética fermentativa y digestibilidades, también generan menores proporciones de CH<sub>4</sub>, IPCG y IIA, estos últimos pueden usarse como indicadores del impacto ambiental ya que consideran el CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub> producidos por los consorcios microbianos del rumen.

**Palabras clave:** Digestibilidad, engorda intensiva, fracciones fermentables, impacto ambiental, técnica de producción de gas.

**ABSTRACT.** The ruminal utilization efficiency of the feed, among other reasons, depends on the level of energy and protein it contains. To determine the effect of the energy and protein level of the feed on digestibility (IVMD72h), volume (Vm), rate (S) and Lag phase (L) of gas production; the fast (FFR), medium (MFF) and slow (SFF) fermentation fractions; methane production, the global warming potential indicator (GWPI) and environmental impact index (EII), five diets were formulated according to the level of metabolizable energy (ME, Mcal kg<sup>-1</sup> DM) and crude protein (PC, %); BB; 2.6 and 13.8, MM; 2.8 and 16, AA; 3.0 and 17.2, AB; 2.8 and 14.5, BA; 2.6 and 17.2 on EM and PC. The S was higher (p < 0.05) in the AA and AB diets, the Vm was lower (p < 0.05) for the BA diet. The AA diet had the highest (p < 0.05) FFR and FFM. The BA and BB diets had the highest (p < 0.05) FFL, but the lowest IVMD72h (p < 0.05). Regarding the environmental impact, the BB diet produced the highest proportion (p < 0.05) of CH<sub>4</sub>, GWPI and EII. It is concluded that diets with a higher content of non-structural carbohydrates have better fermentative kinetics and digestibilities, they also generate lower proportions of CH<sub>4</sub>, IPCG and EII, the latter can be used as indicators of environmental impact since they consider the CO<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> produced by the consortia. rumen microbials.

**Key words:** Digestibility, intensive fattening, fermentable fractions, environmental impact, and gas production technique.

## INTRODUCCIÓN

En los sistemas de producción intensiva, el uso de concentrado en las raciones para la engorda de ovinos es cada vez mayor (Arjmand *et al.* 2022, Hernández-de los Santos *et al.* 2022) y, en consecuencia, los costos de alimentación son mayores debido al alza del precio del maíz y sorgo, el cual incrementa año con año (Mestra *et al.* 2020, Velázquez-Duarte *et al.* 2022). El problema se agudiza cuando las dietas comerciales y balanceadas son utilizadas deficientemente por el rumiante (Martínez *et al.* 2007, Salinas-Chavira *et al.* 2011, Chiriguay 2023). El nivel de energía y proteína en el alimento es determinante en la respuesta productiva y la eficiencia de utilización del alimento por los rumiantes (De Azevedo *et al.* 2021, Sileshi *et al.* 2021, Kazemi-Bonchenari *et al.* 2022), relacionadas con la eficiencia en la fermentación microbiana ruminal. En este sentido, es importante evaluar el efecto del nivel de energía y proteína de dietas formuladas para la engorda intensiva de borregos en la actividad fermentativa de los consorcios microbianos del rumen. En estos sistemas el contenido de EM y PC fluctúan entre 2.4 y 2.8 Mcal kg<sup>-1</sup>, y de 14 a 16% (NRC 2007), con lo cual se espera una ganancia diaria de peso (GDP) de 250 a 300 g día<sup>-1</sup>.

Por otro lado, la técnica de producción de gas *in vitro* (TPG) es un procedimiento práctico que permite estimar indirectamente la extensión y cinética de fermentación de los alimentos (Aragadvay-Yungán *et al.* 2022). El gas derivado de la fermentación ruminal *in vitro* está relacionado principalmente, pero no exclusivamente, con el contenido de carbohidratos fermentables no estructurales (azúcares solubles y almidón) y estructurales (celulosa, hemicelulosa y pectina) del alimento (Murillo *et al.* 2012, Tirado-González *et al.* 2016, Villalba *et al.* 2021), la producción de ácidos grasos volátiles (Huertas-Molina *et al.* 2020) y, por lo tanto, con el contenido de energía del alimento y la síntesis de biomasa microbiana (Opatpatanakit *et al.* 1994, Schofield *et al.* 1994, Castillo-López y Domínguez-Ordóñez 2019, Gutiérrez-Fidencio *et al.* 2023). Al respecto, Miranda-Romero *et al.* (2020), propusieron la apli-

cación de la TPG para estimar, no solo la extensión y cinética de fermentación del alimento, sino también las fracciones de fermentación rápida, media y lenta, asociadas a carbohidratos solubles, almidón y celulosa; así como para estimar indicadores de impacto ambiental como la producción de metano, el indicador del potencial de calentamiento global (IPCG) y el índice de impacto ambiental (IIA) (Martínez-Hernández *et al.* 2019). Al respecto Cui *et al.* (2019), hallaron que el nivel de energía y proteína de la dieta tiene efecto en la composición e interacciones de la comunidad microbiana ruminal, lo cual puede tener importancia para definir estrategias en el uso óptimo de nutrientes. Por ejemplo, Zhang *et al.* (2020) discuten en su experimento que una adición adecuada de *Urtica cannabina* a *Leymus chinensis* puede mejorar el balance de energía y proteína para promover la reproducción de los microorganismos del rumen. Por ende, el objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto del nivel de energía metabolizable y proteína cruda de dietas dentro del intervalo para la engorda intensiva de ovinos, en la digestibilidad, cinética de fermentación, fracciones fermentables e indicadores de impacto ambiental *in vitro*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Lugar y tratamientos

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología Pecuaria del Departamento de Enseñanza, Investigación y Servicio en Zootecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, México. Los tratamientos consistieron en cinco dietas de acuerdo con el contenido de energía metabolizable (EM, Mcal kg<sup>-1</sup>MS) y proteína cruda (PC, %); tres balanceadas a nivel bajo (BB; 2.6 y 13.8), medio (MM; 2.8 y 16) y alto (AA; 3.0 y 17.2); y dos desbalanceadas (AB, 2.8 y 14.5; BA, 2.6 y 17.2) en EM y PC (NRC, 2007). A las dietas se les determinó el contenido de proteína cruda (PC), cenizas (Ce), extracto etéreo (EE) y materia seca (MS) (AOAC 1990); así como la fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) (Van-Soest *et al.* 1991). La composición de las dietas se presenta en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Composición de dietas para la engorda intensiva de ovinos.

