



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

PRODUCCIÓN DE GAS *IN VITRO* DE DIEZ GRAMINEAS FORRAJERAS  
TROPICALES

TESIS  
PARA OBTENER EL TITULO DE  
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA  
JAQUELINE SÁNCHEZ MORA

ASESORES:  
PhD EPIGMENIO CASTILLO GALLEGOS  
PhD JULIETA GESTRUDIS ESTRADA FLORES



México, D.F.

2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **DEDICATORIAS**

A mis padres Jaime y Paz Mora que me han enseñado a amar a los animales y respetar todo ser vivo, ayudarme en cada momento de la vida en que he tropezado y ellos con su amor y comprensión me han ayudado a salir adelante de cada situación difícil.

Mi hermano Sergio por brindarme su apoyo, cariño y admiración así como sus buenos consejos y porras en este difícil camino.

Familia, gracias a ustedes pude salir adelante y prueba de esto es esta investigación que realice cada momento pensando en su apoyo y amor.

## **AGRADECIMIENTO**

Quiero expresar mi profundo reconocimiento a la paciencia de mis asesores Julieta G. Estrada y Epigmenio Castillo, así como a mis sinodales Agustín Bobadilla, Braulio Valles, Francisco Castrejón y Jesús Jarillo por todo el apoyo que recibí durante la revisión exhaustiva y asesoría de esta investigación.

Agradezco también a todos aquellos amigos y compañeros que me dieron ánimos durante todo este trayecto de vida, a mis grandes amigas Cindy, Diana, Berenice, Raquel, Marlene, Adri, Mon, Isabel, mis amigos Omar, Juan Pablo, Edgar De León, Edgar, Alex, José Juan, Nestor, Víctor Alejandro, Ebert, Kike, Jorge, Abraham, Israel por sus consejos, confianza y el apoyo que recibí de ellos en los momentos difíciles, como aquella caída a inicios de la carrera y el estrés al regresar de Toluca.

Sin olvidar esos grandes amigos de la palomilla (Juan, Roedor, Omar, Santiago, Pastor, Trapito, etc.) que estuvieron en esta recta final, eh hicieron más ameno el trabajo tanto en el laboratorio como en la vida cotidiana. Y tantos amigos que falta por mencionar aunque a pesar de que no estén aquí sus nombres saben lo importante que han sido y les eh demostrado mi confianza y apoyo así como ellos lo han hecho.

A mis amigos los cuales quiero y eh pasado los mejores momentos de la vida, desde risas hasta momentos de angustia por sus bromas de mal gusto, Brenda, Yolanda, Nallely, Fernando, Sergio, Alan, Yesenia, Diana, Dana, Ernesto, gracias por brindarme su amistad y compañerismo desde que iniciamos la preparatoria, hasta la fecha.

A mis lindas compañeras de trabajo en Toluca, Marisol, Beatriz y Brenda que estuvieron noches de desvelo a mi lado apoyando para no quedarnos dormidas, haciendo distintas actividades laborales juntas y siempre apoyándonos unos a otros.

Sin olvidar al Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales por abrimme las puertas de sus instalaciones para poder realizar el excelente trabajo de laboratorio así como la gente que labora ahí. Al CEIEGT por darme la oportunidad de crecer como estudiante y persona, y a mi casa de estudios Universidad Nacional Autónoma de México.

Se agradece al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Universidad Nacional Autónoma de México, haber financiado parte de la investigación contenida en esta tesis, efectuada dentro del proyecto IN213910 intitulado “Potencial forrajero de gramíneas introducidas en un clima cálido húmedo del estado de Veracruz”.

## CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
I. REVISIÓN DE LITERATURA	5
1.1. Indicadores de calidad en plantas forrajeras	5
1.1.1. Fracciones de fibra de Van Soest	5
1.1.2. El método ANKOM para determinar componentes de la pared celular	7
1.1.3. Proteína Cruda (PC)	8
1.1.4. Digestibilidad <i>in situ</i> o <i>in sacco</i>	10
1.1.4.1 Descripción de la técnica <i>in situ</i>	11
1.1.4.2 Producción de gas <i>in vitro</i>	12
1.2. Valor nutricional de gramíneas forrajeras tropicales	15
1.3. Gramíneas empleadas en el presente experimento	16
1.3.1. <i>Panicum máximum</i>	16
1.3.1.1. Cultivar Mombasa	16
1.3.1.2. Cultivar Guinea o privilegio	18
1.3.1.3. Cultivar Tanzania	19
1.3.2. <i>Brachiaria</i> spp	20
1.3.2.1. Chetumal ( <i>B. humidicola</i> )	20
1.3.2.2. Señal o Chontalpo ( <i>B. decumbens</i> )	22

1.3.2.3. Insurgente ( <i>B. brizantha</i> )	23
1.3.2.4. Mulato 1( <i>B. brizantha</i> x <i>B. ruzizensis</i> )	24
1.3.3. <i>Pennisetum</i> spp	25
1.3.3.1. King grass morado ( <i>P. purpureum</i> x <i>P. typhoides</i> )	26
1.3.3.2. Taiwan ( <i>Pennisetum purpureum</i> )	27
1.3.3.3. King grass cubano CT 115 ( <i>P. purpureum</i> x <i>P. typhoides</i> )	28
1.4. Efecto del clima tropical en la calidad del forraje	29
1.5. Efecto de la edad de rebrote sobre la calidad nutritiva	32
II. JUSTIFICACIÓN	34
III. HIPOTESIS	35
IV. OBJETIVOS	35
V. MATERIALES Y MÉTODOS	36
5.1. Descripción del sitio experimental	36
5.2. Gramíneas bajo estudio y su manejo	36
5.3. Producción de gas <i>in vitro</i>	39
5.4. Análisis estadístico de la información	40
5.4.1. Obtención de los parámetros de producción de gas	40
5.4.2. Análisis de varianza de los parámetros	40
VI. RESULTADOS	42
VII. DISCUSIÓN	47
7.1. Efecto de la gramínea	47
7.2. Efecto del ciclo de corte	50
7.3. Efecto de la edad al corte	52
VIII. CONCLUSIONES E IMPLICACIONES	55
IX. REFERENCIAS	56

## CONTENIDO (Continuación)

Capítulo	Pág
APENDICE I Procedimiento para medir producción de gás	65
A.1. Colecta del líquido ruminal	66
A.2. Preparación de solución amortiguadora (saliva artificial)	66
A.3. Preparación final de la solución reductora	67
A.4. Preparación de la mezcla final	67
A.5. Transductor de presión	68
Figura 1. Esquema de análisis del sistema Van Soest	6
Figura 2. Diseño experimental bloques completos al azar	37
Figura 3. Curvas de producción de gas por ciclo de cosecha, de diez gramíneas forrajeras tropicales cultivadas en trópico húmedo del estado de Veracruz.	44
Figura 4. Curvas de producción de gas por edad de corte, de diez gramíneas forrajeras tropicales cultivadas en el trópico de Veracruz	45
Figura 5. Curvas de producción de gas de diez gramíneas forrajeras tropicales cultivadas en el trópico húmedo del estado de Veracruz	46
Cuadro 1. Temperatura media diaria y lluvia total en cada ciclo de cosecha	38
Cuadro 2. Niveles de significancia para los efectos del modelo empleado para analizar la varianza de los parámetros del modelo de Krishnamoorthy	42
Cuadro 3. Medias de los parámetros del modelo de Krishnamoorthy para los efectos principales de ciclo de cosecha, edad de rebrote y gramínea, con las correspondientes comparaciones entre medias	43



## RESUMEN

SÁNCHEZ MORA JAQUELINE. Producción De Gas *In Vitro* De Diez Gramíneas Forrajeras Tropicales (bajo la dirección de: PhD Epigmenio Castillo Gallegos y PhD Julieta G. Estrada Flores).

El ganado del trópico mexicano, tiene como principal fuente de nutrientes praderas donde predominan gramíneas nativas, que generalmente, producen poco forraje y la producción es altamente estacional: abundante en lluvias y escasa en invierno y sequía. Una alternativa viable es emplear gramíneas introducidas que ayuden a disminuir tal estacionalidad. Por lo anterior, se implementó un experimento con el objetivo de identificar de entre 10 gramíneas introducidas al menos una con potencial productivo superior. El objetivo específico fue evaluar la cinética de fermentación ruminal por medio de la producción de gas *in vitro*, a través de la técnica de Menke y Steingas (1988) modificada por Mauricio *et al.* (1999). Los análisis de laboratorio iniciaron en diciembre 2010, concluyendo en febrero, 2011. Se trabajó con 200 muestras de forraje seco y molido provenientes de 10 gramíneas cosechadas a 4 edades de rebrote (3, 6, 9 y 12 semanas) en 5 ciclos de corte (sequía 2008, lluvias 2008, nortes 2009, lluvias 2009 y nortes 2010), las cuales se analizaron por triplicado. Por la poca cantidad de muestra disponible, se decidió formar una sola muestra a partir de las tres repeticiones de campo. Se midió el volumen de gas acumulado a los tiempos de incubación de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 16, 20, 24, 36, 48, 72 y 96 h, empleando un transductor de presión. Los datos se ajustaron a la ecuación exponencial de Krishnamoorthy *et al.* (1991).  $y = b(1 - e^{-c(x - L)})$  donde: y es la cantidad acumulada de gas (ml) al tiempo x, b es la

máxima cantidad acumulada de gas (ml),  $x \rightarrow$ , e es la base de los logaritmos naturales, c es la tasa de producción de gas (fracción/h), x es el tiempo de incubación *in vitro* (h) y L, es el tiempo de retardo (h). Debido a la ausencia de repeticiones, no existieron grados de libertad para realizar un análisis de varianza convencional. Sin embargo, el modelo incluyó los efectos principales de ciclo de corte (C), gramínea (G), edad de rebrote (E) e interacciones dobles entre estos: CxG, CxE, GxE, empleándose la interacción triple (CxGxE) como error experimental para probar dichos efectos sobre las variables de respuesta b, c, L.

El presente estudio no permitió observar diferencias entre las 10 gramíneas debido a que las curvas de producción de gas se comportaron muy similares entre sí. Al parecer la causa principal de dicho comportamiento fue la similitud en composición química en particular el contenido de FDN y grado de lignificación.

## INTRODUCCIÓN

El ganado bovino que se cría en el trópico húmedo mexicano tiene como principal fuente de nutrientes al forraje que cosecha al pastar, principalmente praderas donde predominan gramíneas nativas, las cuales están bien adaptadas a los distintos tipos de suelos poco fértiles que se encuentran en regiones tropicales, pero por lo mismo producen poco forraje y la producción es altamente estacional, con abundancia en la época de lluvias y escasez en la época crítica de nortes (invierno).

Como alternativa para incrementar la producción forrajera está el uso de gramíneas introducidas, originarias de África, seleccionadas para adaptarse a suelos ácidos e infértiles y que presentan mayor producción de forraje que las gramíneas nativas. Entre estas, se tienen a los pastos del género *Brachiaria* spp: Insurgente (*B. brizantha*), Señal (*B. decumbens*), Chetumal (*B. humidicola*) y Mulato 1 (híbrido de *B. brizantha* x *B. ruziziensis*), y de la especie *Panicum máximum* como: Guinea, Mombasa y Tanzania; además de otros como Taiwán (*Pennisetum purpureum*) y Kinggrass cubano y morado (*P. purpureum* x *P. typhoides*)

Estas gramíneas se han establecido en algunos ranchos ganaderos. Sin embargo, se desconoce su calidad nutritiva y cómo se ven afectadas por la edad de rebrote y la época del año.

El desempeño productivo del rumiante en pastoreo está en función del valor nutricional de su dieta, y de la cantidad consumida de la misma.<sup>1,2</sup>

La determinación del valor nutricional puede realizarse con las técnicas *in vivo*, *in situ* e *in vitro*. La determinación *in vivo* de la digestibilidad del alimento por los rumiantes es lenta y consume mucho tiempo y recursos. Por esto, se desarrollaron diferentes técnicas *in vitro* para evaluar la digestibilidad, como son las de Tilley y Terry<sup>3</sup>, o bien *in situ* como la de la “bolsa de nylon” de Orskov *et al.*<sup>4</sup> y recientemente la de producción de gas *in vitro* de Menke y Steingass<sup>5, 6</sup>. Esta última tiene como ventaja sobre las primeras en que es más rápida, barata y de alta repetibilidad<sup>7</sup>. Además de ser usada como medida de la degradación ruminal de los alimentos es también indicador del consumo de MS digerible.

Menke y Steingass<sup>5</sup> Investigadores alemanes de la Universidad de Hohenheim, fueron los primeros en llevar a cabo experimentos de fermentación en jeringas de vidrio, de tal manera que se pudiera medir visualmente el volumen de gas producido hasta las 24 horas, el cual se combina con la concentración de proteína cruda y grasa cruda para predecir el contenido de energía metabolizable, con mayor precisión que las otras técnicas<sup>8</sup>. A través de los años, la medición ha mejorado en rapidez y precisión mediante la automatización electrónica.

La técnica de producción de gas *in vitro*, se ha utilizado para determinar el valor nutritivo de los forrajes en función a la cantidad de gas liberado, básicamente CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, ácidos grasos volátiles, al incubar *in vitro* una muestra de alimento con líquido ruminal con pH amortiguado, que es directamente proporcional a la digestibilidad o

la degradación del sustrato y por lo tanto, al contenido de energía metabolizable del alimento.<sup>9</sup>

## **I. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **1.1. Indicadores de calidad en plantas forrajeras**

A continuación se mencionan algunos de los métodos más utilizados para determinar la calidad de las plantas forrajeras.

