

# Características químicas y fermentativas *in vitro* de *Cynodon nlemfuensis* Vanderyst y *Guazuma ulmifolia* Lam

## *In vitro* Chemical and Fermentative Characteristics of *Cynodon nlemfuensis* Vanderyst and *Guazuma ulmifolia* Lam

Alejandro Ley-de-Coss<sup>1,4</sup> , Reynerio Adrián Alonso Bran<sup>1</sup> , Jonathan Morales-Aguilar<sup>2</sup> ,  
Cándido Enrique Guerra-Medina<sup>3,4</sup> , Miguel Chávez-Espinoza<sup>4</sup> , Oziel Dante Montañez-Valdez<sup>4\*</sup> 

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Chiapas, Facultad de Ciencias Agronómicas Campus V, UNACH. CP. 30470. Villaflores, Chiapas, México.

<sup>2</sup>Estudiante de Licenciatura en Ingeniero Agrónomo, Facultad de Ciencias Agronómicas. Campus V, UNACH. CP. 30470. Villaflores, Chiapas, México.

<sup>3</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Centro de Investigación Regional Pacífico Sur, Campo Experimental Rosario Izapa, CP. 30890. Tuxtla Chico, Chiapas, México.

<sup>4</sup>Grupo de Investigación en Nutrición Animal (GINA), Universidad de Guadalajara, Centro Universitario del Sur, CP. 49000. Ciudad Guzmán, Jalisco, México.

\*Autor de correspondencia: montanez77@hotmail.com

### Artículo científico

Recibido: 04 de marzo 2024

Aceptado: 04 de octubre 2024

**RESUMEN.** El objetivo consistió en evaluar *in vitro* las características químicas y fermentativas de mezclas de pasto Estrella (*Cynodon nlemfuensis*; Cn) con niveles crecientes de guácima (*Guazuma ulmifolia*; Gu). En cuatro biodigestores con una capacidad de 2 000 mL cada uno, a los cuales se añadió 200 mL de un medio de cultivo más 20 g de los tratamientos: T1: 20 g Cn (control); T2: 16 g Cn + 4.0 g Gu; T3: 12 g Cn + 8 g Gu; T4: 8 g Cn + 12 g Gu. Los tratamientos se inocularon con 20 mL de líquido ruminal y se mantuvieron a 38 °C durante 24, 48, 72 y 96 h. El diseño experimental fue un completamente al azar con una prueba de medias Tukey. En las muestras se evaluaron las producciones de biogás, metano (CH<sub>4</sub>), ácidos grasos volátiles (AGV), concentración de bacterias totales (BT) y bacterias celulolíticas (BC), además del pH. La inclusión de guácima en la mezcla permitió la reducción de paredes celulares fermentables, que resultó en menor producción de CH<sub>4</sub>. Hubo cambios en el patrón de fermentación de AGV, con disminución en la relación acetato:propionato. El tratamiento control tuvo la mayor concentración de BC, sin diferencias entre los tratamientos en cuanto a las BT. Aunque el pH estuvo por arriba de 6.0, no comprometió la estabilidad en los medios de cultivo. La presencia de guácima en las fermentaciones *in vitro* contribuyó a mitigar la producción de biogás y CH<sub>4</sub>, y mejoró la producción de ácido propiónico.

**Palabras clave:** Biogás, fermentación, forrajes, ganadería, trópico.

**ABSTRACT.** The objective consisted into the evaluation *in vitro* about the chemical and ferment characteristics mixing of the Estrella grass (*Cynodon nlemfuensis*; Cn) with an increase level of guacima (*Guazuma ulmifolia*; Gu). Four biodigester with a capacity fill of 2 000 mL individually, in which one, it was added 200 mL of mid cultivate plus the treatments: T1: 20 g Cn (control); T2: 16 g Cn + 4.0 g Gu; T3: 12 g Cn + 8 g Gu; T4: 8 g Cn + 12 g Gu. Treatments were inoculated with 20 mL of ruminal liquid, and they were kept during, 24, 48, 72 and 96 h in a temperature of 38 °C. The experiment design was a complement randomly measure with Tukey mean comparison test. In the results they were evaluated the productions of biogas, methane (CH<sub>4</sub>), volatile fatty acids (VFA), total bacterial concentrations (TBC) so the cellulolytic bacteria (CB), including the pH. The inclusion on guacima in the mixing allowed the reduction of fermentable cell walls, which result with less production of CH<sub>4</sub>. There were changes in the fermentation patrons of VFA, decreasing on the relation of acetate: propionate. The control treatment had the highest concentration of CB, without differences in the treatments based on the CBT. Although the pH which was up 6.0, it did not compromise the stability of the cultivation medias. The presence of guácima in the fermentations *in vitro* were contributed to mitigate the production of biogas and CH<sub>4</sub>, which get better the production of propionic acid.

**Key words:** Biogas, fermentation, forage, livestock, tropic.

**Como citar:** Ley-de-Coss A, Bran RAA, Morales-Aguilar J, Guerra-Medina CE, Chávez-Espinoza M, Montañez-Valdez OD (2024) Características químicas y fermentativas *in vitro* de *Cynodon nlemfuensis* Vanderyst y *Guazuma ulmifolia* Lam. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios Núm. Esp. IV: e4034. DOI: 10.19136/era.a11nIV.4034.