Ingredientes (%)	*Dieta				
	MM	AA	AB	BA	BB
Maíz rolado	25	27	25	15	20
Sorgo	28	25	32	22.6	30.8
Rastrojo de maíz	15	13	15	27	25
Pasta de soya	11.1	15.4	7.1	13.5	7.3
Cascarilla de soya	67	2	7	7	5
Gluten de maíz	4	4	4	6	3
Melaza	5	5	5	5	5
Grasa animal	1	4.8	1	0	0
Sal mineral	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
CaCO <sub>3</sub>	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4
Sal común	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Urea	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
**Relación F:C	22:78	15:85	22:78	34:66	30:70
Nutrientes (%)					
MS	87.6	88.1	87.5	86.6	86.5
Ce	6.6	7.5	7.4	8.3	8.0
EE	3.7	7.3	3.7	2.3	2.5
FDN	24.2	20.1	24.2	31.9	29.1
FDA	13.7	10.8	13.6	18.8	16.7
PC	16	17.2	14.5	17.2	13.8
EM, (Mcal kg <sup>-1</sup> MS) <sup>1</sup>	2.8	3	2.8	2.6	2.6

PC, proteína cruda; EM, energía metabolizable; MS, materia seca; Ce; cenizas; EE, extracto etéreo; FDN, fibra detergente neutro; FDA, fibra detergente ácido. <sup>1</sup> valor estimado. \* Tratamientos con diferente contenido de energía metabolizable (EM, Mcal kg<sup>-1</sup> MS) y proteína cruda (PC, %); MM (2.8:16), AA (3.0:17.2), AB (2.8:14.5), BA (2.6:17.2) y BB (2.6:13.8). \*\* F:C, Proporción forraje:concentrado en las dietas.

### Cinética de la producción de gas de fermentación, degradación de la materia seca y fracciones fermentables *in vitro*

La fermentación de las dietas se midió indirectamente por TPG (Menke y Steingass 1988, Theodorou *et al.* 1994), para lo cual en frascos de vidrio color ámbar de 125 mL de capacidad, se colocaron 500 mg de MS de cada dieta, 90 mL de inóculo ruminal y, simultáneamente, un flujo continuo de CO<sub>2</sub>. Los frascos fueron tapados herméticamente con un tapón de goma y aro de aluminio, e incubados en baño María a 39 °C.

Posteriormente, se midió la presión generada por el gas de fermentación, con manómetro de 0.0 a 1.0 kg cm<sup>-2</sup> de capacidad (METRON®, 51100) a las 0, 2, 4, 6, 8, 10, 14, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 60 y 72 h de incubación. Los valores de presión se transformaron a volumen de gas (V; mL g<sup>-1</sup> MS) de acuerdo con el modelo de regresión lineal  $V(mL) = \frac{P(kg\ cm^{-2}) + 0.0495}{0.0185}$ , el cual se obtuvo relacionando la presión (P) generada por volúmenes conocidos de aire inyectado a los frascos mantenidos en las mis-

mas condiciones de manejo. Al final del periodo de incubación, el contenido residual de los frascos se filtró a través de papel filtro previamente pesado, se secó a 65 °C por 48 h en estufa de aire forzado y se pesó para obtener la materia seca residual del alimento por diferencia de peso. La metodología para la determinación de la producción de gas de fermentación se repitió dos veces en el tiempo.

El inóculo ruminal se obtuvo de novillos en ayuno por 12 h canulados en rumen y adaptados a una dieta de mantenimiento (70:30% de F:C), bajo la norma de cuidado animal NOM-062-ZOO (SAGARPA 2001). La muestra de contenido ruminal fue transportada inmediatamente en un termo al laboratorio y se filtró a través de cuatro capas de tela de gasa y se mezcló con una solución mineral reducida en una proporción 1:9 (v/v). Cada litro de solución mineral contenía K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0.45 g), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.45 g), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.45 g), NaCl (0.90 g), MgSO<sub>4</sub> (0.18 g), CaCl<sub>2</sub> (0.12 g), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4 g), la cual fue reducida con 20 mL L<sup>-1</sup> de una solución compuesta de Na<sub>2</sub>S (0.2 g) y L-cisteína (0.2 g) disueltas en solución de NaOH (0.8 mL L<sup>-1</sup>). Como indicador de la reducción, se adicionaron dos gotas de rezarzurina al 0.1% p/v (Miranda-Romero *et al.* 2020).

El volumen de gas acumulado en función del tiempo de incubación se usó para estimar los parámetros de la cinética de producción de gas: volumen máximo (Vm; mL g<sup>-1</sup> MS), tasa (S; mL h<sup>-1</sup>) y fase lag (L; h), del modelo logístico  $V_0 = Vm / (1 + e^{(2-4k(t-L))})$  (Schofield *et al.* 1994) y el procedimiento NLIN (SAS 2015).