#### **1.1.1. Fracciones de fibra de Van Soest**

La digestibilidad de todos los materiales está dada en función de la composición celular y, más precisamente, de la composición química de cada forraje en estudio. Las células de las plantas se dividen en dos partes conocidas como contenido celular y otra la pared celular. El contenido celular posee una digestibilidad casi total, siendo en promedio del 98%, (ácidos nucleicos, aminoácidos, proteínas), azúcares, almidón y lípidos. En contraste, la pared celular está formada por material menos digestible llamado fibra, el cual consta de celulosa, hemicelulosa, y lignina.

La hemicelulosa, celulosa y lignina forman la FDN (Figura 1), mientras que la celulosa y la lignina constituyen la FDA.<sup>10</sup>

Los análisis que se utilizan en la actualidad corresponden al método propuesto en 1964 por Peter Van Soest de la Universidad de Cornell. Dicho método es el más usado para el caso de forrajes utilizados por rumiantes, ya que cuenta con dos

componentes fundamentales de la planta que son contenido celular y pared celular.<sup>11</sup>

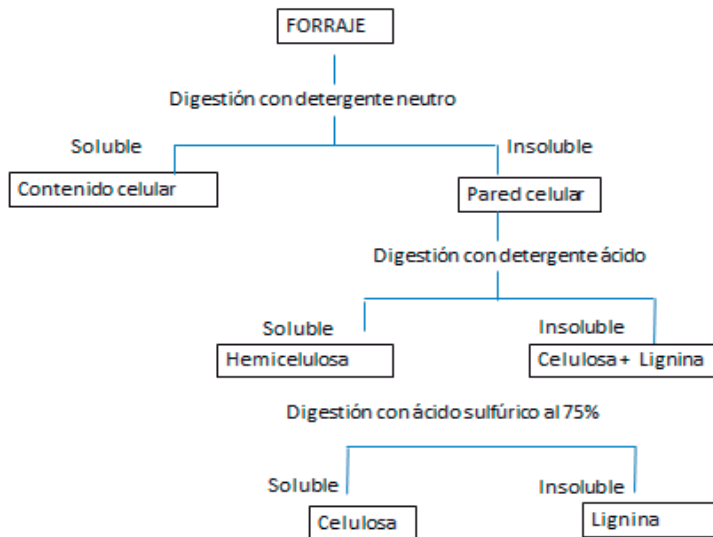


Figura 1. Esquema de análisis del sistema Van Soest.<sup>11</sup>

Este análisis es análogo a la digestión de la fibra por el rumiante, donde primero pasa por una digestión en medio neutro en el rumen (fibra por detergente neutro, FDN), seguida de una digestión en medio ácido que ocurre en el abomaso (fibra por detergente ácido, FDA).

La FDN es el residuo que queda tras ebullición de la muestra con una solución neutra (pH= 7) de lauril sulfato sódico y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). El proceso separa la mayoría de los componentes de la pared celular, como son: celulosa, hemicelulosa y lignina, pero también se extraen proteínas, minerales y cutina. Se le puede considerar una medida del contenido de pared celular.<sup>11</sup>

Al residuo obtenido después de tratar la muestra con la solución detergente en medio neutro, se le añade una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 M y bromuro de

acetiltrimetilamonio y se hierve de nuevo. El resultado es, esencialmente, fracciones crudas de lignina y celulosa, aunque también incluye lignina, cutina y sílice<sup>12</sup>, en tanto que la fracción soluble incluye primariamente hemicelulosa y proteína de la pared celular. La FDA es principalmente usada como un indicador rápido del contenido de fibra del alimento.

El contenido de FDN se relaciona más al consumo del alimento, pues posee todos los componentes de fibra que ocupan espacio en el rumen. Por otro lado, el contenido de FDA es mejor indicador de la digestibilidad del forraje, debido a su alto contenido de lignina, correlacionándose esta como indicador de baja digestibilidad del forraje. La FDN siempre será más alta que la FDA, ya que esta última no contiene hemicelulosa.<sup>11, 12</sup>

### **1.1.2. El método ANKOM para determinar componentes de pared celular**

Este método fue ideado por Komarek<sup>13</sup> y su intención es proveer un sistema de determinación de FDN, FDA y fibra cruda que sea rápido, de bajo costo y que se puedan analizar gran número de muestras por corrida.

Fay *et al.*<sup>14</sup> compararon el procedimiento tradicional de Van Soest que usa crisoles filtrantes (CF) con el procedimiento semiautomatizado ANKOM<sup>13</sup> que emplea bolsas filtrantes (BF), para determinar los contenidos de FDN y FDA de nueve alimentos para rumiantes empleados con más frecuencia en la región templada de Argentina, que fueron: harina de soya por extrusión, alfalfa (*Medicago sativa*), ensilaje de pastura, pasto llorón (*Eragrostis curvula*), pasto trigo alto (*Triticum sp*),

pasto guinea (*Panicum máximum*) y cebadilla (*Hordeum* sp). Se llevaron a cabo cuatro corridas por técnica y alimento. La prueba de 't' para muestras pareadas no mostró diferencias ( $P>0.01$ ) entre técnicas. La variabilidad entre corridas fue mayor para la técnica tradicional, con respecto a la ANKOM, cuyas desviaciones estándar respectivas fueron: 0.71 y 0.39 para FDN, y de 0.83 vs 0.56 para FDA. Las regresiones lineales  $CF = 1.43 + 0.95*BF$ ,  $R^2 = 0.99$  para FDN y  $CF = 0.53 + 0.98*BF$ ,  $R^2 = 0.99$  para FDA, indicaron una relación lineal altamente significativa ( $P<0.01$ ) entre ambas técnicas. Se concluyó que al analizar los alimentos arriba citados, el procedimiento ANKOM dio resultados comparables a los de la técnica tradicional.

Berchielli *et al.*<sup>15</sup> compararon los valores de FDN y FDA obtenidos de manera tradicional con aquellos obtenidos con el procedimiento ANKOM, analizando cinco materiales distintos: Caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), pasto Insurgente (*Brachiaria brizantha*), ensilaje de sorgo (*Sorghum vulgare*), pulpa cítrica (*Citrus* spp.) y heces de bovino (*Bos indicus*), con tres repeticiones cada uno. No encontraron diferencias entre los valores obtenidos con el método convencional y el método ANKOM, excepto para la pulpa de cítricos cuya media para el método ANKOM fue inferior a la obtenida por el método convencional.

### **1.1.3. Proteína cruda (PC)**

En realidad, el método de Kjeldahl determina el contenido de nitrógeno total de la muestra, y ya que en general, las proteínas contienen aproximadamente el 16%



de nitrógeno, el contenido de N se multiplica por el factor 6.25 para calcular el contenido de proteína cruda.<sup>16</sup>

El término “cruda” se refiere a que no todo el nitrógeno en el alimento está en forma de proteína, y en los forrajes, sus concentraciones varían de menos de 5% (residuos cosecha) hasta más de 20% (leguminosas de buena calidad). Si el forraje permanece suficiente tiempo en el rumen, la mayor parte de la proteína es desdoblada por las bacterias ruminales.

En aminoácidos que adicionalmente son desdoblados para formar amoniaco, el cual es utilizado por los microbios para producir su propia proteína.

El nitrógeno no proteico es 100% degradable en rumen. El exceso de amoniaco derivado del NNP es absorbido por el rumen para llevarlo, vía sanguínea, al hígado, para transformarlo en urea que es excretada en la orina.

Las bacterias ruminales ingresan constantemente al abomaso en donde son digeridas y absorbidas; la proteína bacteriana constituye así, la mayor parte de la proteína aprovechada por el bovino.<sup>17</sup>

Las gramíneas cuyos resultados de producción de gas se informan en esta tesis, presentan contenidos variables de proteína cruda. Por ejemplo: en *Brachiaria* ssp: Chetumal contiene del 6 al 8%<sup>18</sup>, Chontalpo a los 30 días contiene 10% y a los 90 días 5%<sup>19</sup>, Insurgente contiene 7 y 14 %<sup>19</sup> y Mulato 1 del 12 al 15%<sup>18</sup>. En *Panicum máximum* se han informado valores de 10 al 13% del pasto Mombasa<sup>20</sup>, en tanto que en pasto Guinea y Tanzania se han informado promedios respectivos de 8.3 y

9.1% <sup>21</sup>. Por otro lado, para *Pennisetum* spp: se han informado valores de 12% para kinggrass morado y del, 7 al 10% para Taiwan.<sup>22</sup>

En general se requiere aproximadamente un nivel entre el 6 y 8% de proteína cruda para mantener activos los microorganismos del rumen y no se deprima el consumo voluntario y la digestibilidad.<sup>11</sup>

#### **1.1.4. Digestibilidad *in situ* ó *in sacco***

La técnica de incubación *in situ* fue inicialmente utilizada por Quin *et al.* <sup>23</sup>, también llamada técnica *in sacco* o técnica de la bolsa de nylon, para estudiar la digestibilidad o desaparición de los alimentos en el rumen. Esta ganó una gran aceptación para medir la digestibilidad aparente de la materia seca, fibra, nitrógeno, predecir la digestibilidad de los nutrimentos en el tracto digestivo, y la digestibilidad de varios sistemas de alimentación, debido principalmente a que es una manera rápida de medir la proporción en los constituyentes de alimento degradados en el rumen.<sup>24</sup>

Se usaron bolsas cilíndricas de seda muy fina para medir la digestión de varios alimentos en el rumen de ovejas. Posteriormente, la seda se reemplazó por materiales sintéticos totalmente resistentes a la degradación ruminal. Después se utilizaron bolsas de poliéster y Orskov *et al.* <sup>4</sup> sugirieron la utilización de bolsas de nylon. Actualmente se utilizan bolsas de dacrón, más baratas y de bajo contenido de nitrógeno.

#### **1.1.4.1. Descripción de la técnica *in situ***

La técnica consiste en colocar de 4 a 6 g de muestra dentro de una bolsa y colocarla en el rumen de animales fistulados en rumen (bovino u ovino), por cierto periodo de tiempo, lo que permite determinar simultáneamente la cantidad de muestra digerida y la velocidad o tasa a la cual la digestión procede.

Por otro lado permite mantener constantes las condiciones ruminales y variar los substratos incubados, o variar las condiciones ruminales incubando materiales conocidos (estándares) para determinar el efecto del cambio en el ambiente ruminal, sobre la tasa y potencial de degradación de los alimentos.

Una desventaja del método *in situ* es la falta de uniformidad con que los investigadores la han usado.

La acumulación de gas dentro de la bolsa puede afectar la digestibilidad *in situ*, ya que puede causar que las bolsas floten, impidiendo su libre movimiento dentro del rumen y limitando cualquier acción mecánica causada por los movimientos ruminales. También puede reducir el flujo de líquido ruminal a la bolsa y la entrada de sustancias y microorganismos para digerir el alimento.<sup>25</sup>

La producción de gas es subproducto de la fermentación microbiana y su acumulación puede inhibir el metabolismo microbiano. Las bolsas con poro grande tienden a favorecer la acumulación de gas.<sup>24</sup> Se sugiere que el tamaño óptimo del poro era de 30 y 50 $\mu$ , dado el grosor de las fibras puede variar, y poros más pequeños retardan la entrada de microorganismos e impiden alcanzar una

fermentación óptima, mientras que poros más grandes permiten la entrada de partículas lignificadas pequeñas que distorsionan los resultados.<sup>25</sup>

#### **1.1.4.2. Producción de gas *in vitro***

La técnica de producción de gas es un método *in vitro* que permite determinar la extensión y la cinética de degradación del alimento a partir del volumen de gas producido durante el proceso fermentativo.<sup>26</sup>

Rymer *et al.*<sup>27</sup> indicaron que, quienes primero propusieron y desarrollaron el principio para la determinación de la degradación/fermentación ruminal potencial de los alimentos por la medición del gas producido en cultivos en serie fueron McBee y Hungate. Posteriormente se han hecho adaptaciones y modificaciones a la técnica.<sup>28</sup>

En 1979 se propuso y desarrolló la “prueba de gas Höhenheim” en Alemania, que combina el volumen de gas producido después de 24 h, con las concentraciones de proteína cruda, fibra cruda y cenizas del alimento para estimar la energía metabolizable. Por otra parte, investigadores del Instituto de Investigación en Pastizales y Ambiente (IGER por sus siglas en inglés) del Reino Unido, proponen y desarrollan la técnica de la medición manual de la presión usando un transductor de presión manual, el cual utiliza frascos de vidrio. Las lecturas se realizan a intervalos regulares de 3 ó 4 horas las primeras 24 horas, y después frecuentemente hasta las 120 ó 144 h. A partir del gas acumulado es posible representar matemáticamente la cinética de fermentación de forrajes individuales.

Se han utilizado diferentes modelos para describir la cinética de producción de gas en forrajes tropicales, cómo el de Gompertz el cual es adecuado para describir las características de fermentación de los sustratos con tasas de producción de gas rápidas en las primeras horas de incubación y con tasas lentas en la fase asintótica.<sup>29</sup>

En general, las curvas de producción de gas presentan forma sigmoideal y en ellas pueden ser distinguidas tres fases: inicial de lenta producción de gas, exponencial de rápida producción de gas y asintótica donde existe una lenta y casi nula producción de gas.<sup>29</sup>

Actualmente la producción de gas puede cuantificarse por sistemas totalmente automatizados y por sistemas parcialmente automatizados donde las lecturas se realizan manualmente, usando transductores de presión conectados a un voltímetro digital, y una jeringa ensamblada que permita medir el volumen de gases producido en la lectura de la presión respectiva.

