



# UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales

Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas  
Producción y Salud Animal

---

---

## LOS TANINOS DE LAS ESPECIES ARBOREAS FORRAJERAS DE LA REGIÓN DE TIERRA CALIENTE EN LA PRODUCCIÓN (*in vitro*) DE METANO (CH<sub>4</sub>)

Tesis

Que para obtener el grado de:

**Maestro en Ciencias Biológicas**

Presenta:

**Medico Veterinario Zootecnista  
Leonardo Hernández Medina**

Directora:

**Doctora en Ciencias: Ernestina Gutiérrez Vázquez**

Co-directora:

**Doctora en Ciencias: Liliana Márquez Benavides**

Morelia, Michoacán  
Agosto 2013

---

---

---





# UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales

Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas  
Producción y Salud Animal

## LOS TANINOS DE LAS ESPECIES ARBOREAS FORRAJERAS DE LA REGIÓN DE TIERRA CALIENTE EN LA PRODUCCIÓN (*in vitro*) DE METANO (CH<sub>4</sub>)

Tesis

Que para obtener el grado de:

**Maestro en Ciencias Biológicas**

Presenta:

**Medico Veterinario Zootecnista:**

**Leonardo Hernández Medina**

**Directora:**

**Doctora en Ciencias**

**Ernestina Gutiérrez Vázquez**

**Co-directora:**

**Doctora en Ciencias**

**Dra. Liliana Márquez Benavides**

**Asesores:**

**Doctor en Ciencias. Aureliano Juárez Caratachea**

**Doctor en Ciencias. Armín Javier Ayala Burgos**

**Doctor en Ciencias. Guillermo Salas Razo**

**Morelia, Michoacán**

**Agosto 2013**





UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
Programa Institucional de Maestría en Ciencias Biológicas

DR. HÉCTOR GUILLÉN ANDRADE  
COORDINADOR GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
P R E S E N T E

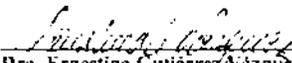
Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de la Tesis Titulada: "Los taninos de las especies arbóreas forrajeras de la Región de Tierra Caliente en la producción (in vitro) de metano (CH<sub>4</sub>)" presentado por el MVZ. Leonardo Hernández Medina, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en Examen de Grado de Maestro en Ciencias.

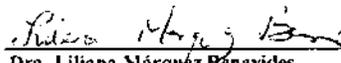
Sin otro particular por el momento, reiteramos a usted un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

Morelia, Michoacán, a 10 de julio de 2013

MIEMBROS DE LA COMISIÓN REVISORA

  
Dra. Ernestina Gutiérrez Vázquez  
Directora

  
Dra. Lilitana Márquez Benavides  
Co Directora

  
Dr. Armin Javier Ayala Burgos

  
Dr. Aureliano Juárez Caratachea

  
Dr. Guillermo Salas Razo

*In memoriam*

Mi abuelita:

**Ernesta López Paniagua**

*(7 de noviembre de 1926 – 27 de mayo de 2012)*

Mi abuelo:

**José Hernández Magdaleno**

*(6 de noviembre de 1940 – 22 de noviembre de 2012)*

Mis primos:

**Sergio Medina Velásquez**

*(27 de julio de 1972 – 20 de febrero de 2012)*

**Miguel Carrillo Medina**

*(11 de febrero de 1986 – 20 de junio de 2012)*

Mi suegro:

**José Alverto de Jesús López Mariscal**

*(23 de septiembre de 1946 – 15 de abril de 2013)*

## Dedicatorias

A mis padres:

J. Trinidad Hernández Rodríguez y Longina Medina López, ya que a lo largo de toda mi vida, me han apoyado incondicionalmente. Por todo sus regaños, amor y comprensión. Sin duda ejemplos de vida, nunca terminare de agradecerles.

A mis hermanas:

Jazmín, Mayra Alejandra y Mónica Marlene, por ser las mejores hermanas, amigas y confidentes. Sin olvidar a la hermosa familia de mi hermana Jazmín, mis sobrinos Amaya y Emiliano y mi cuñado Gutu.

A mi esposa y mi hija:

Magdalena López Maldonado y Sofía Hernández López, por ser las fuente de inspiración, mi razón de vivir y lo mejor que me ha pasado.