La digestibilidad *in vitro* de la MS a 72 h (DIVMS<sub>72h</sub>) se calculó con la MS inicial adicionada a cada frasco y la MS residual obtenida por filtración, usando la siguiente fórmula:

$$DIVMS_{72h} = \frac{MS_{inicial} - MS_{residual}}{MS_{inicial}} * 100$$

El volumen acumulado de gas se utilizó también para calcular las fracciones fermentables de acuerdo con el siguiente procedimiento: se obtuvieron los volúmenes fraccionales (Vf) de gas acumulado para los intervalos de 0 a 8 (V<sub>f0-8h</sub>), 8 a 24 (V<sub>f8-24h</sub>) y de 24 a 72 (V<sub>f24-72h</sub>) horas de incubación

(Miranda-Romero *et al.* 2020). Con estos volúmenes fraccionales de gas se obtuvo el porcentaje de la fracción de fermentación rápida (% FFR), media (% FFM) y lenta (% FFL) en relación con el volumen total de gas a 72 h de incubación.

### Indicadores de impacto ambiental

Otra muestra de MS de cada dieta se fermentó *in vitro*, siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente, con las siguientes modificaciones: la incubación se llevó a 39 °C por 24 horas en baño María, la medición del volumen de gas (V) se realizó a 0, 6, 12, 18 y 24 h de incubación con una jeringa de vidrio de 50 mL de capacidad. En cada medición, el gas atrapado en la jeringa se transfirió cuidadosamente a otro frasco de 60 mL de capacidad cerrado herméticamente con tapón de goma y aro de aluminio, que contenía 45 mL de una solución de KOH (1 M) para capturar el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) de la mezcla de gases, para después medir el volumen de gas que retornó a la jeringa, el cual correspondió a la cantidad de metano más gases menores (V<sub>CH<sub>4</sub>+GM</sub>). Los valores de V<sub>CH<sub>4</sub>+GM</sub> se ajustaron a metano teórico (V<sub>CH<sub>4</sub></sub>) con el factor de 0.77, de acuerdo con la proporción de metano determinada en la muestra de gas generado en el rumen (Zhong *et al.* 2016). La diferencia del V menos el V<sub>CH<sub>4</sub>+GM</sub> correspondió al volumen de CO<sub>2</sub> (V<sub>CO<sub>2</sub></sub>). Este procedimiento se repitió dos veces en el tiempo y los valores de V, V<sub>CH<sub>4</sub>+GM</sub>, V<sub>CO<sub>2</sub></sub> y V<sub>CH<sub>4</sub></sub> se expresaron en % y mL g<sup>-1</sup> MS en 24 horas de incubación.

Los valores de V<sub>CO<sub>2</sub></sub> y V<sub>CH<sub>4</sub></sub> se utilizaron para calcular el IPCG (mL CO<sub>2</sub> eq g<sup>-1</sup> MS) de acuerdo con la siguiente ecuación: IPCG = [CO<sub>2</sub> (mL g<sup>-1</sup>MS) + CH<sub>4</sub> (mL g<sup>-1</sup>MS) \* 23]; dónde la constante 23 corresponde a los equivalentes de CO<sub>2</sub> para el CH<sub>4</sub> (Berra *et al.* 2009, Paredes 2022). Mientras que los valores del IPCG y V se utilizaron para calcular el IIA (CO<sub>2</sub> eq) de acuerdo con la siguiente relación: 
$$IIA = \frac{IPCG}{VT}$$

### Análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental de bloques generalizados con cinco tratamientos y seis repeticiones de tratamiento en cada bloque. El bloque

correspondió a la repetición en el tiempo y los tratamientos (MM, AA, AB, BA y BB) a las dietas usadas para fermentación. Se usó el procedimiento GLM y la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey (SAS 2015).

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

Donde: Y<sub>ijk</sub> = variable respuesta correspondiente al tratamiento i, bloque j y observación k, μ = media general τ<sub>i</sub> = efecto fijo del i-ésimo tratamiento, i = 1, 2, ... 5, β<sub>j</sub> = efecto del j-ésimo bloque, j = 1 y 2, (τβ)<sub>ij</sub> = efecto de la interacción del bloque por tratamiento, ε<sub>ijk</sub> = error aleatorio asociado con la k-ésima observación de la variable de respuesta en el tratamiento i y bloque j. Se asume ε<sub>ijk</sub> ~ NIID (0, σ<sup>2</sup>ε).

## RESULTADOS

En la Tabla 1 se presenta la composición de ingredientes alimenticios y nutrientes de las dietas usadas en la investigación. Las dietas MM y AB tuvieron la misma proporción F:C debido a que contuvieron el mismo nivel de energía (2.8 Mcal kg<sup>-1</sup> MS).

Los parámetros de la cinética de producción de gas: V<sub>m</sub>, S y L se presentan en la Tabla 2. La fase L fue la misma (p > 0.05) para las dietas balanceadas (AA, MM y BB) y las desbalanceadas (AB, BA) y tuvo un valor de 4.24 h. La S de producción de gas fue mayor (p < 0.05) en las dietas balanceadas con niveles de EM y PC medios o altos (MM, AA), en comparación con las dietas bajas en energía (BA, BB). El V<sub>m</sub> de gas, el cual indica la extensión de la fermentación, fue menor (p < 0.05) en la dieta desbalanceada con exceso de proteína y deficiencia de energía (BA), con respecto a las otras dietas (Tabla 2). El V<sub>m</sub> y L fue igual (p > 0.05) para las tres dietas balanceadas BB, MM y AA.