El principio fundamental de la técnica es que la cantidad de gas liberada, cuando una muestra de alimento es incubada *in vitro* con líquido ruminal, es directamente proporcional a la digestibilidad ó a la degradación del sustrato y por lo tanto, al valor energético de la muestra. El gas producido está formado básicamente de CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, así como también de ácidos grasos volátiles.<sup>27</sup>

La producción de gas *in vitro*, permite complementar y hacer más precisa la información nutricional que la que se obtiene, solamente, a partir de análisis convencionales. Al igual que otras técnicas de bioensayo, esta técnica emplea

sustratos molidos, medio anaeróbico, temperatura de 39°C e inóculo ruminal. La técnica puede medir el volumen de gas a presión atmosférica constante, la presión de gas a un volumen fijo, ó combinar ambos procedimientos.<sup>6</sup>

La cantidad de material requerido para evaluar la cinética varía desde 0.1 g a 1.0 g<sup>30</sup>. Si se incrementa el tamaño de la muestra se produce una disminución en la producción de gas por cada g de MS, debido a que se reduce la población de microorganismos en relación a la cantidad de sustrato o bien a que se agota la capacidad tampón del sistema. El CO<sub>2</sub> usado al preparar el medio, sirve para asegurar un bajo potencial redox al momento de la inoculación, ya que la ausencia de la anaerobiosis resulta en pérdida de bacterias celulolíticas y amilolíticas.

El gaseo continuo con CO<sub>2</sub> y los agentes reductores poseen un menor tiempo de colonización y una más rápida digestión de la FDN.<sup>30</sup>

La determinación de la producción de gas *in vitro* es importante porque proporciona al nutricionista información sobre la cinética de la fermentación de los alimentos consumidos por los rumiantes, la cual depende del tiempo de residencia del alimento en el rumen y de su tasa de degradación.<sup>31</sup>

Una de las principales ventajas es que permite obtener una descripción dinámica del valor nutritivo de forrajes de manera altamente reproducible y a bajo costo. No obstante, su principal desventaja es la falta de uniformidad en las metodologías empleadas en los distintos laboratorios, lo que dificulta la comparación de resultados entre grupos de investigación<sup>30</sup>. Tal falta de uniformidad proviene del efecto de diferentes procedimientos realizados durante la incubación, como: dejar

escapar ó no el gas después de medir su producción ("ventilado"); cambio en presión atmosférica por efecto de altitud; agitación ó no de las botellas fermentadoras; tamaño de la muestra; tipo de inóculo; uso ó no de blancos; y, composición del medio de cultivo.

Por otro lado, la cantidad de gas producido depende de la cantidad y proporción molar de los AGV producidos. Los patrones de fermentación que incrementan la proporción de ácidos butírico y acético y disminuyen la de propiónico, pueden resultar en un incremento en el volumen de gas. Contrariamente, cambios en la estequiometría de las reacciones que aumenten la proporción de propiónico a expensas de butírico y acético, resultarían en menor producción de gas, por lo que la proporción molar de AGV debe ser considerada al comparar perfiles de producción de gas provenientes de diferentes sustratos.<sup>32</sup>

## **1.2. Valor nutricional de gramíneas forrajeras tropicales**

La calidad nutricia del forraje es el producto de su valor nutritivo, o concentración de nutrientes, por el consumo de materia seca, y determina el consumo de nutrientes, del cual depende la ganancia de peso o producción de leche individual del animal<sup>33</sup>. La cantidad de forraje que ingiere el ganado en pastoreo, es quizás el factor de mayor importancia para determinar su valor nutritivo.<sup>34, 35</sup>

El valor nutritivo de los forrajes es la capacidad de los pastos para garantizar o no las exigencias nutritivas de los animales para el mantenimiento, crecimiento y reproducción. Este valor nutritivo de los forrajes no es constante, ya que está influenciado por la digestibilidad del alimento y la cantidad consumida por el

individuo, lo que altera la cantidad y proporciones relativas de nutrientes absorbidos.

Un forraje será de buena calidad cuando cumpla con las condiciones de poseer todos los nutrientes esenciales en proporciones balanceadas, ser de alta digestibilidad y ser palatable al animal.

El valor nutritivo de los alimentos no se puede evaluar por un solo principio nutritivo sino suministro total de nutrientes que está afectado por tres factores: consumo voluntario de materia seca del forraje, digestibilidad de la materia seca del forraje y la eficiencia con la cual el alimento consumido y dirigido es transformado en productos útiles, siendo este la energía neta.<sup>11, 12</sup>

### **1.3. Gramíneas empleadas en el presente experimento**

Las gramíneas que se evaluaron fueron las que a continuación se describen.

#### **1.3.1. *Panicum maximum***

El género *Panicum* (tribu Paniceae) está constituido por aproximadamente 350 especies distribuidas en zonas tropicales y templadas. Los cultivares comerciales recientes Mombasa y Tanzania, son híbridos intra-específicos desarrollados por Savidan *et al.*<sup>36</sup> en EMBRAPA, Campo Grande, Brasil.

##### **1.3.1.1. Cultivar Mombasa**

Fue colectado próximo a Korrogwe en Tanzania, en 1967. Está siendo evaluado en Brasil, Colombia, México y Cuba. Es una planta cespitosa con altura media de



1.65 m, sus hojas son quebradizas, sin cera, con una anchura de 3.0 cm. Los tallos presentan poco pelo, siendo duros y cortos, principalmente en la fase superior. Sus vainas son glabras.

Los tallos son ligeramente rojizos. La inflorescencia es una panícula con ramificaciones las primeras largas y las segundas largas apenas sobre la base. Las espigas son glabras, uniformemente distribuidas, son rojizas en aproximadamente 1/3 de la superficie externa.

Produce hasta 30 ton/ha/año de materia seca, contenido de proteína en MS de 10-13%, una digestibilidad del 55%. Tolera carga animal en época de lluvias de 3 a 6 cabezas/ha, y en secas: 2 a 4 cabezas/ha.<sup>20</sup>



### 1.3.1.2. Cultivar Guinea o privilegio

El pasto Guinea es originario de África tropical y subtropical<sup>36</sup>. Es perenne, de crecimiento amacollado, a menudo con rizomas y puede alcanzar hasta tres metros de altura. Se reproduce tanto por material vegetativo como por semilla sexual.<sup>35</sup>

Se adapta bien desde el nivel del mar hasta los 2,500 msnm, con precipitación superior a 1,000 mm anuales y temperaturas medias de 19.1 a 22.9 °C<sup>34,36</sup>. Crece en una amplia gama de suelos de mediana a alta fertilidad, es resistente al fuego y a la sequía debido a su amplio y profundo sistema radicular, pero no tolera condiciones de inundación, salinidad y pastoreo intensivo. Presenta alta producción de forraje, con rendimientos de 27 ton/MS/ha con intervalos de cosecha de 40 días.<sup>21, 35</sup>

El pasto Guinea es utilizado para pastoreo, y ensilaje<sup>35, 37, 38</sup>. Vicente- Chandler *et al*<sup>21</sup> informaron de valores promedio de 8.3% de PC y 37.7% de FDA, para cinco gramíneas tropicales (congo, napier, Guinea, pangola y estrella), bien abonadas y cosechadas a los 60 días de crecimiento. González *et al.*<sup>39</sup> mencionaron que el pasto Guinea en floración presentó 7.8% de PC, 30.6% de fibra bruta, 8.3% de cenizas, 2.3% de extracto etéreo y 40.8% de elementos libres de nitrógeno.



### 1.3.1.3. Cultivar Tanzania

Fue colectado en 1969 en Korroqwe, Tanzania. Se ha evaluado en Brasil, México, Cuba y Colombia.

Es un pasto cespitoso, con una altura promedio de 1.30 metros, y las hojas decumbentes con un ancho promedio de 2.6 cm. Tanto tallos como vainas de las hojas son glabros, no cerosos. Los tallos son ligeramente rojizos.

Las inflorescencias son panículas con ramas largas en el primero y segundo nudos. Las espiguillas son de color púrpura, uniformemente distribuidas. Crece desde el nivel del mar hasta los 1,800 msnm, con precipitaciones de más de 600 mm.

En Campo Grande, Brasil, la producción de forraje de hojas fue de 133 ton/ha/año de materia verde y 26 ton/ha/año de materia seca. Responde bien en suelos

fértiles y sin problemas de salinidad, pero requiere buen drenaje. Se caracteriza por poseer una alta producción de forraje, del total de la planta el 80% son hojas. Produce hasta 26 ton/ha/año de materia seca, y la planta completa contiene 9.1% de proteína cruda.



### **1.3.2. *Brachiaria* spp**

En la actualidad *Brachiaria* es el género de gramínea que más se emplea como forraje en el trópico, especialmente en América Central y América del Sur.

#### **1.3.2.1. Chetumal (*Brachiaria humidicola*)**

La gramínea *Brachiaria humidicola* conocida en México como pasto Chetumal, es originaria de África Oriental y Sur Oriental. Es lenta para establecerse; presenta baja calidad nutritiva, además de problemas de germinación de la semilla por

latencia prolongada. Su ciclo de vida es perenne, con fuerte hábito de crecimiento estolonífero. Los entrenudos son glabros y verde claro; las vainas de las hojas carecen de vellosidades en la lámina, que tiene de 10 a 30 cm de longitud, y son de verde intenso. La inflorescencia es terminal y racimosa <sup>18</sup>. Crece bien en zonas tropicales desde el nivel del mar hasta 1800 msnm, con precipitaciones de 1000 a 4000 mm por año; se comporta bien en un rango amplio de fertilidad, textura y acidez del suelo. Soporta suelos encharcados y crece muy bien en laderas. Produce de 10 a 13 toneladas de MS/ha/año, contiene de 6% a 8% de proteína cruda, y 50 a 56% de digestibilidad. <sup>18</sup>



### **1.3.2.2. Señal o Chontalpo (*Brachiaria decumbens*)**

Es una planta herbácea perenne, semidecumbente a decumbente y rizomatosa. Sus tallos producen raíces en los entrenudos al entrar en contacto con el suelo. Las láminas de las hojas miden de 20 a 40 cm de longitud, son de color verde oscuro y presenta vellosidades. En zonas tropicales, crece desde el nivel del mar hasta 1800 msnm, en áreas con precipitaciones entre 1000 y 3500 mm al año y temperaturas por encima de los 19 °C. Crece muy bien en regiones de baja fertilidad con sequías prolongadas, se recupera rápidamente después del pastoreo, compite bien con las malezas, no crece en zonas mal drenadas. Es una especie que se adapta bien a suelos de baja fertilidad, responde a la aplicación de P y N; es necesario realizar fertilizaciones de mantenimiento cada dos o tres años de uso. La productividad de MS depende de las condiciones climáticas, época del año y fertilidad del suelo. Durante todo el periodo de lluvias alcanza hasta 6 ton/MS/ha, reduciéndose hasta un 70% en época de secas. El contenido de PC disminuye rápidamente con la edad del pasto de 10% a los 30 días a 5% a los 90 días.<sup>19</sup>



### 1.3.2.3. Insurgente (*Brachiaria brizantha*)

Es originario de África tropical. Fue introducido a México, proveniente de Brasil, en 1984 por el programa de forrajes del INIFAP. Es una planta de crecimiento erecto y sus hojas pueden tener vellosidades. Las plantas amacolladas, robustas y perennes, pueden llegar a tener una altura de hasta 2 m. Sus hojas son lineales y lanceoladas de unos 40 cm de longitud. La inflorescencia tiene forma de espiga unilateral, con una panícula de 2 a 8 racimos erectos. Su rango de adaptación va del nivel del mar hasta los 1300 msnm, con buen desarrollo en diferentes tipos de suelo. Se recomienda establecerlo en suelos bien drenados, siendo tolerante a la sequía. El contenido de PC y digestibilidad *in vitro* de la materia seca a las 6 semanas de rebrote es de 11% y 65% respectivamente, con producción anual entre 8 y 20 ton/MS/ha, lo que permite soportar una carga animal alta. El contenido de PC en praderas bien manejadas está entre 7 y 14%, y la

digestibilidad entre 55-77%. Se asocia bien con leguminosas de los géneros *Arachis*, *Desmodium*, *Pueraria* y *Centrosema*.<sup>19</sup>



#### 1.3.2.4. Mulato I (*Brachiaria brizantha* x *Brachiaria ruziziensis*)

El pasto Mulato (CIAT 36061), es un híbrido del cruce número 625 (*Brachiaria brizantha* CIAT x *Brachiaria ruziziensis*. Clon 44-6) obtenido por el programa de mejoramiento genético del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

Es una gramínea perenne que se puede desarrollar tanto en regiones húmedas como en subhúmedas. Es decumbente, estolonífero y cespitoso. Los tallos son de color verde intenso, con abundante pubescencia. Las hojas lanceoladas de color verde intenso tienen de 15 a 20 cm de largo, presentando gran pubescencia. Las plantas son vigorosas y con buen amacollamiento. Requiere suelos de buen drenaje, pH de 4.5 a 8.0, precipitaciones de 1000 a 3500 mm anuales,



prosperando de 0 a 1800 msnm. Su rendimiento alcanza hasta 25 ton/ha/año de MS, con 12 a 15% de proteína cruda y digestibilidad entre 55 y 62%.<sup>18</sup>



### 1.3.3. *Pennisetum* spp

Las gramíneas tropicales erectas son reconocidas por acumular altas cantidades de biomasa, debido a su mayor eficiencia en la captación y conversión de energía solar. El *Pennisetum purpureum* cuyo cultivar más representativo es el pasto elefante, es una de las especies forrajeras que mejor expresan las características antes mencionadas. Sin embargo, al mismo tiempo que acumulan biomasa, sus tejidos sufren modificaciones de naturaleza anatómica y química que modifican su estructura, implicando una reducción en la tasa de pasaje y en la digestibilidad por el rumiante.<sup>40</sup>

### 1.3.3.1 King grass morado (*P. purpureum* x *P. typhoides*)

Su origen se encuentra en África del sur es robusto, vigoroso y perenne, por lo que ha sido introducido en todas las regiones tropicales y subtropicales, alcanza una altura de 3 m, pero con tallos y hojas muy delgadas, sus raíces forman cepas muy compactas y sólidas que pueden alcanzar hasta 2 m de profundidad. Su inflorescencia es compacta y cilíndrica, de 12 a 15 cm de largo.