## INTRODUCCIÓN

La fermentación entérica y excretas de los rumiantes producen gases de efecto invernadero (GEI), de los cuales, los de mayor importancia son dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), metano (CH<sub>4</sub>) y óxido nitroso (N<sub>2</sub>O). De estos GEI, el potencial de calentamiento global del CH<sub>4</sub> es de 21 a 25 veces el del CO<sub>2</sub> (Sánchez-Santillán *et al.* 2018). De modo que, la actividad ganadera contribuye con la aportación de GEI antropogénicas (Gerber *et al.* 2013). La fermentación entérica de los carbohidratos en el rumen produce compuestos orgánicos (ácidos) y ácidos grasos volátiles (AGV) de cadena larga y ramificada. Este patrón de fermentación de AGV depende del tipo de carbohidratos, estructurales o solubles en la dieta, si la síntesis de ácido acético y ácido butírico es mayor, en proporción al ácido propiónico, mayor es la producción de CO<sub>2</sub> e hidrógeno (H<sub>2</sub>) disponibles para las arqueas metanogénicas y aumenta la producción de CH<sub>4</sub> (Chuntrakort *et al.* 2014), que puede representar entre 6.5 y 15% del total de la energía contenida en la dieta (Appuhamy *et al.* 2016).

La producción de CH<sub>4</sub> mediante la reducción de la molécula de dinucleótido de nicotinamida (NAD<sup>+</sup>) evita la reducción del pH en rumen y disminuye la presión intraruminales que afecta la actividad microbiana, de manera principal de consorcios bacterianos celulolíticos (Torres-Salado *et al.* 2019). La producción de CH<sub>4</sub> es mayor cuando los bovinos consumen pastos, que cuando consumen una mezcla de pastos y arbustivas forrajeras (Piñeiro-Vazquez *et al.* 2017, Ku-Vera *et al.* 2018). Dietas con mayor cantidad de nutrientes digestibles y con presencia de metabolitos secundarios en las plantas arbustivas favorecen la síntesis de ácido propiónico, disminución del ácido acético y grupos metilos (-CH<sub>3</sub>) disponibles para la metanogénesis (Fulkerson *et al.* 2007). En bovinos alimentados con forraje, hay relación positiva entre digestibilidad de la hemicelulosa y la cantidad de CH<sub>4</sub> producido; en cambio, con la digestibilidad de la celulosa se da una relación negativa (Holter y Young 1992). La producción de CH<sub>4</sub> podría reducirse con la adición de arbustivas forrajeras como *Guazuma ulmifolia*, *Heliocarpus velutinus*, *Leucaena leucocephala* y *Pithecellobium dulce* (Gaviria *et al.* 2015, Lopez *et al.* 2016, Piñeiro-Vazquez *et al.* 2017). Por lo anterior, la producción *in vitro* de CH<sub>4</sub> se reduce al adicionar en la dieta mayor proporción de nutrientes digestibles (contenido celular) y limitar la proporción de paredes celulares, en particular de celulosa potencialmente fermentable. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar las características químicas y fermentativas de una mezcla a partir de pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*) con niveles crecientes de guácima (*G. ulmifolia*).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Área de estudio

Este experimento se desarrolló en el Laboratorio de Sanidad Agropecuaria de la Facultad de Ciencias Agronómicas Campus V de la UNACH en Villaflores, Chiapas, México (16° 15' 10.08" LN y 93° 14' 59.55" LO y 557 msnm), y en el Laboratorio de Microbiología Ruminal y Genética Microbiana del Programa en Ganadería del Colegio de Postgraduados, Texcoco, México (19° 27' 39.42" LN y 98° 54' 29.25" LO y 2 244 msnm).

## Muestras de forrajes, composición química y tratamientos

Las muestras de *Cynodon nlemfuensis* (zacate estrella de 45 días de crecimiento) se cortaron a 10 cm del suelo y el follaje de *G. ulmifolia* (guácima) se colectó, a la altura de ramoneo, en árboles de 6.5 años de sembrados. Todas las muestras se obtuvieron del Módulo Silvopastoril del Centro de Transferencia de Tecnología “San Ramón” de la Facultad de Ciencias Agronómicas Campus V, con coordenadas 16°15'23" LN y 93°15'13" LO. El material vegetal se deshidrató a 65 °C en una estufa de aire forzado (Novatech, Mod. E145-A1A; México) hasta obtener 90% de materia seca (MS) y se molieron con un Molino eléctrico (Mod. ED-5, México) adaptado con una criba de 1 mm. A las muestras, previo al mezclado, se les realizó análisis para determinar contenido de MS, cenizas, proteína cruda (PC), extracto etéreo (EE) de acuerdo con la técnica de la AOAC (2012), además de los contenidos de fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) de acuerdo con la técnica de Van-Soest *et al.* (1991).

En cuatro biodigestores de capacidad de 2 000 mL cada uno, se les añadió 200 mL de un medio de cultivo más 20 g de las siguientes mezclas, T1: tratamiento compuesto por 20 g de *Cynodon nlemfuensis* (Cn, testigo), T2: tratamiento con 6 g de *C. nlemfuensis* (80%) más 4.0 g de *Guazuma ulmifolia* (Gu, 20%), T3: tratamiento con 12 g de *C. nlemfuensis* (60%) más 8 g de *G. ulmifolia* (40%) y T4: tratamiento con 8 g de *C. nlemfuensis* (40%) más 12 g de *G. ulmifolia* (60%).