En la Tabla 3 se muestran los valores de las fracciones fermentables. La FFR y la FFM en la dieta balanceada a nivel alto de EM y PC (AA), fueron mayores (p < 0.05) en comparación a la dieta balanceada a niveles bajos de EM y PC (BB) y a las dietas desbalanceadas (AB y BA).

**Tabla 2.** Parámetros de la cinética de producción de gas *in vitro* de las dietas para ovinos en engorda.

	Dieta		Parámetros		
	EM Mcal kg <sup>-1</sup> MS	PC %	L h	S mL h <sup>-1</sup>	Vm mL g <sup>-1</sup>
MM	2.8	16.0	4.24 <sup>a</sup>	0.038 <sup>a</sup>	488.7 <sup>a</sup>
AA	3.0	17.2	4.24 <sup>a</sup>	0.038 <sup>a</sup>	477.5 <sup>ab</sup>
AB	2.8	14.5	4.24 <sup>a</sup>	0.036 <sup>ab</sup>	491.8 <sup>a</sup>
BA	2.6	17.2	4.24 <sup>a</sup>	0.034 <sup>b</sup>	462.1 <sup>b</sup>
BB	2.6	13.8	4.24 <sup>a</sup>	0.035 <sup>b</sup>	493.2 <sup>a</sup>

<sup>abc</sup>medias con literal distinta en la misma columna son diferentes ( $p < 0.05$ ). L, fase lag; S, tasa de fermentación; Vm, volumen máximo de gas; PC, proteína cruda, EM, energía metabolizable. MM, AA, AB, BA, BB; dietas con niveles altos o bajos de EM o PC.

La FFR es igual ( $p > 0.05$ ) para ambas dietas desbalanceadas (AB y BA), mientras que la FFM fue mayor ( $p < 0.05$ ) para la dieta AB respecto a BA. Por otro lado, al comparar las dietas altas en energía (AB y AA), se observó que las FFR y FFM son menores para la dieta desbalanceada AB. La FFL fue mayor ( $p < 0.05$ ) en las dietas bajas en energía BA y BB en comparación con las dietas MM y AA. La dieta desbalanceada con un exceso de EM y escasa cantidad de PC (AB) tuvo mayor FFL. La DIVMS72h, fue mayor ( $p < 0.05$ ) para la dieta balanceada a nivel medio MM con respecto a las dietas bajas en EM (BA y BB) o con las dietas altas en energía (AA y AB).

Los indicadores de impacto ambiental se muestran en la Tabla 4. La suma de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> fue en promedio de 96%. La proporción de CH<sub>4</sub> varió ( $p < 0.05$ ) entre tratamientos de 10.5 a 13.5%. Las dietas bajas en EM (BB y BA) produjeron el mayor porcentaje de CH<sub>4</sub> ( $p < 0.05$ ) en comparación con las dietas con nivel medio o alto de EM (MM, AA y AB; Tabla 4). Por otro lado, la dieta AA produjo mayor V<sub>24h</sub> ( $p < 0.05$ ) en comparación con las dietas BA y BB. La dieta baja en EM y alta el PC (BA) tuvo el menor V<sub>24h</sub> ( $p < 0.05$ ), inclusive que la dieta balanceada a bajo nivel (BB) y la desbalanceada (AB).

Con relación al IPCG (Tabla 4), la dieta BB causó mayor ( $p < 0.05$ ) IPCG que la dieta balanceada a nivel medio (MM) y la desbalanceada deficiente en proteína (AB). Por otra parte, el IIA es un valor de comparación para estimar que tanto más un alimento impacta al ambiente con respecto a otro, y este valor está en función de la cantidad de CH<sub>4</sub> producida. Para esto se asumió que el volumen (V<sub>24h</sub>) equivale

en su totalidad a CO<sub>2</sub> eq. El IIA para las dietas varió entre 3.3 y 3.9 (Tabla 4). Las dietas bajas en energía (BB y BA) tienen mayor IIA ( $p < 0.05$ ) en comparación con las dietas con un contenido medio y alto en EM (MM y AB).

## DISCUSIÓN

La extensión de la fermentación (Vm) y la fase Lag (L) no fueron afectadas por el nivel de EM y PC en la dieta dentro de intervalo investigado, siempre y cuando se encuentren balanceadas. El desbalance de EM y PC disminuyó la tasa (S) y el Vm de la producción de gas; en particular con la dieta BA (Tabla 2). Lo anterior se atribuyó, por un lado, al exceso de PC ya que por ser deficiente en EM la microbiota fermenta más activamente la proteína con el fin de generar suficiente ATP para sus funciones, sin embargo, este proceso produce escasa cantidad de gas (Makkar 2004) y, por otra parte, debido a que la energía es más determinante que la proteína en la fermentación ruminal, tal como se demostró *in vivo* para variables productivas (Cui *et al.* 2019) y en estudios *in situ* para la proporción de ácidos grasos volátiles (Beckett *et al.* 2021) y, por consiguiente, en la producción de gas (Karabulut *et al.* 2007). El Vm obtenido varió de 462 a 493 mL g<sup>-1</sup> MS, similar a otras investigaciones en las que se fermentaron granos o dietas altas en concentrado (Bueno *et al.* 2005, Sánchez *et al.* 2019), el cual es mayor al producido por forrajes verdes y rastrojos (127 y 238 mL g<sup>-1</sup> MO; Calabro *et al.* 2005). Esto es debido a que los granos y las dietas altas en concentrados contienen mayor cantidad de carbohidratos no estructurales (azúcares solubles y almidón) en contraste a los forrajes (Bernal-Barragan *et al.* 2022).