Gramínea adaptada a condiciones tropicales y hasta alturas de 1000 a 1500 msnm, pero con precipitación no menor a 1000 mm anuales. Muestra una gran capacidad de rebrote cuando se inician las lluvias. Se adapta a suelos fértiles y francos, neutros o ligeramente ácidos, con buen drenaje. Es muy susceptible al exceso de humedad.<sup>39</sup>

La producción de materia verde en hoja es de 24.4 t/ha y la proteína cruda en hojas de 6.67%.<sup>22</sup>



### 1.3.3.2 Taiwán (*Pennisetum purpureum*)

Especie perenne, crece de 2-3 m, sus hojas van de 30 a 70 cm de largo, forma macollas y tiene rizomas. Su crecimiento va de 0 hasta 2200 msnm y su óptimo desarrollo es a los 1500 msnm, crece a temperaturas de 18 a 30°C con un óptimo a los 24°C. Se comporta muy bien en suelos ácidos a neutros, resiste sequías y humedades altas y una precipitación entre 800 y 4000 mm anuales.

Su establecimiento es por medio de cepas y tallos maduros. Las semillas de las especies de *Pennisetum* tienen muy baja viabilidad (< 10%), requiere control de malezas en el periodo de establecimiento. Para mantener su calidad se necesitan cortes frecuentes a ras de suelo normalmente cada 50 a 70 días, cuando su altura va de 1 a 1.2 m. Se le debe fertilizar después de cada corte, para mantener su productividad.<sup>41</sup>

La producción de materia verde en hoja es de 23.9 t/ha, y el porcentaje de proteína cruda en hojas es de 7.29%.<sup>22</sup>



### **1.3.3.3. King grass cubano CT-115 (*P. purpureum* x *P. typhoides*)**

Es una planta forrajera obtenida a partir del King grass en los laboratorios del Instituto de Ciencia Animal, de la Universidad de la Habana Cuba, por cultivo de tejidos.

Es de alta talla con altura próxima a los 3 m. Se caracteriza por tener crecimiento erecto, hojas largas y anchas con abundante vello. Se adapta preferiblemente a climas cálidos templado- cálidos, desde el nivel del mar hasta los 1800 msnm.<sup>42</sup>

Este clon se ha utilizado en la producción de forraje en pie y pastoreo directo por sus características promisorias, pues se puede almacenar como forraje en la época de seca, ya que aún a los 4 a 6 meses de edad presenta una aceptable calidad y mayor valor nutritivo que otros alimentos preservados o cultivados para este fin.<sup>41</sup>

Una de las características principales de este pasto es que su distancia entre nudos es pequeña, tiene mayor número de hijatos por planta, y su contenido de azúcares es alto. Es de porte bajo, por su menor distancia entre nudos, tiende a tener mejor relación hoja/tallo al acortarse los nudos, florece muy poco. Es una planta que responde bien después del pastoreo.<sup>41</sup>

Su producción por unidad de área de cultivo o rendimiento de cosecha según la región y época del año entre 70 y 120 toneladas de pasto fresco por ha, y en casos extremos puede llegar a producir hasta 200 toneladas por ha.<sup>42</sup>



#### 1.4. Efecto del clima tropical en la calidad del forraje

El desarrollo, velocidad de crecimiento, así como la producción de materia seca de las plantas forrajeras dependerá de la cantidad de lluvia que cae, ó mejor dicho, del agua aprovechable contenida en el suelo, además de la temperatura ambiental. Estos factores pueden a su vez causar diferencias en la digestibilidad de la materia seca de los forrajes<sup>42</sup>, así como en su composición química.

En una investigación clásica Deinum y Dirven<sup>44</sup>, sometieron al pasto congo (*Brachiaria ruziziensis*), cultivado en macetas en invernadero, a combinaciones de

distintos niveles de intensidad lumínica y de temperatura ambiental y los cosecharon a 2, 3, 4 y 5 semanas de edad. Los aumentos en edad de la planta, intensidad lumínica y temperatura, incrementaron significativamente la producción de materia seca y su contenido de fibra cruda, en tanto que disminuyeron significativamente los contenidos de nitrógeno orgánico y carbohidratos solubles en agua. En estudios realizados por ellos mismos con gramíneas templadas, obtuvieron resultados semejantes<sup>45, 46</sup> concluyendo que las altas temperaturas de las áreas tropicales serían la principal causa de la pobre calidad de las gramíneas tropicales.

Ford *et al.*<sup>47</sup> estudiaron 13 gramíneas tropicales y 11 templadas que cultivaron en ambiente controlado con temperaturas diurnas/nocturnas de 21/13, 27/19 y 32/24°C. Emplearon la quinta hoja principal de cada planta, cosechada dos días después que el tallo principal alcanzara su longitud máxima, para obtener preparaciones de fibra por detergente neutro (FDN).

Estos autores encontraron que el contenido de FDN, corregido por almidón y proteína, decreció al aumentar la temperatura en especies tropicales, en tanto que en las especies templadas la FDN aumentó.

En las gramíneas tropicales, el decremento en FDN se debió a un contenido menor de celulosa, mientras que los contenidos de hemicelulosa y lignina tendieron a incrementarse con el aumento de temperatura. En las gramíneas templadas, los niveles de celulosa, hemicelulosa y lignina mostraron un incremento consistente con el aumento de temperatura. En las gramíneas

tropicales, hubo una correlación negativa altamente significativa de la lignina con la digestibilidad *in vitro*, en cada una de las temperaturas, y la lignina se asoció más fuertemente a hemicelulosa que a celulosa. En contraste, en las gramíneas templadas, la lignina no se correlacionó a la digestibilidad *in vitro* en ninguna temperatura.

En Sud África, Dugmore y Nsalahi <sup>48</sup> estudiaron el efecto del ambiente sobre la digestibilidad *in vivo* de la materia seca (DMS, %) y el consumo voluntario de forraje (CVF, kg MS/100 kg PV) de pasto kikuyo (*Pennisetum clandestinum*) que se obtuvieron respectivamente a partir de 82 pruebas de digestión y 38 de consumo conducidas a lo largo de cinco años. La ecuación de mejor poder predictivo para DMS fue la siguiente:

$$\text{DMS} = 1141.8 - 0.74(L_{\text{fert}}) - 16.6 (T_{\text{fert}}) - 15.6 (E_{-2}); P < 0.001; R^2 = 0.465$$

Donde  $L_{\text{fert}}$  y  $T_{\text{fert}}$  son respectivamente, la lluvia acumulada y la temperatura promedio entre la fertilización y el corte del forraje y  $E_{-2}$  es la evaporación promedio entre las dos semanas previas al corte y la semana en que ocurrió el corte. Con respecto al consumo, la ecuación que mejor lo predijo fue:

$$\text{CVF} = 8.57 - 0.097(T_{-1}) - 0.173(T_{\text{fert}}); P < 0.001; R^2 = 0.497$$

Donde  $T_{-1}$  es la temperatura promedio entre la semana anterior al corte del forraje y la semana del corte y  $T_{\text{fert}}$  ya se definió. Estos autores comentaron que considerando el calentamiento global, es preocupante el efecto depresor que tienen las temperaturas sobre la DMS y el CVF, pues en su estudio, el primero decreció en 4.4% y el segundo en 15% por cada grado centígrado de aumento en

temperatura ambiental. El efecto implícito sobre la producción del ganado bovino en pastoreo sería considerable, pues el rendimiento potencial de leche se reduciría en 36% por grado centígrado de incremento en temperatura.

### **1.5. Efecto de la edad de rebrote sobre la calidad nutritiva**

Las gramíneas tropicales son de rápido crecimiento y maduración. Debido a esto su calidad nutricional también cambia rápidamente, ya que con la edad experimentan modificaciones sensibles y graduales en su composición química. La reducción del contenido de proteína bruta y el incremento de los constituyentes de la pared celular son los principales cambios que presentan, los que influyen directamente en la digestibilidad y en la eficiencia de utilización de los forrajes por parte de los animales.

En estudios realizados con *Pennisetum purpureum* cultivar CUBA CT-115 con el fin de determinar el efecto de la edad de rebrote en su composición química, con cortes a los 28, 56, 84, 112 y 140 d, se encontró que la concentración de MS aumentó con la edad de rebrote pudiendo esto deberse principalmente al incremento en la proporción de pared celular vegetal, siendo también responsables los cambios morfológicos, como la disminución de las láminas foliares y el aumento de los haces vasculares, de la disminución en PB ( $P < 0.001$ ) donde la mayor concentración se presentó a los 28 días (14.89%) y la menor a los 140 días de rebrote (7.78%). Además, con la edad de rebrote se obtuvo un incremento de la concentración de lignina ( $P < 0.001$ ) con valores de 3.22% a los 28 d, hasta 8.55% a los 140d, quizá porque a medida que madura la pared celular



se ensancha. Cabe destacar que *Pennisetum purpureum* presenta mayor contenido de carbohidratos estructurales y desarrollo de su estructura a medida que avanza su edad.<sup>49</sup>

En investigaciones realizadas por Ramírez *et al.*<sup>50</sup> con *Brachiaria* híbrido cv. Mulato a edades de 30, 45, 60 y 75 d de rebrote, en el periodo lluvioso, los porcentajes de proteína, fósforo, digestibilidad de la materia seca y orgánica disminuyeron con la edad, siendo a los 30 d 18.6% de MS y a los 75 d de 23.5% y la digestibilidad de la materia orgánica de 61.3% y 54.2% a los 30 y 75 d respectivamente, siendo los 30 d los mayores valores registrados. Se demostró que en ambas especies disminuyó la proteína y aumentó la fibra bruta, cuando envejeció la planta y que esto puede estar relacionado con la reducción de la síntesis de compuestos proteicos, si se compara con estadios más jóvenes. Además, a una mayor edad disminuye la cantidad de hojas, se incrementa la síntesis de carbohidratos estructurales (celulosa, hemicelulosa y lignina) y disminuye la calidad del pasto, debido a un aumento de la fibra bruta.

## II.JUSTIFICACIÓN

Este estudio se realizó con la finalidad de poder identificar al menos una de 10 gramíneas introducidas en el trópico húmedo del estado de Veracruz en un clima cálido húmedo, valorado este a través de la cantidad y calidad del forraje durante dos años consecutivos, por medio de la técnica de producción de gas *in vitro*. Entre estas especies se tienen los pastos del género *Brachiaria* spp: Insurgente (*B. brizantha*), Señal (*B. decumbens*), Chetumal (*B. humidicola*) y Mulato 1 (híbrido de *B. brizantha* x *B. ruziziensis*), y de la especie *Panicum* máximo como Guinea, Mombasa y Tanzania; además de otros como Taiwán (*Pennisetum purpureum*) y Kingrass cubano y morado (*P. purpureum* x *P. typhoides*).

La técnica de producción de gas que emplea sustratos molidos, medio anaerobio, temperatura de 39°C e inóculo ruminal, permite estimar la cinética de degradación de cada pasto, y por ser altamente precisa y repetible, permitirá identificar entre los diez pastos, aquel con mejor calidad nutritiva.

### III. HIPÓTESIS

Con base en lo ya descrito se propuso la siguiente hipótesis “Al menos una de las gramíneas del genero *Brachiaria* spp: Insurgente (*B.brizantha*), Señal (*B. decumbens*), Chetumal (*B. humidicola*) y Mulato I (hibrido de *B. brizantha* x *B. ruzizensis*) y de la especie *Panicum máximum* como Guinea, Mombasa y Tanzania; además de otros como Taiwán (*Pennisetum purpureum*) Kinggrass cubano y morado (*P. purpureum* x *P. typhoides*) por evaluar tendrá una curva de producción de gas mayor que las demás, por lo tanto, su calidad nutritiva será la mejor”.

### IV. OBJETIVOS

Determinar la calidad nutritiva para saber cuál gramínea será la mejor, que se estimara a partir de la cinética de fermentación por medio de la producción de gas *in vitro*.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Descripción del sitio experimental

El forraje con el que se realizó el experimento aquí descrito, se llevó a cabo en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical (CEIEGT), dependiente de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), ubicado en el km 5.5 de la carretera federal Martínez de la Torre-Tlapacoyan, en el municipio de Tlapacoyan, Veracruz. La altitud promedio es de 112 msnm. El clima está clasificado como tipo Af (m) w (e), cálido y húmedo, sin estación seca definida, que presenta tres épocas climáticas: 1) secas: marzo a junio; 2) lluvias: julio-octubre; y 3) invierno: noviembre-febrero. La temperatura media anual es de 22- 24°C y precipitación pluvial anual de 1900 mm.<sup>51</sup>

Los suelos son de tipo Luvisol, Acrisol y Vertisol, arcillo-limosos, ácidos (pH de 4.5 a 5.2), con bajos niveles de P (3.5 ppm, Bray II) y de capacidad de intercambio catiónico (10.5 m.e/100 g).<sup>52</sup>

### 5.2. Gramíneas bajo estudio y su manejo

Se estudiaron diez gramíneas forrajeras tropicales, 4 del género *Brachiaria* spp: Insurgente (*B. brizantha*), Señal (*B. decumbens*), Chetumal (*B. humidicola*) y Mulato 1 (híbrido de: *B. brizantha* x *B. ruziziensis*); 3 de la especie *Panicum máximum*, los pastos Guinea, Mombasa y Tanzania; y 3 del género *Pennisetum purpureum*, las variedades Taiwán, Kinggrass cubano y Kinggrass morado.