## Medio de cultivo anaerobio e inóculo

Se utilizó un medio de cultivo anaerobio para determinar la producción de biogás total, CH<sub>4</sub>, AGV, concentraciones de bacterias totales (BT), bacterias celulolíticas (BC) y pH. Las condiciones de cultivo se llevaron a cabo con asepsia y material completamente esterilizado y con flujo de CO<sub>2</sub> para asegurar condiciones de anaerobiosis (99% de pureza, PRAXAIR®, México). El inóculo consistió en LRF extraído mediante sonda esofágica a un bovino (F2, ¼ Cebú x ¾ Suizo Europeo) de 480 kg PV, alimentado con una dieta para mantenimiento de bovinos de carne, según la NRC (2016) la cual, se basó en 85% de *C. nlemfuensis* y 15% de concentrado (2.70 Mcal kg<sup>-1</sup> de EM y 13.9% PC). El medio de cultivo anaerobio (MCA, 100 mL<sup>-1</sup> de medio) contenía lo siguiente: agua destilada (52.9 mL), líquido ruminal clarificado (30 mL), solución mineral I (5 mL), solución mineral II (5 mL), carbonato de sodio al 8% (5 mL), solución sulfido-cisteína (2 mL) y solución indicadora de oxidación (0.1 mL). Por otro lado, el líquido ruminal clarificado filtrado, se centrifugó por 15 minutos a 17 664 g y se esterilizó 20 min a 121 °C a 15 psi. La solución mineral I, en 1 000 mL, contenía 6 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Meyer®). La solución mineral II, en 1000 mL de H<sub>2</sub>O, llevó 6 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Meyer®), 6 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Meyer®), 12 g de NaCl (Meyer®), 2.45 g de MgSO<sub>4</sub> (Fermont®) y 1.6 g de CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O (Fermont®). El carbonato de sodio al 8% contuvo 8 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Mayer®) en 100 mL de H<sub>2</sub>O bidestilada. La solución sulfido-cisteína estaba compuesto de 2.5 g de L-cisteína (Sigma®; en 15 mL de NaOH 2N [MCD Lab®]) y 2.5 g de Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O (Mayer®; en 100 mL de H<sub>2</sub>O). La solución indicadora de oxidación estaba preparada con 0.1 mL de resazurina (ALDRICH®) en un volumen de 100 mL (0.1%).

## Producción de biogás parcial, total y metano

En cada biodigestor se agregó 200 mL de MCA, 20 g de muestra por tratamiento y se inoculó con 20 mL de LRF del bovino donante, el inóculo fue filtrado en gasas de algodón y se conservó en baño de termorregulación a 38 °C (Felisa FE-373, Fabricantes Feligneo, México), además se

contabilizó las BT con la técnica de número más probable (NMP;  $1.33 \times 10^8$  UFC por mL con un pH de 6.72; Harrigan y McCance 1979). Los tratamientos se incubaron durante 24, 48, 72 y 96 h en baño de termorregulación a  $38 \pm 0.5$  °C. Al terminar cada periodo de incubación se midió la presión de los gases en el manómetro (Wide Range Pressure Meter, Sper Scientific LTD, USA) adaptado al equipo.

La cantidad de biogás (mL g<sup>-1</sup>) producido por g<sup>-1</sup> de materia seca fermentada (MSf), se midió con la técnica de desplazamiento de líquidos, mediante una trampa con frascos Mariotte (Pirex™, 61220; México). Para medir la producción de CH<sub>4</sub>, con la misma técnica de cultivo, inóculo (LRF) y tiempos de incubación, mencionadas con anterioridad, se midió, con el uso de frascos trampas tipo Mariotte que contenían 1 000 mL de NaOH al 2N (20 g L<sup>-1</sup>) como captadores de CO<sub>2</sub>. Los frascos se acoplaron a los biodigestores mediante mangueras de Taygon acopladas a agujas hipodérmicas (Terumo®, SS-03L2038; EE. UU). Todos los datos de producción de biogás y CH<sub>4</sub> se corrigieron con los datos obtenidos de muestras control, las cuales se mantuvieron bajo las mismas condiciones de medio de cultivo, inóculo, tiempo y temperatura, pero sin sustrato de los tratamientos, siguiendo la técnica descrita por Ley-de-Coss *et al.* (2018).

Al terminar la incubación, 5.0 mL de medio de cultivo de cada tratamiento se retiró y centrifugó a 18 000 g por 10 min, en tubos Eppendorf (Eppendorf Tubes®) se colocó 2.0 mL del sobrenadante y se adicionó (proporción de 4:1) 0.5 mL de ácido metafosfórico (Meyer®) al 25%. Estas muestras se mezclaron con un vortex (Thermo Scientific, LP Vortex Mixer, USA) y se centrifugaron a 35 000 g durante 60 s y al sobrenadante se determinó la concentración de AGV en un cromatógrafo de gases (Claurus 500, Perkin-Elmer™, USA) según la técnica y condiciones del equipo descritas por Ley-de-Coss *et al.* (2016). En los medios de cultivo se determinó la concentración de BT y BC, mediante la técnica del NMP, para tal fin, se obtuvo 0.5 mL de la parte líquida contenida en los biodigestores a cada periodo de incubación y se inoculó en el MCA descrito anteriormente, usado como base, al cual se adicionó 0.06 g de D-(+)-glucosa (Meyer®) + 0.06 g D-celobiosa (Meyer®) + 0.06 g de almidón (J. T. Baker®) para BT y para las BC se utilizó el MCA más 0.2 g de celulosa cristalina (Avicel®) como única fuente de energía.

### Diseño y análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento. Los datos de producción de biogás, CH<sub>4</sub>, concentración de AGV y pH de los medios de cultivo se analizaron con el Modelo Lineal General (SAS 2011). Para los datos de conteo de BT y BC se usó la prueba de Kruskal-Wallis y el procedimiento GLM con datos de rangos independientes de Wilcoxon de SAS (SAS 2011). Los valores promedio de cada tratamiento se compararon con la prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

## RESULTADOS

La composición química de la dieta es crucial para los resultados de la fermentación. La inclusión de guácima en diferentes proporciones mostró un efecto significativo en el contenido de FDN y FDA (Tabla 1). Las fibras detergentes, principalmente compuestas por celulosa, hemicelulosa y

lignina, son potencialmente fermentables y tienen un impacto directo en la producción de biogás, especialmente de CH<sub>4</sub>. La adición de guácima en las mezclas (tratamientos) incrementó los valores de PC, éste aumento en nutrientes de mayor degradabilidad, junto con la reducción de los componentes de la FDN (celulosa, hemicelulosa y lignina) en los tratamientos con guácima (T2, T3 y T4), alteró los patrones de fermentación. Esta modificación en la composición de la dieta resultó en cambios en la producción de biogás y CH<sub>4</sub>, evidenciando la influencia directa de la dieta en los procesos fermentativos y en la generación de gases.