En esta investigación, las diferencias en las fracciones de fermentación FFR y FFM entre los tratamientos, se asocian básicamente al contenido de concentrado (carbohidratos solubles y polisacáridos de reserva, no estructurales) como se aprecia en la Tabla 1 (Ruiz *et al.* 2018, Ramírez-Díaz *et al.* 2020). El incremento de concentrado en una dieta induce mayor producción de gas (Miranda-Romero *et al.* 2020). De igual forma, estos autores señalan que

**Tabla 3.** Fracciones fermentables y digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS<sub>72h</sub>) de las dietas para ovinos de engorda a 72 h.

	Tratamiento		Fracciones fermentables			DIVMS <sub>72h</sub> %
	EM	PC	FFR	FFM	FFL	
	Mcal kg <sup>-1</sup> MS	%	%			
MM	2.8	16.0	20.8 <sup>b</sup>	51.8 <sup>a</sup>	27.4 <sup>b</sup>	77.4 <sup>a</sup>
AA	3.0	17.2	21.9 <sup>a</sup>	52.3 <sup>a</sup>	25.8 <sup>c</sup>	75.3 <sup>b</sup>
AB	2.8	14.5	20.4 <sup>b</sup>	50.4 <sup>b</sup>	29.2 <sup>a</sup>	74.5 <sup>b</sup>
BA	2.6	17.2	20.6 <sup>b</sup>	49.0 <sup>c</sup>	30.3 <sup>a</sup>	69.4 <sup>c</sup>
BB	2.6	13.8	19.9 <sup>b</sup>	49.8 <sup>bc</sup>	30.3 <sup>a</sup>	70.9 <sup>c</sup>

<sup>abc</sup>Medias con literales distintas en la misma columna son diferentes (p < 0.05).  
FFR, FFM, FFL, fracciones de fermentación rápida, media y lenta.

**Tabla 4.** Indicadores de impacto ambiental y producción de gas *in vitro* a 24 h de incubación a 39 °C de dietas para ovinos de engorda.

Tratamiento	Indicadores de impacto ambiental		Indicadores de impacto ambiental				
	EM	PC	*V <sub>24h</sub>	CO <sub>2</sub>	CH <sub>4</sub>	IPCG	IIA
	Mcal kg <sup>-1</sup> MS	%	mL g <sup>-1</sup> MS	%	%	mL CO <sub>2</sub> eq g <sup>-1</sup> MS	CO <sub>2</sub> eq
MM	2.8	16.0	211.8 <sup>ab</sup>	86.4 <sup>a</sup>	10.5 <sup>c</sup>	692.0 <sup>b</sup>	3.3 <sup>c</sup>
AA	3.0	17.2	218.2 <sup>a</sup>	85.3 <sup>ab</sup>	11.4 <sup>bc</sup>	754.9 <sup>ab</sup>	3.5 <sup>bc</sup>
AB	2.8	14.5	215.2 <sup>a</sup>	85.8 <sup>a</sup>	10.9 <sup>c</sup>	722.2 <sup>b</sup>	3.4 <sup>c</sup>
BA	2.6	17.2	198.1 <sup>c</sup>	83.1 <sup>bc</sup>	13.0 <sup>ab</sup>	757.3 <sup>ab</sup>	3.8 <sup>ab</sup>
BB	2.6	13.8	207.0 <sup>b</sup>	82.5 <sup>c</sup>	13.5 <sup>a</sup>	809.8 <sup>a</sup>	3.9 <sup>a</sup>

V<sub>24h</sub>, volumen de gas a 24 h; IPCG, indicador del potencial de calentamiento global; IIA, índice de impacto ambiental. abcMedias con literales distintas en la misma columna son diferentes (p < 0.05)

la FFL se relaciona con carbohidratos estructurales como la celulosa, lo cual se puede observar en dietas con alta proporción de forraje. No obstante, un desbalance con menor cantidad de PC puede ocasionar una fermentación tardía de los carbohidratos no estructurales, en virtud de que causa baja biomasa microbiana.

La cantidad de forraje incluido en las dietas fue determinante en la digestibilidad, la dieta MM con menor proporción de forraje tuvo mayor digestibilidad en comparación con las dietas con altas cantidades de fibra (BA y BB), lo que concuerda con lo observado por Gurrola *et al.* (2014). Sin embargo, la inclusión de un alto contenido de grasa para elevar el valor de energía y EE puede disminuir la digestibilidad (Harahap *et al.* 2022), aun cuando el alimento contenga alta cantidad de concentrado o carbohidratos no estructurales. De igual forma, un desbalance en el nivel de PC puede ocasionar baja digestibilidad de la dieta (Bastida-García *et al.* 2011). Lo anterior demuestra que la adición de grasa y/o el desbalance de EM y PC, como se observó para las dietas AA y AB en el experimento, pueden ocasionar que un alimento muestre alta digestibilidad,

pero menor fermentabilidad, o viceversa. Inclusive si la dieta contiene ingredientes con compuestos secundarios antinutricionales (Jiménez-Santiago *et al.* 2019).

Por otro lado, el incremento de la cantidad de CH<sub>4</sub> tuvo una concomitante disminución de la proporción de CO<sub>2</sub>, observado también por Culma *et al.* (2017). Los valores de CH<sub>4</sub> hallados en este experimento son similares a los reportados para dietas altas en granos (Martínez-Hernández *et al.* 2019). La mayor cantidad de CH<sub>4</sub> en las dietas con elevadas cantidades de forraje (BA y BB) se atribuye a que tales dietas fomentan la actividad y crecimiento de las bacterias fibrolíticas del rumen, las cuales son las principales productoras de H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>, moléculas precursoras para la síntesis de CH<sub>4</sub> (Vélez-Terranova *et al.* 2014). No obstante, una deficiencia en EM y un exceso de PC puede ocasionar un mal uso ruminal del alimento en las primeras 24 h de incubación, debido a que los microorganismos deben fermentar la proteína para fines energéticos y, por consiguiente, la producción de gas es menor (Rodríguez *et al.* 2007, Phesatcha *et al.* 2022).