Estas especies se establecieron con material vegetativo en julio-agosto de 2007, en un diseño de bloques completos al azar (Figura 2) con tres bloques como repeticiones. Las parcelas tienen 4 surcos de 5 m de largo, separados a 50 cm entre sí, y también una distancia entre plantas de 50 cm. Se consideró una parcela útil de 1 m de ancho por 4 m de largo (4 m<sup>2</sup>), dentro de la cual se delimitaron cuatro áreas de 1 m<sup>2</sup> cada una, correspondientes a las edades de rebrote de 3, 6, 9 y 12 semanas.

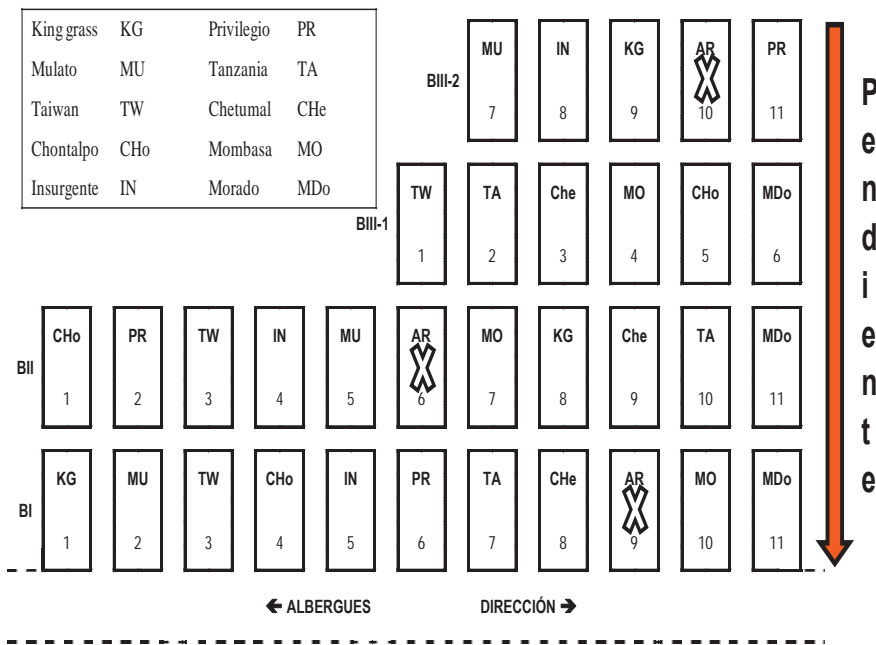


Figura 2. Diseño experimental bloques completos al azar.

Para el presente experimento se estudiaron cinco ciclos de cosecha. Cada ciclo inició con un corte de uniformización, seguido de cortes a las 3, 6, 9 y 12 semanas de rebrote. Las gramíneas amacolladas se cortaron a una altura de 20 cm y las decumbentes a 10 cm. Los ciclos fueron los siguientes: 1) Sequía 2008 (26/03/08-

29/05/08); lluvias 2008 (22/08/08- 24/10/08); nortes 2009 (08/01/09- 24/04/09), lluvias 2009 (08/10/09-11/12/09); nortes 2010 (21/01/10- 26/03/10).

La época con que designo a cada ciclo se basó en la época en que se situó el mes en que se inició cada ciclo. Por ejemplo, nortes 2009 se inició en enero, pero tuvo enero y febrero en la época de nortes y marzo y abril en la época de sequía.

Lo mismo sucedió con lluvias 2009 y nortes 2010. Los ciclos no coincidieron exactamente con su época respectiva porque en su momento no se contó con mano de obra para cosechar. Las condiciones de temperatura, lluvia y humedad relativa para cada ciclo se presentan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Temperatura media diaria y lluvia total en cada ciclo de cosecha.

Ciclo	Fechas	Temperatura (°C)		Humedad relativa (%)	Lluvia (mm)
		Máxima	Mínima		
Sequía 2008	Mar 26 – Mayo 29	30.03 ± 5.0	20.9 ± 2.3	77 ± 17	329
Lluvias 2008	Ago 22 - Oct 24	32.03 ± 3.1	22.8 ± 1.5	80 ± 18	972
Nortes 2009	Ene 08 - Abr 24	27.2 ± 3.4	17.4 ± 2.0	79 ± 20	197
Lluvias 2009	Oct 08 - Dic 11	28.4 ± 4.3	19.9 ± 1.8	85 ± 16	380
Nortes 2010	Ene 21 - Mar 26	23.4 ± 5.0	14.5 ± 2.7	88 ± 15	1180

El forraje se cortó con machete, se introdujo en bolsas de plástico identificadas con número de parcela, bloque y fecha de corte. Posteriormente se llevaron al laboratorio donde se pesó el forraje fresco en una báscula granataria y después se secó una muestra por 72 horas a 65°C, para determinar el porcentaje de materia seca. La muestra seca se molió en un molino Wiley #4 con criba de 2 mm.

Inicialmente, se generaron 600 muestras de forraje seco y molido, provenientes de las 10 gramíneas, que se cortaron a 4 edades en 3 bloques, en cada uno de los 5

ciclos estacionales de corte. Sin embargo, una gran cantidad de cada muestra se empleó para realizar otros análisis, como proteína cruda, fibra por detergente neutro y por detergente ácido, además de lignina y digestibilidad *in situ*, cuyos resultados no se informan en esta tesis. Por este motivo, se tomó una submuestra de 1.67 g de cada repetición (bloque) y se mezcló para tener 200 muestras de 5.00 g de forraje seco y molido, provenientes de 5 ciclos de cosecha, 4 edades al corte y diez gramíneas, con el fin de estudiar con éstas la producción de gas. Al final, catorce muestras no tuvieron la cantidad mínima requerida y no se analizó su producción de gas, por lo que, finalmente, el número de muestras analizadas fue de 186.

### **5.3. Producción de gas *in vitro***

Las determinaciones de producción de gas *in vitro* (PGIV) de las muestras de forraje se llevaron a cabo en el Laboratorio de Bromatología del Instituto de Ciencias Agropecuarias y Rurales de la Universidad Autónoma del Estado del México, localizado en Cerro de Coatepec, Toluca, Estado de México.

Se empleó la técnica de producción de gas *in vitro* de acuerdo a Menke y Steingass <sup>5</sup> modificada por Mauricio *et al.* <sup>53</sup> donde muestras de 0.999 g se incubaron por triplicado a 39°C con 90 ml de una mezcla de licor ruminal amortiguado, en botellas de Wolf de 130 ml; se usaron 3 botellas sin sustrato como blanco.

La PGIV se midió cada hora las primeras ocho y luego a las 12, 16, 20, 24, 36, 48, 72 y 96 horas. Las lecturas se corrigieron por la producción de gas del blanco,

además que se restó la PGIV a las 4 horas, que corresponde a la producida por la FDN rápidamente fermentable.<sup>8</sup>

## 5.4. Análisis estadístico de la información

A continuación se describe el análisis de varianza que se utilizó en el presente estudio.

### 5.4.1. Obtención de los parámetros de producción de gas

Los volúmenes acumulados de gas a los distintos tiempos de incubación, se ajustaron a la ecuación exponencial de Krishnamoorthy *et al.*<sup>54</sup>:

$$Y = b (1 - e^{-c(X-L)}),$$

Dónde: “Y” es la cantidad acumulada de gas al tiempo de incubación “X”; “b” es la máxima cantidad de gas acumulada (ml) cuando  $X \rightarrow \infty$ ; “c” es la tasa de acumulación de gas ([%/100]/h); “X” es el tiempo de incubación *in vitro* (h); y “L” es el tiempo de retardo (h). Como criterio de ajuste se empleó el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) y el error estándar del modelo ( $Sy.x$ ).

### 5.4.2. Análisis de varianza de los parámetros

El análisis de los parámetros descritos en la sección anterior, se realizó mediante el siguiente modelo lineal aditivo:

$$Y_{jkl} = \mu + C_j + E_k + G_l + (C^*E)_{jk} + (C^*G)_{jl} + (G^*E)_{kl} + \xi_{jkl}$$

dónde:  $Y_{jkl}$ , es la variable de respuesta (parámetro del modelo de Krishnamoorthy) medida en la l-ésima gramínea en la k-ésima edad de rebrote, dentro del j-ésimo ciclo de cosecha;  $\mu$ , es la media general, común a todas las observaciones;  $C_j$ , es



el efecto principal del  $j$ -ésimo ciclo de cosecha;  $E_k$ , es el efecto principal de la  $k$ -ésima edad de rebrote;  $G_l$ , es el efecto principal de la  $l$ -ésima gramínea;  $(C^*E)_{jk}$ ,  $(C^*G)_{jl}$  y  $(G^*E)_{kl}$ , son los efectos combinados ó interacciones dobles entre  $C_j$ ,  $E_k$  y  $G_l$ , ya descritos; y  $\xi_{jkl}$ , es la variación atribuible a la interacción triple  $(C^*E^*G)_{jkl}$ , que en el presente caso se supuso no significativa y por tal motivo, se empleó como “error experimental” para probar los efectos de los demás factores del modelo, suponiendo además que tal error se distribuye normalmente, con media igual a cero y varianza unitaria.

El empleo de una interacción de tercer orden como “error experimental”, se justifica por el hecho de que los arreglos factoriales de tratamientos contienen una gran cantidad de repeticiones internas <sup>55</sup>. En el presente caso, el efecto principal del ciclo de cosecha, sin contar con repeticiones de campo, provino de la combinación de 4 edades al corte por 10 gramíneas, lo cual resulta en 40 repeticiones. Además, en términos generales, las interacciones de tercer orden son difíciles de explicar desde un punto de vista biológico.

## VI. RESULTADOS

El Cuadro 2 presenta los resultados del análisis de varianza de los parámetros del modelo de Krishnamoorty *et al.*<sup>54</sup> Los efectos principales del ciclo de cosecha y de la edad de rebrote, así como de su interacción, fueron altamente significativos sobre todos los parámetros de la ecuación. Por su parte, el efecto principal de la gramínea no fue significativo sobre los parámetros b, c y L, pero sí fue altamente significativo sobre  $R^2$  y  $Sy.x$ . Las interacciones ciclo\*gramínea y gramínea\*edad no fueron significativas sobre ninguna variable.

Cuadro 2. Niveles de significancia para los efectos del modelo empleado para analizar la varianza de los parámetros del modelo de Krishnamoorty.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Parámetros del modelo de Krishnamoorty		
		b	c	L
- - - - Nivel de significancia tipo 3(P > F) - - - -				
Ciclo de cosecha	4	<.0001	<.0001	<.0001
Gramínea	9	0.4002	0.3156	0.2780
Edad de rebrote	3	<.0001	<.0001	0.0011
Ciclo*Gramínea	36	0.5234	0.4900	0.7623
Ciclo*Edad	27	0.0002	0.0001	<.0001
Gramínea*Edad	12	0.2199	0.9307	0.3626
Error	94	-----	-----	-----
Media general		329.95	0.0190	6.07
$\sqrt{CME}^{\S}$		70.99	0.0044	0.40
$CV^{\S}$		21.52%	23.20%	6.66%
$R^{2\S}$		0.6896	0.7965	0.7213

<sup>\S</sup> $\sqrt{CME}$ , es la raíz cuadrada del cuadrado medio del error o desviación estándar del experimento; CV es el coeficiente de varianza respectivo ( $[\sqrt{CME}/\text{Media general}] * 100$ );  $R^2$  es el coeficiente de determinación del modelo de análisis de varianza.

El Cuadro 3 presenta las medias de los efectos principales de ciclo de cosecha, edad de rebrote y gramínea.

Cuadro 3. Medias de los parámetros del modelo de Krishnamoorthy para los efectos principales de ciclo de cosecha, edad de rebrote y gramínea, con las correspondientes comparaciones entre medias.

Variables	Niveles	n	Medias de los parámetros del modelo		
			b	c	L
Ciclo de cosecha	Sequía 2008	40	296.2 <sup>a</sup>	0.0259 <sup>a</sup>	5.90 <sup>a</sup>
	Lluvias 2008	36	361.3 <sup>b</sup>	0.0155 <sup>b</sup>	5.87 <sup>a</sup>
	Nortes 2009	40	290.1 <sup>a</sup>	0.0205 <sup>c</sup>	5.89 <sup>a</sup>
	Lluvias 2009	31	359.8 <sup>b</sup>	0.0148 <sup>b</sup>	6.75 <sup>b</sup>
	Nortes 2010	39	380.2 <sup>b</sup>	0.0161 <sup>b</sup>	5.98 <sup>a</sup>
Edad de rebrote	3 semanas	50	277.0 <sup>a</sup>	0.0238 <sup>a</sup>	6.07 <sup>a</sup>
	6 semanas	47	354.2 <sup>b</sup>	0.0166 <sup>bc</sup>	6.26 <sup>bc</sup>
	9 semanas	43	359.1 <sup>b</sup>	0.0182 <sup>b</sup>	6.10 <sup>ac</sup>
	12 semanas	46	359.9 <sup>b</sup>	0.0156 <sup>c</sup>	5.89 <sup>d</sup>
Gramínea	Insurgente	18	358.7 <sup>a</sup>	0.0202 <sup>a</sup>	6.04 <sup>a</sup>
	Chetumal	19	368.7 <sup>a</sup>	0.0188 <sup>a</sup>	6.09 <sup>a</sup>
	Chontalpo	18	320.2 <sup>a</sup>	0.0188 <sup>a</sup>	6.19 <sup>a</sup>
	Mulato	20	307.9 <sup>a</sup>	0.0192 <sup>a</sup>	6.00 <sup>a</sup>
	Mombasa	18	338.8 <sup>a</sup>	0.0163 <sup>a</sup>	5.91 <sup>a</sup>
	Guinea	19	332.6 <sup>a</sup>	0.0182 <sup>a</sup>	5.92 <sup>a</sup>
	Tanzania	18	333.9 <sup>a</sup>	0.0178 <sup>a</sup>	6.08 <sup>a</sup>
	Cubano	18	342.9 <sup>a</sup>	0.0179 <sup>a</sup>	6.17 <sup>a</sup>
	Morado	19	336.6 <sup>a</sup>	0.0183 <sup>a</sup>	6.20 <sup>a</sup>
	Taiwán	19	334.9 <sup>a</sup>	0.0201 <sup>a</sup>	6.18 <sup>a</sup>

Dentro de variable y columna, medias con distinta literal son estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ ).