**Tabla 1.** Composición química de los tratamientos con mezclas de *Cynodon nlemfuensis* (Cn) y *Guazuma ulmifolia* (Gu).

Nutriente	T1	T2	T3	T4
	g por 100 g			
Materia seca	93.6	93.2	92.2	92.4
Cenizas	6.72	6.3	5.38	4.92
Fibra cruda	30.3	28.9	28.1	29.5
Fibra detergente neutro	66.6	63.7	58.2	57.9
Fibra detergente ácida	41.3	39.3	32.6	33.1
Proteína cruda (N <sub>2</sub> x 6.25)	9.4	13.3	16.8	17.7
Extracto etéreo	1.9	1.8	1.59	1.6
ELN	52.6	51.7	49.5	50.0

T1: tratamiento número 1 compuesto por 20 g de *Cynodon nlemfuensis* (testigo), T2: tratamiento número 2 contenía 6 g de *C. nlemfuensis* (80%) más 4.0 g de *Guazuma ulmifolia* (20%), T3: tratamiento número 3 llevaba 12 g de *C. nlemfuensis* (60%) más 8 g de *G. ulmifolia* (40%) y T4: tratamiento número 4 con 8 g de *C. nlemfuensis* (40%) más 12 g de *G. ulmifolia* (60%).

La mayor producción de biogás ( $p \leq 0.05$ ) observada en el tratamiento control (T1) (Tabla 2) se atribuye a la menor cantidad de nutrientes digestibles (PC, EE y ELN) y mayor concentración de paredes celulares de lenta degradación (FDN), en comparación con los tratamientos con cantidades crecientes de guácima.

En cuanto a la producción de CH<sub>4</sub> (Tabla 3), los tratamientos con guácima mostraron una menor producción en comparación con el control, lo que se relaciona con la mayor cantidad de nutrientes digestibles y la reducción en las proporciones de paredes celulares fermentables, particularmente la celulosa y la hemicelulosa.

En relación con las características fermentativas, las concentraciones de AGV mostraron cambios significativos ( $p < 0.05$ ) en los tratamientos con guácima. Se observó una disminución del ácido acético, un aumento del ácido propiónico y cantidades similares de ácido butírico ( $p > 0.05$ ). Las diferencias en el pH (Tabla 4) entre el control y los demás tratamientos fueron significativas ( $p \leq 0.05$ ) durante la incubación, manteniéndose por encima de 6.0. Esto indica condiciones de

fermentación adecuadas para el crecimiento y metabolismo de los consorcios microbianos, a pesar de los cambios en los patrones de fermentación de AGV.

**Tabla 2.** Producción de biogás parcial y total (mL de biogás g<sup>-1</sup> de MSf) de diferentes mezclas de *Cynodon nlemfuensis* (Cn) y *Guazuma ulmifolia* (Gu).

Tratamiento	Tiempo de incubación (h)				
	24	48	72	96	Total
T1	170.0 <sup>a</sup>	255.0 <sup>a</sup>	525.3 <sup>a</sup>	155.0 <sup>a</sup>	1105.3 <sup>a</sup>
T2	127.0 <sup>b</sup>	232.3 <sup>ab</sup>	527.6 <sup>a</sup>	147.3 <sup>a</sup>	1034.2 <sup>a</sup>
T3	87.0 <sup>c</sup>	229.0 <sup>ab</sup>	420.3 <sup>a</sup>	61.0 <sup>b</sup>	797.3 <sup>b</sup>
T4	82.6 <sup>c</sup>	183.6 <sup>b</sup>	371.0 <sup>b</sup>	68.3 <sup>b</sup>	705.5 <sup>b</sup>
EEM	13.9	22.7	40.1	21.3	55.3
DMS	26.3	42.9	75.5	60.8	98.9

a, b, c: Medias con diferentes literales en la misma columna son diferentes ( $p \leq 0.01$ ). MSf: materia seca fermentada. T1: tratamiento número 1 compuesto por 20 g de *Cynodon nlemfuensis* (testigo), T2: tratamiento número 2 contenía 6 g de *C. nlemfuensis* (80%) más 4.0 g de *Guazuma ulmifolia* (20%), T3: tratamiento número 3 llevaba 12 g de *C. nlemfuensis* (60%) más 8 g de *G. ulmifolia* (40%) y T4: tratamiento número 4 con 8 g de *C. nlemfuensis* (40%) más 12 g de *G. ulmifolia* (60%). EEM, Error estándar de la media; DMS: Diferencia mínima significativa.

**Tabla 3.** Producción de CH<sub>4</sub> (mL de metano g<sup>-1</sup> de MSf) de diferentes niveles de *Cynodon nlemfuensis* (Cn) y *Guazuma ulmifolia* (Gu) a diferentes tiempos de incubación.