Con respecto al IPCG, puede ser un valor

más acorde al impacto ambiental relacionado al calentamiento global, que la sola medición de CH<sub>4</sub>, ya que para el cálculo del IPCG se consideraron la producción de los dos gases de efecto invernadero mayormente producidos en el rumen (CO<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub>) y su equivalencia calorífica (Sandoval-Pelcastre *et al.* 2020). El valor de CH<sub>4</sub> estimado por otras metodologías, es útil para comparar el efecto de un tratamiento, pero no el impacto ambiental. El valor de metano es más bajo que el IPCG, y éste último es mayor cuanto más alto sea la producción de metano. El IPCG es un indicador del potencial de calentamiento causado por la fermentación ruminal de un gramo de MS en 24 h de incubación. Por otro lado, no hay referencias del IPCG en la literatura científica para compararlos con los encontrados en esta investigación; sin embargo, el IPCC (2006) ha calculado un indicador conocido como factor de emisión (FE) el cual se calcula con base en la energía bruta y el porcentaje de esta energía en la alimentación convertida en metano (Y<sub>m</sub>). El FE es mayor en animales que consumen dietas bajas en energía y altas en fibra, en contraste con aquellas altas en energía y bajas en fibra, las cuales reducen el factor de emisión (Lombardi *et al.* 2021), efecto que se corrobora mediante el IPCG medido en este experimento con las dietas BA, BB, MM y AA. El IPCG tiene la ventaja de poderse medir para cada tipo y manejo de alimento mediante la técnica de producción de gas, mientras que el FE es un valor fijo que estima de forma general el impacto en el calentamiento global.

El otro indicador propuesto en esta investigación es el IIA, como era de esperar este índice se

relaciona fuertemente con la producción de metano y con el contenido de forraje y FDN del alimento. Por ejemplo, las dietas BA y BB tuvieron valores de IIA mayores que las dietas MM y AB. En general, el IIA encontrados en esta investigación, son propios de dietas altas en concentrado y EM, y se espera que cuando se usan forrajes o dietas altas en forraje su valor es sustancialmente mayor.

## CONCLUSIONES

Independiente del nivel de energía metabolizable y de proteína cruda en dietas para la engorda intensiva de ovinos, es fundamental que se encuentren balanceados con el fin de eficientizar la fermentación y digestión ruminal *in vitro*, y reducir el impacto ambiental relacionado al calentamiento global. El desbalance de estos nutrientes, en particular con exceso de proteína, ocasiona mayor valor de indicadores de impacto ambiental (IPCG, IIA, %CH<sub>4</sub>), menores fracciones fermentables (FFR, FFM), DIVMS y menor extensión de la fermentación (V<sub>m</sub>) del alimento.

## AGRADECIMIENTOS

El primer autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca asignada para sus estudios de posgrado, así como al Programa de Doctorado en Ciencias en Innovación Ganadera de la Universidad Autónoma Chapingo.

## LITERATURA CITADA

- AOAC (1990) Official Methods of Analysis. 15th Edition. Association of Official Agricultural Chemists. Washington DC, USA. 2000p.
- Aragadvay-Yungán R, Rodríguez MB, Basantes-Basantes E, Cando AC (2022) Valor nutricional, producción de gas *in vitro* y degradación ruminal *in situ* de ensilaje de maíz enriquecido con *Saccharomyces cerevisiae*. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú 33: e20890-e20890. DOI: 10.15381/rivep.v33i1.20890.
- Arjmand M, Kiani A, Azizi A, Fadayifar A, Azarfar A, Ponnampalam EN (2022) Effects of dietary concentrate level and feeding length on nutrient digestibility, rumen hydrolytic enzymes activity, intermediary metabolites, and feeding behavior in growing fat-tailed lambs: Iranian feedlot system. Small Ruminant Research 217:

106832. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2022.106832.