Las medias del parámetro 'b' de los ciclos de sequía 2008 y nortes 2009 fue prácticamente el mismo, siendo además estadísticamente inferiores a los de los ciclos lluvias 2008, lluvias, 2009 y nortes 2010.

Con respecto al parámetro 'c', las medias de los ciclos lluvias 2008, lluvias 2009 y nortes 2010 fueron estadísticamente similares entre sí, y estadísticamente inferiores a nortes 2009 y sequía 2008; éste último fue el que presentó el mayor valor, que superó estadísticamente a todos los demás. El tiempo de retardo ('L'), del ciclo de cosecha de lluvias 2009 fue el de mayor promedio, siendo estadísticamente ( $P < 0.05$ ) superior a los demás, que no difirieron entre sí ( $P > 0.05$ ) (Cuadro 3; Figura 3).

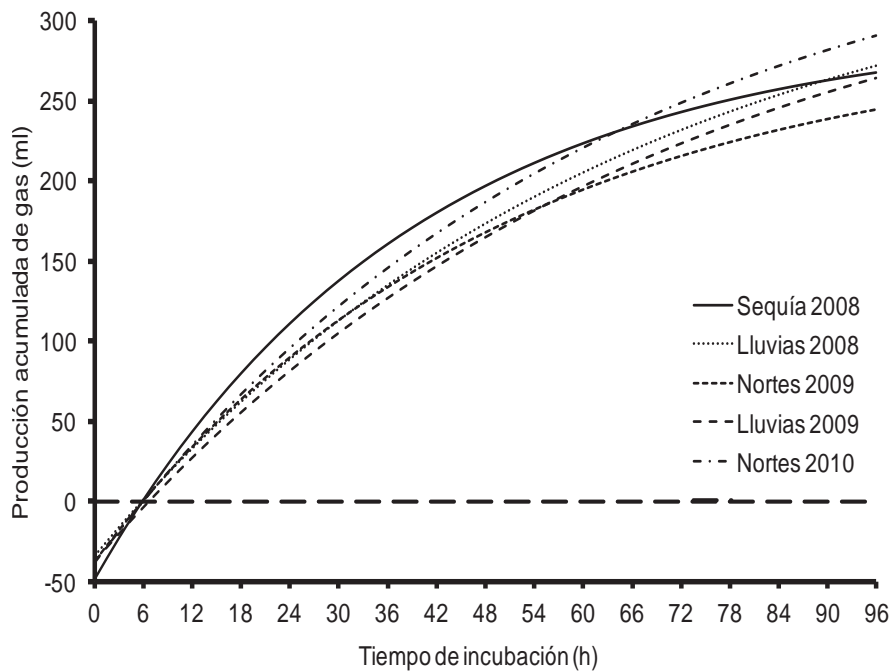


Figura 3. Curvas de producción de gas por ciclo de cosecha, de diez gramíneas forrajeras tropicales cultivadas en el trópico húmedo del estado de Veracruz. Los parámetros correspondientes a cada ciclo se presentan en el Cuadro 3.

La edad de rebrote de 3 semanas presentó el menor potencial de producción de gas ('b'), que fue significativamente inferior al de las demás edades, que no fueron diferentes entre sí. Por el contrario, la edad de 3 semanas tuvo la mayor tasa de

producción de gas ('c'), que fue además significativamente ( $P < 0.05$ ) superior a las otras. El tiempo de retardo ('L') aumentó significativamente ( $P < 0.05$ ) de las 3 a las 6 semanas, para disminuir no significativamente ( $P > 0.05$ ) a las 9 semanas y significativamente ( $P < 0.05$ ) a las 12 semanas (Cuadro 3; Figura 4).

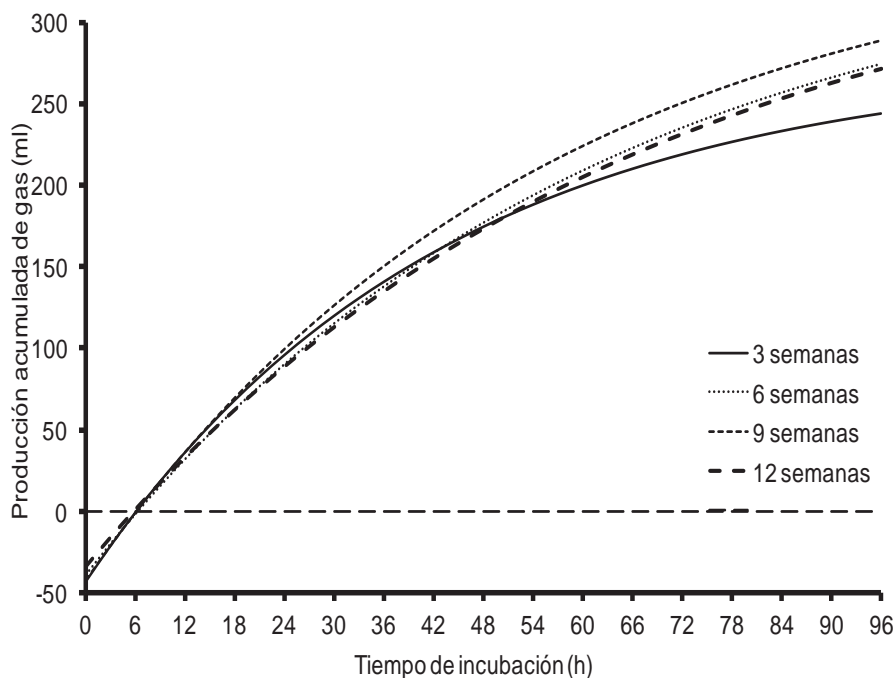


Figura 4. Curvas de producción de gas por edad al corte, de diez gramíneas forrajeras tropicales cultivadas en el trópico húmedo del estado de Veracruz. Los parámetros correspondientes a cada edad se presentan en el Cuadro 3.

Las gramíneas fueron estadísticamente similares entre sí ( $P > 0.05$ ) en cuanto a los tres parámetros del modelo de Krishnamoorthy (Cuadro 3; Figura 5), siendo los promedios generales de: 329.9 ml, 0.0190 por hora y 6.07 h para 'b', 'c' y 'L', respectivamente.

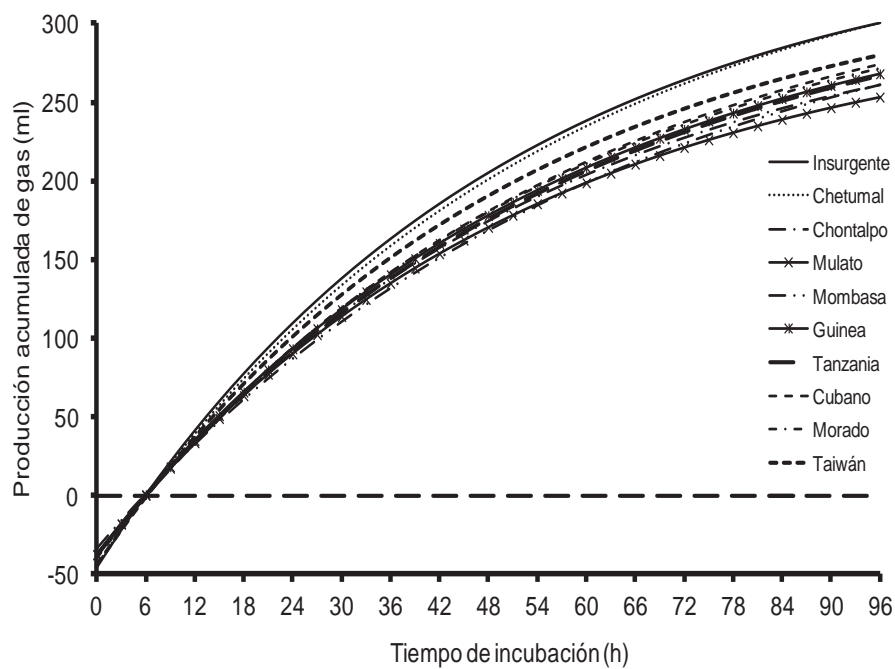


Figura 5. Curvas de producción de gas de diez gramíneas forrajeras tropicales cultivadas en el trópico húmedo del estado de Veracruz. Los parámetros correspondientes a cada gramínea se presentan en el Cuadro 3.

## VII. DISCUSIÓN

### 7.1. Efecto de la gramínea

En la presente investigación no fue posible detectar diferencias entre gramíneas con respecto a los tres parámetros del modelo exponencial de producción de gas de Krishnamoorthy *et al.*<sup>54</sup>. Por lo tanto, no se aceptó la hipótesis planteada de que al menos una de las especies bajo estudio sería significativamente distinta a las demás en cuanto a la curva de producción de gas.

Los resultados informados en este experimento no pueden ser comparados en su totalidad con otros citados en la literatura debido a la ausencia de una técnica de producción de gas estandarizada en los distintos laboratorios donde se realiza, ya que, por un lado, se presentan variaciones desde el tiempo de incubación del sustrato y la cantidad del mismo. Por el otro, unas técnicas emplean jeringas de vidrio y otras, frascos de vidrio. Asimismo, en unos las lecturas son semiautomáticas y en otros es totalmente automatizada.<sup>6</sup>

Más aún, no existe un criterio unificado sobre qué modelo es el más adecuado para ajustar los datos de producción de gas generados.<sup>6</sup>

La composición química de los forrajes afecta al volumen de gas producido, la tasa máxima de producción de gas y el tiempo en que se alcance la fermentación ruminal *in vitro*. Estudios hechos por Nsahlai *et al.*<sup>56</sup>, demostraron que aquellos forrajes donde el contenido de FDN fue mayor, tendieron a producir más gas *in vitro* que los de menor concentración de FDN.

Con respecto a lo anterior, Ortega *et al.*<sup>57</sup> encontraron que en el ciclo de cosecha de lluvias 2008 del presente experimento, no hubo diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre gramíneas con respecto a su composición química y digestibilidad *in situ* a 48 h de incubación ruminal. En dicho estudio, el contenido de FDN varió de 68.9% para el cv. Mombasa (*P. Máximum*) hasta 75.1% para el cv. Chetumal (*B. humidicola*) con una media general de 71.4%. El rango en valores de FDA fue de 41.6% para el cv. Mulato (*B. brizantha* x *B. ruziziensis*) hasta 48.7% para el cv. Guinea (*P. máximum*), siendo el promedio de 44.7%. Con relación a la cantidad de lignina, el menor contenido lo tuvo el cv Chetumal (*B. humidicola*) con 6.3% y el mayor el cv. Guinea (*P. máximum*) con 9.2%, y una media general de 7.5%. El contenido de PC fue de 7.1% para el cv. Mulato, hasta 9.9% para el King grass morado (*Pennisetum purpureum* x *Pennisetum glaucum*), siendo la media general de 8.5%. Con respecto a la digestibilidad *in situ*, la menor fue para el cv. Guinea con 58.9%, la mayor fue para el cv. Taiwán con 69.1% y la media general fue de 64.9%.

Lo anterior sugiere que la causa principal de que las curvas de producción de gas *in vitro* de los distintos pastos no difirieran entre sí, fue su similitud en composición química, en particular, el contenido de FDN.

Este hecho es de hacerse notar, ya que las especies estudiadas presentan diferentes características morfológicas, desde los pastos bajos y semi decumbentes del género *Brachiaria* spp, pasando por los amacollados de porte erecto y tamaño mediano como *Panicum maximum*, y terminando con los de porte erecto y gran tamaño como *Pennisetum* spp. Entonces, a pesar de las diferencias



morfológicas entre especies, existió una gran similitud en composición química y producción de gas de los pastos estudiados.

En un estudio se encontró que *B. decumbens* de 30 días de rebrote, registró una producción de gas a las 48 horas de fermentación de 39.4 ml <sup>58</sup>, valor que difiere de los aquí obtenidos cuya producción de gas total fue mayor a 300 ml. Tal diferencia pudo ocasionarla el hecho de que en el presente estudio se llevaron las mediciones hasta los 96 h. Además, los intervalos entre mediciones fueron de 20 min hasta las 48 h y en el presente, el menor intervalo fue de 1 hora y el mayor de 24 horas.

Se sabe que en *Brachiaria* spp. Existen saponinas que pueden modificar la cinética de degradación del sustrato, retrasando la acción de las bacterias sobre este, y aumentando el tiempo de colonización y la tasa de producción de gas, por otro lado se conoce el bajo contenido de carbohidratos solubles en gramíneas tropicales, especialmente en estados maduros y sequias, ocasiona una tasa de fermentación menor. <sup>58</sup>

Las altas tasas de degradación ('c') indicarían elevada disponibilidad de nutrientes para los microorganismos ruminales, mientras que valores bajos pueden resultar de mayores cantidades de FDN, cuyos componentes químicos pueden reducir la velocidad de fermentación.