Tratamiento	Tiempo de incubación (h)				
	24	48	72	96	Total
T1	131.6 <sup>a</sup>	194.2 <sup>a</sup>	377.2 <sup>a</sup>	113.8 <sup>a</sup>	816.8 <sup>a</sup>
T2	85.9 <sup>b</sup>	156.2 <sup>b</sup>	357.0 <sup>a</sup>	99.6 <sup>a</sup>	698.7 <sup>b</sup>
T3	39.7 <sup>c</sup>	104.5 <sup>c</sup>	191.8 <sup>b</sup>	27.7 <sup>b</sup>	363.7 <sup>c</sup>
T4	37.7 <sup>c</sup>	83.8 <sup>c</sup>	169.3 <sup>b</sup>	31.2 <sup>b</sup>	322 <sup>c</sup>
EEM	9.0	15.4	27.3	14.5	22.1
DMS	16.9	29.74	51.5	27.4	41.8

a, b, c: Medias con diferentes literales en la misma columna son diferentes ( $p \leq 0.01$ ). MSf: Materia Seca fermentada. T1: tratamiento número 1 compuesto por 20 g de *Cynodon nlemfuensis* (testigo), T2: tratamiento número 2 contenía 6 g de *C. nlemfuensis* (80%) más 4.0 g de *Guazuma ulmifolia* (20%), T3: tratamiento número 3 llevaba 12 g de *C. nlemfuensis* (60%) más 8 g de *G. ulmifolia* (40%) y T4: tratamiento número 4 con 8 g de *C. nlemfuensis* (40%) más 12 g de *G. ulmifolia* (60%). EEM, Error estándar de la media; DMS: Diferencia mínima significativa.

**Tabla 4.** Producción de AGV (mmol L<sup>-1</sup>) y pH de diferentes mezclas de *Cynodon nlemfuensis* (Cn) y *Guazuma ulmifolia* (Gu) a diferentes tiempos de incubación.

Tratamiento	Tiempo de incubación (h)			
	24	48	72	96
<i>Ácido acético</i>				
T1	45.2 <sup>a</sup>	52.6 <sup>a</sup>	64.3 <sup>a</sup>	84.2 <sup>a</sup>
T2	25.1 <sup>b</sup>	27.4 <sup>b</sup>	36.9 <sup>b</sup>	51.1 <sup>b</sup>
T3	25.9 <sup>b</sup>	28.4 <sup>b</sup>	38.2 <sup>b</sup>	53.0 <sup>b</sup>
T4	28.7 <sup>b</sup>	31.2 <sup>b</sup>	42.1 <sup>b</sup>	58.3 <sup>b</sup>
EEM	3.96	5.6	7.5	8.4
DMS	7.4	10.5	14.1	15.9
<i>Ácido propiónico</i>				
T1	13.5 <sup>b</sup>	12.7 <sup>b</sup>	13.5 <sup>b</sup>	18.8 <sup>b</sup>
T2	15.6 <sup>ab</sup>	22.2 <sup>a</sup>	24.6 <sup>b</sup>	34.1 <sup>a</sup>
T3	17.6 <sup>ab</sup>	23.8 <sup>a</sup>	17.9 <sup>ab</sup>	24.9 <sup>ab</sup>
T4	23.3 <sup>a</sup>	28.3 <sup>a</sup>	23.8 <sup>a</sup>	33.0 <sup>a</sup>
EEM	7.4	3.8	5.2	7.2
DMS	8.8	7.2	9.8	13.6
<i>Ácido butírico</i>				
T1	4.8 <sup>a</sup>	6.7 <sup>a</sup>	6.8 <sup>a</sup>	9.4 <sup>a</sup>
T2	6.3 <sup>a</sup>	8.8 <sup>a</sup>	8.9 <sup>a</sup>	12.4 <sup>a</sup>
T3	4.6 <sup>a</sup>	6.5 <sup>a</sup>	6.6 <sup>a</sup>	9.1 <sup>a</sup>
T4	5.4 <sup>a</sup>	7.6 <sup>a</sup>	7.7 <sup>a</sup>	10.7 <sup>a</sup>
EEM	1.8	2.5	2.6	3.6
DMS	3.8	4.8	4.9	6.8
<i>pH</i>				
T1	7.1 <sup>a</sup>	6.6 <sup>ab</sup>	6.7 <sup>ab</sup>	6.1 <sup>b</sup>
T2	6.3 <sup>c</sup>	6.1 <sup>b</sup>	6.3 <sup>b</sup>	6.4 <sup>ab</sup>
T3	7.2 <sup>ab</sup>	7.1 <sup>a</sup>	7.1 <sup>b</sup>	7.1 <sup>a</sup>
T4	7.8 <sup>a</sup>	7.4 <sup>a</sup>	6.0 <sup>c</sup>	7.1 <sup>a</sup>
EEM	0.24	0.34	0.30	0.36
DMS	0.64	0.9	0.65	0.57

<sup>a</sup>, <sup>b</sup>, <sup>c</sup>: Medias con diferentes literales en la misma columna son diferentes ( $p \leq 0.01$ ). T1: tratamiento número 1 compuesto por 20 g de *Cynodon nlemfuensis* (testigo), T2: tratamiento número 2 contenía 6 g de *C. nlemfuensis* (80%) más 4.0 g de *Guazuma ulmifolia* (20%), T3: tratamiento número 3 llevaba 12 g de *C. nlemfuensis* (60%) más 8 g de *G. ulmifolia* (40%) y T4: tratamiento número 4 con 8 g de *C. nlemfuensis* (40%) más 12 g de *G. ulmifolia* (60%). EEM, Error estándar de la media; DMS: Diferencia mínima significativa.

La concentración total de bacterias (BT) mostró una tendencia decreciente en los tratamientos con guácima, especialmente en el control a las 96 horas de incubación. La adaptación a las condiciones de cultivo y la interacción entre los consorcios bacterianos para alcanzar una estabilidad ecológica parecen depender de la interdependencia nutricional. Esto incrementa la diversidad metabólica y la liberación de compuestos necesarios para mantener la población bacteriana. La cantidad de bacterias celulolíticas (BC) aumentó ( $p \leq 0.01$ ) en el control hasta el final de la incubación (Tabla 5) en comparación con los demás tratamientos.

**Tabla 5.** Concentración de bacterias totales y bacterias celulolíticas ( $\text{mL}^{-1}$  de medio de cultivo) a partir de diferentes niveles de *Cynodon nlemfuensis* (Cn) y *Guazuma ulmifolia* (Gu) a diferentes tiempos de incubación.