- Bastida-García J, González-Ronquillo M, Dominguez-Vara I, Romero-Bernal J, Castelan-Ortega O (2011) Effect of field pea (*Pisum sativum* L.) level on intake, digestion, ruminal fermentation and *in vitro* gas production in sheep fed maintenance diets. *Animal Science Journal* 82: 654-662.
- Beckett L, Gleason CB, Bedford A, Liebe D, Yohe TT, Hall MB, White RR (2021) Rumen volatile fatty acid molar proportions, rumen epithelial gene expression, and blood metabolite concentration responses to ruminally degradable starch and fiber supplies. *Journal of Dairy Science* 104: 8857-8869.
- Bernal-Barragán H, Perrusquía-Tejeida VM, Vásquez-Aguilar NC, González-Rodríguez H (2022) Determinación de la producción de gas *in vitro*, contenido de nutrientes y energía metabolizable de forrajes y suplementos para ovinos y caprinos. *Ciencia UANL* 115: 40-47.
- Berra G, Finster L, Valtorta SE (2009) Una técnica sencilla para la medición de emisiones de metano entérico en vaca. *Revista FAVE-Ciencias Veterinarias* 8: 49-56.
- Bueno IC, Cabral FSL, Gobbo SP, Louvandini H, Vitti DM, Abdalla AL (2005) Influence of inoculum source in a gas production method. *Animal Feed Science and Technology* 123: 95-105.
- Calabro S, López S, Piccolo V, Dijkstra J, Dhanoa MS, France J (2005) Comparative analysis of gas production profiles obtained with buffalo and sheep ruminal fluid as the source of inoculum. *Animal Feed Science and Technology* 123: 51-65.
- Castillo-López E, Domínguez-Ordóñez MG (2019) Factores que afectan la composición microbiana ruminal y métodos para determinar el rendimiento de la proteína microbiana. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 10: 120-148.
- Chiriguay BWG (2023) Modelo matemático de optimización alimenticia para la eficiencia productiva del ganado vacuno en el Ecuador. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar* 7: 9162-9177.
- Cui K, Qi M, Wang S, Diao Q, Zhang N (2019) Dietary energy and protein levels influenced the growth performance, ruminal morphology and fermentation and microbial diversity of lambs. *Scientific Reports* 9: 16612. DOI: 10.1038/s41598-019-53279-y.
- Culma NYM, de Jesús RG, Suárez NEA, Herrera FV (2017) Alternativas nutricionales para disminuir emisiones de gas metano por bovinos y su efecto en el calentamiento global. *Ciencias Agropecuarias* 3: 8-17.
- De Azevedo EB, Savian JV, do Amaral GA, de David DB, Gere JI, Kohmann MM, de Faccio CPC (2021) Feed intake, methane yield, and efficiency of utilization of energy and nitrogen by sheep fed tropical grasses. *Tropical Animal Health and Production* 53(5): 452. DOI: 10.1007/s11250-021-02928-4.
- Gurrola AG, Hernández MP, Duran RR, Ramírez JCR, Gurrola JAG, Mormita MG, García LS (2014) Efecto de la inclusión del fruto de *Guazuma ulmifolia* como sustituto de maíz en la dieta sobre el comportamiento productivo y rendimiento en canal de ovinos Pelibuey. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 17: 215-222.
- Gutiérrez-Fidencio M, Crosby-Galván MM, Ramírez-Bribiesca JE, Sánchez-Villarreal A, Hernández-Rodríguez M, López-Rosas I, Ramírez-Mella M (2023) Efecto del rizoma de *Zingiber officinale* sobre la fermentación ruminal y producción de metano *in vitro*. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 10(1): e3570. DOI: 10.19136/era.a10n1.3570.
- Harahap RP, Suharti S, Ridla M, Laconi EB, Nahrowi N, Irawan A, Jayanegara A (2022) Meta-analysis of dietary chitosan effects on performance, nutrient utilization, and product characteristics of ruminants. *Animal Science Journal* 93(1): e13676. DOI: 10.1111/asj.13676.

- Hernández-de los Santos AD, Duran-Zamora EM, Luna-Palomera C, López-Durán S, Vázquez-Martínez IM, Muñoz-Osorio GA, Chay-Canul AJ (2022) Crecimiento post-destete y rentabilidad de corderos Pelibuey suplementados con tres diferentes concentrados comerciales en Tabasco, México. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 9(2): e3148. DOI: 10.19136/era.a9n2.3148.
- Huertas-Molina OF, Londoño-Vásquez D, Olivera-Angel M (2020) Hiperconetemia: bioquímica de la producción de ácidos grasos volátiles y su metabolismo hepático, *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica* 23(1): e1304. DOI: 10.31910/rudca.v23.n1.2020.1304.
- IPCC (2006) Guidelines for national greenhouse gas inventories. Agriculture, forestry and other land use. Intergovernmental Panel on Climate Change. 87p. <https://www.ipcc-nggip.iges.or.jp/public/2006gl/spanish/vol4.html>. Fecha de consulta: 31 de julio de 2022.
- Jiménez-Santiago A, Jiménez-Ferrer G, Alayón-Gamboa A, Pérez-Luna EDJ, Piñeiro-Vázquez AT, Albores-Moreno S, 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: 298-314.
- Karabulut A, Canbolat O, Kalkan H, Gurbuzol F, Sucu E, Filya I (2007) Comparison of *in vitro* gas production, metabolizable energy, organic matter digestibility and microbial protein production of some legume hays. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 20: 517-522.
- Kazemi-Bonchenari M, Khanaki H, Jafari A, Eghbali M, Poorhamdollah M, Ghaffari MH (2022) Milk feeding level and starter protein content: Effects on growth performance, blood metabolites, and urinary purine derivatives of Holstein dairy calves. *Journal of Dairy Science* 105: 1115-1130.
- Lombardi B, Alvarado PI, Ricci P, Guzmán SA, Gonda HL, Juliarena MP (2021) Methane and nitrous oxide emissions from dung patches deposited by grazing cattle supplemented with maize grain. *Animal Feed Science and Technology* 279: e115029. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2021.115029.
- Mestra LI, Santana M O, Mejía L., Ortiz CR, Paternina SE (2020) Caracterización de sistemas de alimentación de ovinos en el departamento de Córdoba, Colombia. *Archivos de zootecnia* 69: 432-443.
- Makkar HP (2004) Recent advances in the *in vitro* gas method for evaluation of nutritional quality of feed resources. *Assessing quality and safety of animal feeds* 160: 55-88.
- Martínez GDM, Pérez FXP, Mella MR, Delgadillo MAM, Rangel HL, Barcena GRB (2007) Evaluación de alimentos integrales para el engorde intensivo de ovinos. *Revista Científica* 17: 72-82.
- 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: 285-289.
- Menke KE, Steingass H (1988) Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development* 27: 7-55.
- Miranda-Romero LA, Tirado-González DN, Tirado-Estrada G, Améndola-Massiotti R, Sandoval-González L, Ramírez-Valverde R, Salem AZ (2020) Quantifying non-fibrous carbohydrates, acid detergent fiber and cellulose of forage through an *in vitro* gas production technique. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 100: 3099-3110.
- Murillo M, Herrera E, Carrete FO, Ruiz O, Serrato JS (2012) Chemical composition, *in vitro* gas production, ruminal fermentation and degradation patterns of diets by grazing steers in native range of North Mexico. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 25: 1395-1403.