Juárez *et al.* <sup>31</sup> colectaron muestras de los pastos Guinea y Tanzania al inicio de la floración (noviembre) en el noreste de Veracruz, obteniendo valores de 'c' a las 24 h de incubación de 0.0425 y 0.0371, respectivamente. Estos valores son muy superiores a los del presente trabajo en los cuales la fracción 'c' de Guinea y Tanzania sólo alcanzó 0.0171 y 0.0196, respectivamente. Es posible que dicha

diferencia se explique en función de las diferentes cantidades de sustrato utilizadas y los diferentes tiempos de incubación.

## 7.2 Efecto del ciclo de corte

Si todos los demás factores están bajo control, el crecimiento y desarrollo de las plantas forrajeras dependerá de la cantidad de lluvia que cae, ó mejor dicho, del agua aprovechable contenida en el suelo, además de la temperatura ambiental. En una investigación clásica, Deinum y Dirven <sup>44</sup> sometieron al pasto congo (*Brachiaria ruziziensis*) cultivado en macetas en invernadero, a combinaciones de distintos niveles de intensidad lumínica y distintos niveles de temperatura ambiental y los cosecharon a 2, 3, 4 y 5 semanas de edad. Los aumentos en edad de la planta, intensidad lumínica y temperatura, incrementaron significativamente la producción de materia seca y su contenido de fibra cruda, en tanto que disminuyeron significativamente los contenidos de nitrógeno orgánico y carbohidratos solubles en agua. Como estudios realizados por ellos mismos con gramíneas templadas tuvieron resultados semejantes. El mismo grupo de investigadores <sup>45, 46</sup> llegaron a la conclusión de que las altas temperaturas de las áreas tropicales serían la mayor causa de la pobre calidad de las gramíneas tropicales. Por lo anterior, se hubiese esperado que los perfiles de producción de gas fueran en promedio distintos para los diferentes ciclos de cosecha del presente estudio, ya que son distintas las condiciones climáticas experimentadas en cada ciclo de cosecha. Sin embargo, ni la cantidad de lluvia así como la temperatura influyeron en la calidad de las gramíneas bajo estudio.

Los Cuadros 1 y 2, presentan respectivamente los promedios de cantidad de lluvia y temperaturas máxima y mínima (X's) y las medias de los parámetros de la curva de producción de gas (Y's) para cada ciclo de corte, donde los valores indican una ausencia de relación entre ambos tipos de variables. Esto se confirmó al efectuar las regresiones lineales, las cuales en ningún caso fueron significativas ( $P > 0.05$ ). Se puede afirmar entonces, que en el presente estudio no existió una asociación entre variables climáticas y calidad de las gramíneas representada ésta por la producción de gas *in vitro*.

Lo anterior concuerda con Mbwile y Udén <sup>59</sup>, quienes al estudiar los efectos combinados de la época y la edad al corte en pasto Rhodes (*Chloris gayana*) cultivado en Tanzania, África, concluyeron que el efecto ambiental sobre el crecimiento y composición química fue débil e inconsistente.

Por el contrario González-Ronquillo *et al.* <sup>60</sup>, estudiaron bajo condiciones de sabanas altas de Venezuela, la fermentación *in vitro* del pasto Buffel (*Cenchrus ciliaris*) a diferentes intervalos de corte (21, 28 y 35 d) en dos periodos de la época de sequía: septiembre – noviembre 1992 y abril – junio 1993, y encontraron mayor producción de gas ( $P < 0.01$ ) al cortar cada 21 d en el periodo septiembre – noviembre. Además, la interacción corte por estación fue significativa ( $P \leq 0,05$ ), lo que según estos autores, demostró que la producción de gas en pastos tropicales disminuye con la edad de la planta.

El mismo grupo de investigación anterior <sup>61</sup>, encontró que en las sabanas moduladas del Apure, Venezuela, la mayor producción de gas (ml gas/g MS) fue en la época de lluvias (157 ml) seguida por la época de transición de sequía a lluvias (148 ml) con diferencia altamente significativa ( $P < 0.01$ ) con respecto a las

épocas de sequía (119 ml) y transición de lluvias a sequía (119 ml), lo cual demostró diferencias reales y significativas entre épocas en calidad nutricia del pasto.

### **7.3 Efecto de la edad al corte**

Es un hecho conocido que cuando la edad del forraje aumenta, al mismo tiempo disminuye progresivamente su calidad nutritiva y su consumo por los rumiantes. Por eso, los pastos a edades tempranas son más digestibles y consumidos en mayor grado que aquellos en estado avanzado de madurez<sup>62</sup>. A medida que el forraje madura, se reduce el contenido de nitrógeno soluble y aumenta la proporción de pared celular, así como el grado de lignificación de ésta<sup>11</sup>. La lignina afecta la digestibilidad y las reservas metabólicas de las plantas. Por otro lado, a medida que aumenta la madurez de la planta, empieza a disminuir glucidos solubles, almidón, ácidos orgánicos, proteína y pectinas, que son parcialmente responsables de la disminución en su valor nutritivo.

Los polisacáridos estructurales como la celulosa y la hemicelulosa, tienen digestibilidades muy variables que dependen del grado de lignificación de la planta. La temperatura atmosférica incrementa la actividad metabólica de la planta; sin embargo, el incremento en luz eleva los contenidos de azúcares no estructurales, por lo que disminuye el contenido de lignina. Menos nitrógeno y menos agua, disminuyen el crecimiento de la planta, por lo tanto, baja el grado de lignificación. Con base en lo anterior, se hubiese esperado aumentos progresivos en la cantidad máxima de gas producido (b), debido a aumentos en la cantidad de

FDN producto del aumento en edad, así como reducciones en la tasa de producción de gas (c) en respuesta al aumento en lignificación en la pared celular. La producción máxima de gas (b) fue significativamente menor ( $P < 0.05$ ) a las 3 semanas de edad en comparación con la producción a las otras edades, que no difirieron entre sí ( $P > 0.05$ ). Asimismo, la tasa de producción de gas (c) a las tres semanas fue significativamente superior ( $P < 0.05$ ) a las demás edades, que en términos prácticos fueron muy similares entre ellas (Cuadro 2). En otras palabras, las gramíneas jóvenes produjeron menos gas, pero a una tasa más rápida, que las gramíneas más maduras. Por tal motivo, los resultados del presente experimento confirmaron la expectativa del efecto de la edad sobre los parámetros de producción de gas.

Los datos aquí generados sobre producción de gas *in vitro*, son diferentes a los encontrados por otros investigadores. Por ejemplo Juárez *et al.*<sup>31</sup>, estudiaron los pastos amacollados Guinea y Tanzania, ambos cultivares de *Panicum maximum*, así como los decumbentes pangola (*Digitaria decumbens*) y Bermuda de la costa (*Cynodon dactylon*), los cuales cosecharon a principios de floración en el mes de noviembre en potreros de la huasteca Veracruzana. A diferencia del presente trabajo, ellos emplearon un tamaño de muestra de 500 mg de materia seca que colocaron en jeringas de 100 ml. En promedio, su producción máxima de gas fue de 119.7 ml, muy inferior a la de la presente investigación, en tanto que su tasa de producción de gas de 0.0371 h, muy superior a la mayor cantidad registrada en el presente estudio que fue para las tres semanas de edad de 0.0190 h (Cuadro 2). Las gramíneas de ese experimento<sup>31</sup> tuvieron 6.98% de proteína cruda y 72.2% de FDN, en comparación con las del presente estudio, en que se tuvieron rangos

de 7.1% a 9.9% para proteína cruda y de 65.2% a 75.1% de FDN, lo que indicó que las diferencias reducidas en composición química entre ambos estudios, que no se reflejaron en los parámetros de producción de gas.

## **VIII. CONCLUSIONES E IMPLICACIONES**

El presente estudio no permitió demostrar que hubiese diferencias estadísticas significativas en las curvas de producción de gas de los diez gramíneas estudiadas, por lo que la hipótesis planteada no fue aceptada.

Los resultados de composición química de la época de lluvias de 2008, permiten proponer que la ausencia de diferencias en contenido de paredes celulares (FDN) y su similar grado de lignificación, fue la causa más probable de que la producción de gas fuese similar entre gramíneas.

## IX. REFERENCIAS

1. Fox DG, Tylutki TP, Tedeschi LO, Van Amburgh ME, Chase LE, Pell AN, *et al.* The Net Carbohydrate and Protein System for Evaluating Herd Nutrition and Nutrient Excretion: Model Documentation. Mimeo 213, Animal Science Department, Cornell University, Ithaca, NY.2000.
2. Van Soest PJ. Nutritional Ecology of the Ruminant. 2<sup>da</sup>ed. Cornell University Press, Ithaca, NY. 1994.
3. Tilley JMA, Terry RA. A two- stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. J Brit Grassland Soc 1963; 18:104-111.
4. Orskov ER, Howell FD, Mould F. The use of the nylon bag technique for the evaluation of feedstuffs. Trop Anim Prod 1980; 5:195-213.
5. Menke KH, Steingass H. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analyses and *in vitro* gas production using rumen fluid. Animal Research and Development 1988; 28:7-55.
6. Posada SL, Noguera RR. Técnica *in vitro* de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. Livestock Res Rur Dev 2005; 17(4):1-17. Disponible en: URL: <http://www.lrrd.org/lrrd17/4/posa17036.htm>.
7. Schofield P. Gas Production Methods. In: Farm Animal Metabolism and Nutrition. Wallingford (UK). CAB International. 2000.
8. Herrero, M. y Jessop NS. Relationship between *in vitro* gas production and neutral detergent fibre disappearance in three tropical grasses. Animal Science 1996; 62:682.



9. Rymer C, Huntington JA, Givens DI. Effects of inoculum preparation method and concentration, method of inoculation and pre-soaking the substrate on the gas production profile of high temperature dried grass. *Anim Feed Sci Technol* 1999; 78:199-213.
10. Lyons RK, Machen R, Forbes TDA. Why Range Forage Quality Changes E-99S. AgriLIFE EXTENSION, Texas A&M System. 2001. Disponible en: URL: <http://agrilifeextension.tamu.edu>
11. Estrada JA. Pastos y forrajes para el trópico colombiano. 1<sup>ra</sup> ed. Universidad de Caldas, 2002.
12. McDonald P, Edwards RA, Greenhalgh JFD, Morgan CA. Nutrición Animal. 5<sup>ta</sup> ed. Editorial Addison Wesley-Longman Ltd. 5 Bentinck Street, London W1M 5 RN, United Kingdom, 1995.
13. Komarek A.R. A filter bag for improved efficiency of fiber analysis. *J. Dairy Sci* 1993; Suppl 1:76:250.
14. Fay JP, Guaita MS, Danelón JL, Chifflet S, Wawrzkievicz M, Fernández HM, *et al.* Evaluation of two procedures to determine acid and neutral detergent fibers in ruminant feeds of the temperate region of Argentina. *Journal of AOAC International* 2005; 88(4):995-997.
15. Berchielli TT, Sader OAP, Tonani FL, Paziani SF, Andrade P. Avaliação da determinação da fibra em detergente neutro e da fibra em detergente ácido pelo sistema ANKOM. *Rev Bras Zootec* 2001; 30(5):1572-1578.
16. Church DC, Pond WG, Pond KR. Fundamentos de Nutrición y Alimentación de Animales. 2<sup>a</sup>ed. LIMUSA wiley, 2003.
17. Shimada MA. Nutrición Animal. 2<sup>da</sup> ed. Trillas, 2009; 96-121.

18. Peters M, Horacio FL, Schmidt A, Hincapié B. Especies forrajeras multipropósito: Opciones para productores de Centroamérica. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT); Bundesministerium fur Wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (BMZ); Deutsche Gesellschaft fur Technische Zusammenarbeit (GTZ); 2003; 333:114.
19. Enríquez QJF, Romero M. Tasa de crecimiento estacional a diferentes edades de rebrote de 16 ecotipos de *Brachiaria* spp en Isla Veracruz. Agrocienia 1999; 33: 141-148.
20. Federación Colombiana de Ganaderos. Parcelas demostrativas con materiales forrajeros importados de Brasil: Región Valles Interadinos. FEDEGAN- FGN SENA. 2010.
21. Vicente-Chandler J, Caro CR, Abruña F, Silvia S. Producción y utilización intensiva de las forrajeras en Puerto Rico. Boletín 271. Estación Experimental Agrícola, U. P. R.:217.1983.
22. Araya MM, Buschini FC. Producción de forraje y calidad nutricional de variedades de *Pennisetum purpureum* en la meseta central de Costa Rica. Agronomía Mesoamericana, 2005; 16 (001): 37-43.
23. Quin JI, van der Wath JG, Myburgh S. Studies on the alimentary tract of Merino sheep in South Africa. 4. Description of experimental technique. Onderspoort J Vet Sci Anim Ind 1938; 11:341-360.
24. Ortega CME, Carranco JME. Factores que afectan la digestibilidad *in situ* de los alimentos en el rumen. Vet Méx 1993; 24(1):55-58.
25. Ruiz ME, Ruiz A. Nutrición en rumiantes. Guía metodológica de Investigación. 1ª ed. IICA- RISPAL, 1990.