Tratamiento	Tiempo (h)			
	24	48	72	96
<i>Bacterias totales</i>				
T1	$5.1 \times 10^9$	$4.3 \times 10^9$	$4.8 \times 10^9$	$3.0 \times 10^{9b}$
T2	$6.8 \times 10^9$	$7.9 \times 10^9$	$3.6 \times 10^9$	$15.4 \times 10^{9a}$
T3	$5.0 \times 10^9$	$5.7 \times 10^9$	$7.5 \times 10^9$	$11.2 \times 10^{9ab}$
T4	$5.9 \times 10^9$	$6.9 \times 10^9$	$5.4 \times 10^9$	$13.4 \times 10^{9a}$
EEM	2.7	2.2	3.2	1.7
DMS	7.7	5.9	8.8	4.7
<i>Bacterias celulolíticas</i>				
T1	$11.0 \times 10^{7a}$	$2.59 \times 10^{7a}$	$4.30 \times 10^{7a}$	$6.74 \times 10^{7a}$
T2	$4.40 \times 10^{5b}$	$1.03 \times 10^{5b}$	$1.71 \times 10^{5b}$	$2.67 \times 10^{5b}$
T3	$4.1 \times 10^{3c}$	$1.9 \times 10^{3c}$	$1.6 \times 10^{3c}$	$2.5 \times 10^{3c}$
T4	$2.0 \times 10^{3c}$	$1.0 \times 10^{3c}$	$1.0 \times 10^{3c}$	$1.2 \times 10^{3c}$
EEM	1.0	1.0	1.0	1.0
DMS	2.7	2.7	2.7	2.7

a, b, c: Medias con diferentes literales en la misma columna son diferentes ( $p \leq 0.01$ ). T1: tratamiento número 1 compuesto por 20 g de *Cynodon nlemfuensis* (testigo), T2: tratamiento número 2 contenía 6 g de *C. nlemfuensis* (80%) más 4.0 g de *Guazuma ulmifolia* (20%), T3: tratamiento número 3 llevaba 12 g de *C. nlemfuensis* (60%) más 8 g de *G. ulmifolia* (40%) y T4: tratamiento número 4 con 8 g de *C. nlemfuensis* (40%) más 12 g de *G. ulmifolia* (60%). EEM, Error estándar de la media; DMS: Diferencia mínima significativa;

## DISCUSIÓN

La composición química de la dieta es fundamental para determinar el patrón de fermentación ruminal y los productos resultantes. En esta investigación, la inclusión de guácima en las mezclas forrajeras redujo la proporción de FDN y FDA. Estudios previos han señalado que las fibras detergentes, compuestas por celulosa, hemicelulosa y lignina, son potencialmente fermentables, lo

cual impacta la producción de biogás, especialmente de CH<sub>4</sub> (Vanegas *et al.* 2017, Ley-de-Coss *et al.* 2018). La adición de guácima en la dieta también incrementó el contenido de PC, EE, carbohidratos no fibrosos (CNF) y nutrientes altamente degradables, este cambio en la composición de la dieta influyó en los patrones de fermentación y modificó la producción de GEI (Lopez *et al.* 2016). La mayor producción de biogás y los patrones de fermentación observados podrían estar relacionados con las diferencias en las proporciones de los componentes de las paredes celulares fermentables, como celulosa, hemicelulosa y lignina, entre el zacate estrella y la guácima. Estos resultados son coherentes con estudios previos que han mostrado que dietas con bajo contenido de nutrientes digestibles y alto en carbohidratos estructurales tienden a aumentar la producción de biogás (Sánchez-Santillán *et al.* 2016, Vanegas *et al.* 2017). La fermentación de carbohidratos estructurales incrementa la producción de ácido acético e H<sub>2</sub>, que son sustratos clave para el metabolismo de los consorcios bacterianos y arqueas metanogénicas responsables de la producción de CH<sub>4</sub> (Araujo *et al.* 2011, Rivas-Martínez *et al.* 2023). En los tratamientos donde se incluyó guácima, la menor producción de CH<sub>4</sub> se vinculó con mayores cantidades de nutrientes digestibles y una reducción en las proporciones de paredes celulares fermentables, específicamente en la relación de celulosa y hemicelulosa. Esto sugiere que la guácima mejora la disponibilidad de nutrientes fácilmente degradables, lo que cambia el patrón de fermentación ruminal y disminuye la producción de CH<sub>4</sub>. La fermentación de nutrientes digestibles en la dieta provoca cambios significativos en el metabolismo ruminal y en los patrones de fermentación, resultando en una reducción de la transformación de la energía contenida en la dieta a CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> (Elghandour *et al.* 2016).

La concentración de ácido acético fue mayor en el tratamiento control (T1) sin guácima; en contraste, la concentración de ácido propiónico fue también mayor en los tratamientos con guácima. Este cambio en el patrón de fermentación puede atribuirse a la mayor disponibilidad de nutrientes digestibles, como PC, EE y CNF, y al menor contenido de paredes celulares, incluyendo FDN y FDA. La disminución en la fermentación acetilica, que es la principal vía productora de ácido acético, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> y CH<sub>4</sub>, promovió la activación de vías alternativas, como las rutas del succinato y acrilato, que producen ácido propiónico y generan menores cantidades de CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub> para los consorcios metanogénicos (Araujo *et al.* 2011). Esto resultó en una reducción de la producción de CH<sub>4</sub> (Sánchez-Santillán *et al.* 2016). Efectos similares se han observado en estudios *in vitro* de la degradación de pastos tropicales con menor contenido de paredes celulares fermentables (Ley-de-Coss *et al.* 2018), donde se reportó una menor producción de ácido acético y una disminución en la producción de CH<sub>4</sub> (Galindo *et al.* 2007, Velez *et al.* 2018). Estos hallazgos sugieren que la inclusión de guácima en la dieta no solo mejora la eficiencia de la fermentación ruminal al aumentar la producción de AGV más eficientes, como el ácido propiónico, sino que también contribuye a la reducción de GEI, específicamente el CH<sub>4</sub>.