- NRC (2007) Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids, 1st Edition. National Research Council. National Academy Press, Washington, DC, USA. 352p.
- Opatpatanakit Y, Kellaway RC, Lean IJ, Annison G, Kirby A (1994) Microbial fermentation of cereal grains *in vitro*. *Journal of Agricultural Research* 45: 1247-1263.
- Paredes KPT (2022) Contribución de las emisiones de gas metano producidas por el ganado bovino al cambio climático. *Revista Iberoamericana Ambiente & Sustentabilidad*. 5: 215. DOI: 10.46380/rias.v5.e215.
- Phesatcha B, Phesatcha K, Viennaxay B, Matra M, Totakul P, Wanapat M (2022) Cricket Meal (*Gryllus bimaculatus*) as a Protein Supplement on *In Vitro* Fermentation Characteristics and Methane Mitigation. *Insects* 13: 129. DOI: 10.3390/insects13020129.
- Ramírez-Díaz R, Pinto-Ruiz R, Medina-Jonapá F, Guevara-Hernández F (2020) Effect of inoculants and additives on fractions of ruminal fermentation and *in vitro* degradation in sorghum silage (*Sorghum* sp). *CienciaUAT* 15: 172-179.
- Rodríguez R, Sosa A, Rodríguez Y (2007) La síntesis de proteína microbiana en el rumen y su importancia para los rumiantes. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 41: 303-311.
- Ruiz RP, Díaz AAP, de Coss AL, Díaz RR, Paniagua LFM, Hernández FG, Vengas JAV (2018) Estimación de la producción de metano (CH<sub>4</sub>) y dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) de la cerdaza. *Avances en Investigación Agropecuaria* 22: 35-46.
- SAGARPA (2001) Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Diario Oficial de la Federación, México. 22 de agosto de 2001.
- Salinas-Chavira J, Gutiérrez-González JC, García-Castillo R, López-Trujillo R, Duarte-Ortuño A (2011) Digestibilidad *in situ* de la materia seca de tres dietas para ovinos de engorda. *Agronomía Mesoamericana* 22: 379-385.
- Sánchez N, Mendoza G, Martínez J, Hernández P, Miranda L, Villarreal EBO (2019) Efecto de bloques con propionato de calcio sobre respuestas productivas en corderos y GEI *in vitro*. *Revista MVZ Córdoba* 24: 7188-7192.
- Sandoval-Pelcastre AA, Ramírez-Mella M, Rodríguez-Ávila NL, Candelaria-Martínez B (2020) Trees and shrubs with potential to reduce the production of methane in ruminants. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 23: 1-16.
- SAS (2015) Base SAS 9.4 procedures guide. SAS Institute. [https://go.documentation.sas.com/doc/en/pgmsascdc/9.4\\_3.5/procstat/titlepage.htm](https://go.documentation.sas.com/doc/en/pgmsascdc/9.4_3.5/procstat/titlepage.htm). Fecha consultada: 18 marzo de 2022.
- Schofield P, Pitt RE, Pell AN (1994) Kinetics of fiber digestion from *in vitro* gas production. *Journal of Animal Science* 72: 2980-2991.
- Sileshi G, Mitiku E, Mengistu U, Adugna T, Fekede F (2021) Effects of dietary energy and protein levels on nutrient intake, digestibility, and body weight change in Hararghe highland and Afar sheep breeds of Ethiopia. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research* 8: 185-194.
- Theodorou MK, Williams BA, Dhanoa MS, McAllan AB, France J (1994) A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology* 48: 185-197.

- Tirado-González DN, Jáuregui-Rincón J, Tirado-Estrada GG, Martínez-Hernández PA, Guevara-Lara F, Miranda-Romero LA (2016) Production of cellulases and xylanases by white-rot fungi cultured in corn stover media for ruminant feed applications. *Animal Feed Science and Technology* 221: 147-156.
- Van-Soest PJB, Robertson JA, Lewis B (1991) Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science* 74: 3583-3597.
- Velázquez-Duarte JA, Vega-Britez GD, Lesmo-Duarte ND, Ferreira-Agüero AMA, Giménez MA, Barreto-Pérez WS, Acosta-Resquin MF (2022) Uso de glicerina bruta en la reducción de pérdidas fermentativas de ensilaje de *Pennisetum purpureum*. *Temas Agrarios* 27: 378-384.
- Vélez-Terranova M, Gaona RC, Sánchez-Guerrero H (2014) Uso de metabolitos secundarios de las plantas para reducir la metanogénesis ruminal. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 17: 489-499.
- Villalba JJ, Ates S, MacAdam JW (2021) Non-fiber Carbohydrates in Forages and Their Influence on Beef Production Systems. *Frontiers in Sustainable Food Systems* 5: e566338. DOI: 10.3389/fsufs.2021.566338.
- Zhang Z, Wang S, Wang M, Shahzad K, Zhang X, Qi R, Shi L (2020) Effects of *Urtica cannabina* to *Leymus chinensis* ratios on ruminal microorganisms and fiber degradation *in vitro*. *Animals* 10: 335. DOI: 10.3390/ani10020335.
- Zhong RZ, Fang Y, Sun HX, Wang M, ZhouDW (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: 414-42.