26. Pell AN, Doane PH, Schofield P. *In vitro* digestibility and gas production. In: Simposio sobre Trópicos Especies en Zootecnia, Lavras, MG. 1997; 109 - 132.
27. Rymer C, Moss AR, Deaville ER, Givens DI. Factors affecting the amount of indirect gas produced by the *in vitro* gas production technique. In: *In vitro* techniques for measuring nutrient supply to ruminants. Deaville ER, Owen E, Adesogan AT, Rymer C, Huntington JA, Lawrence TLJ (Eds). Occasional Publication No. 22-British Society of Animal Science. 1998; 89-91.
28. Giraldo LA, Gutiérrez LA, Sánchez J y Bolivar PA. Relación entre presión y volumen para el montaje de la técnica *in vitro* de producción de gas en Colombia. *Livestock Research for Rural Development*. 2006; 18 (6).
29. Noguera RR, Saliba EO y Mauricio RM. Comparación de modelos matemáticos para estimar los parámetros de degradación obtenidos a través de la técnica de producción de gas. *Livestock Research for Rural Development*. 16 (11) 2004.
30. Williams B. Cumulative gas production techniques for forage evaluation. In: Givens DI, Owen E, Omed HM, Axford, RFE, editors. *Forage Evaluation in Ruminant Nutrition*. CAB International, Wallingford. 2000; 189-213.
31. Juárez RAS, Cerrillo SMA, Gutiérrez OE, Romero TEM, Colín NJ, Bernal BH. Estimación del valor nutricional de pastos tropicales a partir de análisis convencionales y de la producción de gas *in vitro*. *Téc Pec Méx* 2009; 47(1):55-67.
32. Bruni MA, Chilbroste P. Simulación de la digestión ruminal por el método de la producción de gas. *Arch Latinoam Prod Animal* 2001; 9 (1):43.51.

33. Mott GO, Moore JE. Forage evaluation techniques in perspective. *In*: Barnes RF, Clanton CD, Gordon HC, Klopfenstein JT, Waldo RD. editors Proc. Natl. Conf. Forage Quality Evaluation and Utilization. Lincoln, Nebraska. 1969.
34. Ulyatt M. The feeding value of herbage. *In*: Butler G, Baile R. editors. Chemistry and Biochemistry of Forage. Academic Press, London; (3) 1973, 131-178.
35. Skerman PJ. Gramíneas tropicales. Colección FAO: Producción y Protección Vegetal; 1991; 123:1-730.
36. Savidan YH, Jank L, Costa JCG. Registro de 25 accesos seleccionados de *Panicum máximum*. Campo Grande, EMBRAPA- CNPQC. Documentos; 44:68.1990.
37. Eusse BJ. Pastos y Forrajes Tropicales. 3<sup>ra</sup> ed. Banco Ganadero, Santa Fe de Bogotá, DC. , Colombia; 1994; 320- 420.
38. Meissner HH. Recent research on forage utilization by ruminant livestock in South Africa. Anim Fd Sci Technol 1997; 69: 103-119.
39. González HF, Ortiz J, Huertas R, Hugo B, Martínez G. Comportamiento Reproductivo y producción de leche en ganado San Martinero. Memorias del II Encuentro Nacional de Investigadores de las Ciencias Pecuarias, Medellín Pág.2. (1989). Resumen.
40. Deschamps FC, Alves de Brito CJF. Quality and participation of several fractions of three elephant grass cultivars (*Pennisetum purpureum*, Schumach). Anais da XXXV Reuniao da SBZ, Botucatu- SP. (1998).

41. Martínez HV. (1988) Producción de forraje del pasto Taiwán (*Pennisetum purpureum*) en época de máxima precipitación [resumen] IV Semana Científica. CURLA. La Ceiba. Honduras; 9-13.
42. Rua FM. Pastos de corte en el trópico. [cited 2008 ago 8]. Disponible en: URL: <http://www.ergomix.com/MA-agricultura/pasturas/articulos/pastos-corte-tropico-t2047/p0.htm>.
43. Minson DJ, McLeod MN. The digestibility of temperate and tropical grasses. Proceedings of the 11th International Grassland Congress. 1970; 719-722 Surfers Paradise, Australia.
44. Deinum B, Dirven JGP. Climate, nitrogen and grass. 5. Influence of age, light intensity and temperature on the production and chemical composition of Congo grass (*Brachiaria ruziziensis* Germain et. Evrard). Neth J Agric Sci 1972; 20:125-132.
45. Deinum B, van Es AJH, Van Soest PJ. Climate, nitrogen and grass. 2. The influence of light intensity, temperature and nitrogen on *in vivo* digestibility of grass and the prediction of these effects from some chemical procedures. Neth J Agric Sci 1968; 16: 217-223.
46. Deinum B, Dirven JGP. Climate, nitrogen and grass. 4. The effect of age on chemical composition and *in vitro* digestibility of maize (*Zea mays* L) and tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb). Neth J Agric Sci 1971; 19:264-272.
47. Ford CW, Morrison IM, Wilson JR. Temperature effects on lignin, hemicellulose and cellulose in tropical and temperate grasses. Aust J Agric Res 1979; 30: 621-633.

48. Dugmore TJ, Nsahlai IV. Effect of environmental factors on the digestibility and voluntary feed intake of kikuyu. *South African J Anim Sci* 2010; 40 5 Suppl 1:414-417.
49. Valenciaga D, Chongo B, Herrera, RS, Torres V, Oramas A, Cairo, JG, *et al.* Efecto de la edad de rebrote en la composición química de *Pennisetum purpureum* vc. Cuba CT-115. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 2009; 43 (1); 73-79 pp.
50. Ramírez RJL, Vega EM, Acosta IL y Verdecia AD. Caracterización nutritiva de las especies *Brachiaria decumbens* e híbrido en un suelo fluvisol de Cuba. *Livestock Research for Rural Development*. 2009; 21 (2)
51. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical: Imágenes del Centro y su localización geográfica. Disponible en:  
URL: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/centros/ceiegt/localización.html>
52. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Compendio de Información Geográfica Municipal 2009. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos: Martínez de la Torre, Estado de Veracruz de Ignacio de la Llave (Clave geoestadística 30102). Disponible en:  
URL: <http://mapserver.inegi.org.mx/dsist/prontuario/index2.cfm>
53. Mauricio RM, Mould FL, Dhanoa MS, Owen E, Channa KS, Theodoru MK. A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. *Anim Fed Sci Technol* 1999; 79:321-330.

54. Krishnamoorthy UH, Soller H, Steingass H, Menke KH.. A comparative study on rumen fermentation of energy supplements *in vitro*. J. Anim Physiol Anim Nutr 1991; 65: 28-35.
55. Cochran WG, y Cox GM. Diseños Experimentales. 6a ed. Ed. Trillas. 1980. 592-617pp.
56. Nsahlai I, Umunna N, Negassa D. The effect of multi-purpose tree digesta on *in vitro* gas production from napier grass or neutral-detergent fibre. J Sci Fd Agric 1995; 69:519-528.
57. Ortega GR, Castillo GE, Jarillo RJ, Escobar HR, Ocaña ZE, Valles MB. Nutritive quality of ten grasses during the rainy season in a hot-humid climate and Ultisol soil. Trop and Subtrop Agroecosyst 2011; 13:481-491.
58. Sánchez ED; Arreaza CL y Abadía B. Estudio de la cinética de degradación *in vitro* de cuatro forrajes tropicales y una leguminosa de clima templado. Rev Corpoica 2005; 6(1):1-17.
59. Mbwile RP, Udén P. Effects of age and season of growth and nutritive value of Rhodes grass (*Chloris gayana* cv Kunth). Anim Fd Sci Technol 1997; 65:87-98.
60. González-Ronquillo M, Fondevila M, Barrios UA, Newman Y. *In vitro* gas production from buffel grass (*Cenchrus ciliaris* L.) fermentation in relation to the cutting interval, the level of nitrogen fertilization and the season of growth. Anim Fd Sci Technol, 1998; 72:19–32.
61. González- Ronquillo M, Aparicio R, Torres R y Domínguez IA. Producción de biomasa, composición química y producción de gas *in vitro* de la vegetación de una sábana estacional modulada. Zootecnia Trop. 2009: 27(4): 4907-417.

62. Toranzos M, Pérez P, Días A. Criterio de evaluación de henos de pasturas tropicales. [cited 2006 abril 4]. Disponible en: URL: <http://www.ceniap.gov.ve/bdigital/zt200>.



## APENDICE I

### A.1.1. Procedimiento para medir la producción de gas

Aproximadamente 0.999 gramos de muestra se pesaron por triplicado, en botellas Wolf de vidrio de 130 ml. Se preparó una solución amortiguadora la cual se mezcló con líquido ruminal colectado de dos bovinos fistulados de rumen, la colecta se hizo cuando los animales estaban en ayuno, la dieta que les es asignada es a base de heno de alfalfa, 4 kilos y heno de avena 6 kilos, maíz molido dos kilogramos y un puño de fosforo, respectivamente.

En un vaso de precipitados mantenido a 39°C se mezclaron todas las soluciones y se mantiene a esa temperatura; se gasea con CO<sub>2</sub> (al menos 20 min) al final se coloca la solución reductora, posteriormente con ayuda de un dispensador automático se vierten 90 ml de solución amortiguadora, más 10 ml de líquido ruminal a cada botella, y se incubaron en baños maría proporcionándole una temperatura optima de 39°C y se iniciaron las lecturas con un transductor de presión, se registró la producción de gas a las 1-8, 12, 16, 20, 24,36, 48, 72 y 96 horas. Al finalizar las 96 horas se obtendrán análisis de fibra detergente neutra y materia orgánica.

Posteriormente se utilizaron de las botellas por triplicado, dos para determinar fibra detergente neutro y una para materia orgánica, en ambos casos se filtró el sobrenadante dejando en los crisoles de Goosh solo el residuo de la muestra, se dejan en una estufa de aire forzado por 24h a 60°C, para después colocarlos en un desecador por dos horas para ser pesados y así tener el peso del crisol más la

materia seca, finalizado esto se colocaron en una mufla por 4h a 450°C se obtienen cenizas y se vuelven a pesar.

Para determinar fibra detergente neutro (FDN), se preparó una solución la cual contiene EDTA,  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ , lauril sulfato de sodio, 2 etoxi-etanol y fosfato de disodio hidrogenado (anhidro), se vertió todo el contenido de las botellas de Wolf en frascos para que después se lo adicionara 50 ml de la solución de fibra detergente neutro.

### **A.1.2. Colecta del líquido ruminal**

Se colectó líquido ruminal de dos bovinos, el cual se filtró con manta de cielo (2 capas) a un termo precalentado a 39 °C, que posteriormente se llevó al laboratorio. El líquido ruminal debe colectarse con no más de 2 h antes de usarse. Una vez en el laboratorio se vuelve a filtrar para eliminar toda partícula de forraje de este. Enseguida se hace burbujear  $\text{CO}_2$  y se coloca en baño maría a temperatura constante de 39°C y se mantiene así hasta utilizarlo.

### **A.1.3. Preparación de solución amortiguadora (saliva artificial)**

Se prepara la saliva artificial mezclando lo siguiente: agua destilada, 4.682 ml; elementos traza, 0.900 ml; solución buffer, 1.873 ml; solución de elementos principales, 1.873 ml; resarzurina, 1.700 ml. En la mezcla se hace burbujear  $\text{CO}_2$  durante al menos 20 min, manteniéndose a agitación constante empleando una platina con agitador magnético. Se debe mantener a temperatura constante de 39 °C.

#### **A.1.4. Preparación final de la solución reductora**

Se procede a preparar la solución reductora y es indispensable que esto se haga inmediatamente antes de utilizarla. Para preparar solución para cien botellas es necesario mezclar: 21.04 ml de agua destilada, 0.8416 g de hidróxido de sodio y 3.28 g de  $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ .

La solución reductora se agrega a la solución amortiguadora y se espera a que cambie el color azul de la solución original dado por la resarzurina a rosa y después de unos cuantos minutos (<5) se vuelve transparente. Es de suma importancia que cambie de color ya que de esta forma se asegura que las soluciones están bien preparadas y se mantiene un pH constante de la misma. Otro indicativo de que se ha preparado adecuadamente la solución es que cuando se agrega la solución reductora se notará evidentemente un olor a huevo podrido. La solución se sigue agitando y burbujeando  $\text{CO}_2$ .

#### **A.1.5. Preparación de la mezcla final**

Cada botella se llena con 90 ml de la mezcla anterior, utilizando de preferencia un dispensador automático, y finalizado esto se inyectan 10 ml de líquido ruminal. Posteriormente, se registra la lectura inicial y se coloca en baño maría a temperatura constante de 39°C.

### **A.1.6. Transductor de presión**

Se registra la lectura a las 1,2,3,4,5,6,7,8,12,16,20,24,36,48,72 y 96 h de incubación.

Posteriormente, de las botellas por triplicado, dos se utilizan para determinar fibra por detergente neutro (FND) y una para materia orgánica (MO), en ambas se filtra el contenido en crisoles de Gooch, dejando solamente el forraje restante. Para obtener FND se prepara la solución correspondiente la cual consta de los siguientes reactivos: EDTA, 93.0 g;  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ , 34.0 g; lauril sulfato de sodio, 150.0 g; 2-etoxi-etanol, 50.0 ml y difosfato de sodio hidrogenado anhidro, 22.8 g.

De las botellas seleccionadas para FDN se vertió su contenido en frascos y se adicionaron 50 ml de esta solución, posteriormente se tapan con papel aluminio las boquillas y se coloca la tapa, finalmente se colocan en una autoclave a 105°C por 1h y se filtran en crisoles. Una vez que se tienen los crisoles filtrados tanto de FND y MO se coloca en estufa de aire forzado a 60° por 24 h y luego se colocan en un desecador por 2 h, se pesan y se obtiene el peso del crisol más la materia seca. Finalizado esto se colocan en una mufla a 450°C por 4h para la obtención de cenizas y se vuelven a pesar los crisoles para obtener el peso del crisol más cenizas. A partir de allí se obtiene por diferencia de pesos, los contenidos de FDN y MO.