Los valores de pH superiores a 6.0 indican condiciones óptimas para la fermentación, favoreciendo el crecimiento y el metabolismo de los consorcios microbianos (Sung *et al.* 2007). A pesar de los cambios en los patrones de fermentación de AGV, la mayor producción de ácido propiónico no afectó significativamente el pH ruminal (Chen *et al.* 2011). La concentración de bacterias totales, medida a las 96 horas de incubación (Tabla 5), fue menor en el tratamiento control en comparación con los tratamientos con guácima. La adaptación a las condiciones de cultivo y la interacción entre los consorcios bacterianos para alcanzar la estabilidad ecológica dependen de la interdependencia

nutricional, o alimentación cruzada, que aumenta la diversidad metabólica y la liberación de compuestos químicos necesarios para mantener la población bacteriana (Cobos 2007).

La inclusión de guácima en la dieta forrajera aumentó la diversidad y actividad microbiana, lo que provocó cambios en los patrones de AGV y, por lo tanto, una menor emisión de biogás y CH<sub>4</sub>. La cantidad de BC aumentó ( $p \leq 0.01$ ) en el tratamiento control hasta el final de la incubación, en comparación con los demás tratamientos. Esto se debe a que el contenido de nutrientes digestibles proporcionados por la guácima redujo el contenido de paredes celulares, lo que provocó una disminución en la población de BC. La reducción de las fracciones de FDN y FDA en la dieta alteró los consorcios microbianos, afectando la fermentación y los productos finales de su metabolismo (Ku-Vera *et al.* 2018). Estos resultados destacan la importancia de la composición química de la dieta en la modificación de los patrones de fermentación y en la reducción de la producción de GEL.

## CONCLUSIONES

La inclusión de guácima (*Guazuma ulmifolia*) en la dieta modificó los consorcios microbianos, afectando la fermentación y los productos finales del metabolismo, lo que resultó en una menor emisión de biogás y metano. La reducción de la fracción de fibra detergente neutro y fibra detergente ácida en la dieta alteró los consorcios microbianos y cambió los patrones de fermentación, demostrando que la guácima puede ser una opción efectiva para reducir las emisiones de gases de efecto invernadero en sistemas de producción animal.

## AGRADECIMIENTOS

A estudiantes de la Facultad de Ciencias Agronómicas Campus V de la UNACH que colaboraron, al responsable técnico del proyecto 06/AGV/RPR/010/19, titulado: Estrategia biotecnológica para estimular el desarrollo ruminal en becerros lactantes. Al Laboratorio de Nutrición Animal del Programa de Ganadería del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo por el apoyo en el análisis de muestras para determinar composición química y la producción de gases de efecto invernadero en el presente trabajo de investigación.

## LITERATURA CITADA

- AOAC (2012) Official Methods of Analysis. 19th Edition. Association of Official Analytical Chemists. Gaithersburg, Mary Land, USA. Chapter 4: 1-44.
- Appuhamy J, France J, Kebreab K (2016) Models for predicting enteric methane emissions from dairy cows in North America, Europe, and Australia and Zealand. *Global Change Biology* 22: 3039-3056.
- Araujo RC, Pires AV, Mourão GB, Abdalla AL, Sallam SMA (2011) Use of blanks to determine *in vitro* net gas and methane production when using rumen fermentation modifiers. *Animal Feed Science and Technology* 166-167: 155-162.

- Chen Y, Penner GB, Li M, Oba M, Guan LG (2011) Changes in bacterial diversity associated with epithelial tissue in the beef cow rumen during the transition to a high grain diet. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 5770-5781.
- Chuntrakort P, Otsuka M, Hayashi K, Takenaka A, Udchachon S, Sommart K (2014) The effect of dietary coconut kernels, whole cottonseeds and sunflower seeds on the intake, digestibility and enteric methane emissions of Zebu beef cattle fed rice straw-based diets. *Live Science* 161: 80-89.
- Cobos MA (2007) Interacción entre microorganismos ruminales. In: Ferrera-Cerrato R, Alarcón A (eds) *Microbiología agrícola. Hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico y planta-microorganismo*. Trillas. Ciudad de México. pp. 498-516.
- Elghandour MMY, Kholif AE, Lopez S, Mendoza GD, Odongo NE, Salem AZM (2016) *In vitro* gas, methane and carbon dioxide productions of high fibrous diet incubated with fecal inocula from horses fed live yeasts in response to the supplementation with different yeast additives. *Journal of Equine Veterinary Science* 38: 64-71. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2015.12.010>
- Fulkerson W, Neal J, Clark C, Horadagoda A, Nandra K, Barchia I (2007) Nutritive value of forage species grown in the warm temperate climate of Australia for dairy cows: grasses and legumes. *Live Science* 107: 253-264. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2006.09.029>
- Galindo J, García C, Marrero Y, Castillo E, Aldana AI, Torres V, Sarduy L (2007) Efecto de la composición del pastizal de *Leucaena leucocephala* con gramíneas en la población microbiana ruminal de toros. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola* 41: 145-148.
- Gaviria X, Naranjo JF, Barahona R (2015) Cinética de fermentación *in vitro* de *Leucaena leucocephala* y *Megathyrus maximus* y sus mezclas, con o sin suplementación energética. *Revista Pastos y Forrajes* 38: 55-63.
- Gerber PJ, Steinfeld H, Henderson B, Mottet A, Opio C, Dijkman J, Falcucci A, Tempio G (2013) Enfrentando el cambio climático a través de la ganadería – Una evaluación global de las emisiones y oportunidades de mitigación. Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura (FAO), Roma. 129 pp. <https://www.fao.org/4/i3437s/i3437s.pdf>
- Harrigan WF, McCance EM (1979). *Métodos de Laboratorio en Microbiología de los Alimentos y Productos Lácteos*. Ed. Academia. León, España. 420 pp.
- Holter JB, Young AJ (1992) Methane prediction in dry and lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 75: 2165-2175.
- Ku-Vera JC, Valencia-Salazar SS, Piñeiro-Vázquez AT, Molina-Botero IC, Arroyave-Jaramillo J, Montoya-Flores MD, Lazos-Balbuena FJ, Canul-Solis JR, Arceo-Castillo JI, Ramírez-Cancino L, Escobar-Restrepo CS, Alayón-Gamboa JA, Jiménez-Ferrer G, Zavala-Escalante LM, Castelán-Ortega OA, Quintana-Owen P, Ayala-Burgos AJ, Aguilar-Pérez CF, Solorio-Sánchez FJ (2018) Determination of methane yield in cattle fed tropical grasses as measured in open-circuit respiration chambers. *Agricultural and Forest Meteorology* 258: 3-7. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2018.01.008>
- Ley-de-Coss A, Guerra-Medina C, Montañez-Valdez O, Guevara-Hernández F, Pinto-Ruiz R, Reyes-Gutiérrez J (2018) *In vitro* production of gas methane by tropical grasses. *Revista MVZ Córdoba* 23: 6788-6798. <https://doi.org/10.21897/rmvz.1368>
- Ley-de-Coss A, de León W, Guerra-Medina CE, Arce-Espino C, Pinto R (2016) Crecimiento de bacterias ruminales en un medio de cultivo a base de pasta de *Jatropha curcas* L. sin detoxificar. *Agrociencia* 50: 1001-1011.
- Lopez D, Vazquez-Armijo JF, Lopez-Villalobos N, Lee-Range HA, Salem AZM, Borquez-Gastelum JL, Domínguez-Vara IA, Rojo-Rubio R (2016) *In vitro* gas production of foliage from three browse tree species treated with different dose levels of exogenous fibrolytic enzymes. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 100: 920-928. <https://doi.org/10.1111/jpn.12467>

- NRC (2016) National Research Council. National Academy of Science, Nutrient Requirements of beef cattle. Committee of Nutrient Requirements of beef cattle. Eight editions. Washington DC. National Academy Press. 475p. <https://doi.org/10.17226/19014>
- Piñeiro-Vazquez AT, Canul-Solís JR, Alayon-Gamboa JA, Chay-Canul AJ, Ayala-Burgos AJ, Solorio-Sánchez FJ, Aguilar-Pérez CF, Ku-Vera JC (2017) Energy utilization, nitrogen balance and microbial protein supply in cattle fed Pennisetum purpureum and condensed tannins. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 101: 159-169. <https://doi.org/10.1111/jpn.12436>
- Rivas-Martínez MI, Cobos-Peralta MA, Ley-de-Coss A, Bárcena-Gama JR, González-Muñoz SS (2023) Producción de metano *in vitro* y características fermentativas de gramíneas forrajeras templadas y tropicales. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios* 10(1): e3393. <https://doi.org/10.19136/era.a10n1.3393>
- Sánchez-Santillán P, Cobos-Peralta MA, Hernández-Sánchez D, Álvaro-Iglesias A, Espinosa-Victoria D, Herrera-Haro JG (2016) Uso de carbón activado para conservar bacterias celulolíticas liofilizadas. *Agrociencia* 50: 575-582.
- Sánchez-Santillán P, Torres-Cardona MG, Soriano-Robles RG, Fernández-Luqueño F, Medina-Pérez G, O. del Razo-Rodríguez E, Almaraz-Buendía I (2018) Potencial de emisión de gases efecto invernadero de plantas forrajeras por fermentación entérica. *Agroproductividad* 11(2): 40-45.
- SAS (2011) Statistical Analysis System, SAS/STAT. Version 9.3. User's Guide: SAS Inst., Cary, NC. Pp 177-178 y 349-356. <https://support.sas.com/documentation/onlinedoc/base/procstat93m1.pdf>. Fecha de consulta: 10 de enero de 2019.
- Sung HG, Kobayashi Y, Chang J, Ha A, Wang H, Ha JK (2007) Low ruminal pH reduces dietary fiber digestion via reduced microbial attachment. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 20(2): 200-207. <https://doi.org/10.5713/ajas.2007.200>
- Torres-Salado N, Sánchez-Santillán P, Rojas-García RA, Almaraz-Buendía I, Herrera-Pérez J, Reyes-Vázquez I, Mayren-Mendoza FJ (2019) Producción de gas *in vitro* y características fermentativas de consorcios bacterianos celulolíticos ruminales de búfala de agua (*Bubalus bubalis*) y vaca Suiz-bu. *Agrociencia* 53: 145-159.
- Van-Soest PJ, Robertson B, Lewis BA (1991) Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. Symposium: carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 74: 3583-3597.
- Vanegas JL, González J, Carro MD (2017) Influence of protein fermentation and carbohydrate source on *in vitro* methane production. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 101: e288-e296. <https://doi.org/10.1111/jpn.12604>
- Velez-Terranova M, Campos-Gaona R, Sánchez-Guerrero H, Giraldo LA (2018) Fermentation dynamics and methane production of diets based on *Brachiaria humidicola* with high inclusion levels of *Enterolobium schomburgkii* and *Senna occidentalis* in a Rusitec System. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 21: 163-175. <http://dx.doi.org/10.56369/tsaes.2264>