A mis abuelos:

Leonardo Medina Ortiz (†)

Ernesta López Paniagua (†)

José Hernández Magdaleno (†)

María Guadalupe Rodríguez Paniagua

A los miembros de las familias Medina López y Hernández Rodríguez

## **Agradecimientos**

A Dios por darme la gracia de estar vivo y permitirme la oportunidad de disfrutar de todas sus bondades

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría.

A mis directoras de tesis:

- Dra. Ernestina Gutiérrez Vázquez, por todo su apoyo durante mi carrera de licenciatura y maestría.
- Dra. Liliana Márquez Benavidez, por su apoyo y asesoría para la realización de este trabajo.

A mis asesores:

- Dr. Aureliano Juárez Caratachea
- Dr. Guillermo Salas Razo
- Dr. Armín Javier Ayala Burgos

Por su apoyo en la asesoría de este trabajo.

Al MC. Ruy Ortiz Rodríguez por su ayuda en el análisis e interpretación de los resultados obtenidos.

Al Dr. Juan Manuel Sánchez Yáñez por compartir sus conocimientos y por su contribución en las revisiones realizadas en el presente trabajo.

A mis compañeros:

Sergio Piñón Aguilar, Emmanuel Verboonen Mendoza, Jesús Rojo Martínez, Roberto Alejandro García Guzmán, Carlos Cortez Mondragón, Salvador Jiménez Aguilar y Mateo Bravo Chuela, por brindarme su amistad.

A mis tíos Baldomero y Graciela por todo el apoyo y muestras de cariño que siempre me han brindado.

A la familia López Maldonado por dejarme entrar en sus vidas y permitirme formar parte de su familia.

A toda mi familia, muchas gracias.

## Índice

Resumen .....	1
Abstract .....	2
I. Introducción .....	3
1.1. La producción ganadera en México .....	5
1.1.1. La Región de Tierra Caliente Michoacán, México .....	6
1.2. La emisión de CH <sub>4</sub> y el efecto invernadero .....	7
1.2.1. Inventario nacional de GEI en el sector agrícola y pecuario .....	7
1.3. Microbiología de la metanogénesis .....	9
1.4. Métodos para reducir la emisión de CH <sub>4</sub> en rumiantes .....	11
1.4.1. Número y productividad de los animales .....	11
1.4.2. Selección genética de los animales .....	12
1.4.3. Compuestos ionóforos .....	12
1.4.4. Complementación en la dieta .....	13
1.4.5. Defaunación .....	14
1.5. Los metabolitos secundarios de las plantas .....	14
1.6. Los taninos .....	15
1.6.1. Definición y clasificación .....	15
1.6.2. Propiedades químicas .....	16
1.6.3. Efecto de los taninos en la nutrición de rumiantes .....	17
1.6.4. Efecto de los taninos en la producción animal .....	21
1.6.5. Tratamientos para revertir el efecto negativo de los taninos .....	22
1.6.6. Uso práctico de los taninos .....	22
1.7. Especies arbóreas forrajeras de la RTCM .....	24
1.7.1. <i>Vitex mollis</i> .....	25

1.7.2. <i>Haematoxylon brasiletto</i> .....	26
1.7.3. <i>Cordia elaeagnoides</i> .....	27
1.7.4. <i>Platymiscium lasiocarpum</i> .....	28
II. Justificación .....	29
III. Hipótesis.....	29
IV. Objetivos .....	30
4.1. Objetivo general .....	30
4.2. Objetivos particulares.....	30
V. Materiales y Métodos .....	31
5.1. Localización del área de estudio .....	31
5.2. Composición química y metabolitos secundarios de <i>Cordia elaeagnoides</i> , <i>Vitex mollis</i> , <i>Platymiscium lasiocarpum</i> y <i>Haematoxylon brasiletto</i> .....	31
5.3. Producción de gas <i>in vitro</i> .....	32
5.3.1. Material vegetal .....	32
5.3.2. Inóculo ruminal para prueba <i>in vitro</i> .....	32
5.3.3. Medio de cultivo para la prueba <i>in vitro</i> de producción de CH <sub>4</sub> .....	33
5.3.4. Medición de producción de gas <i>in vitro</i> y producción de CH <sub>4</sub> .....	35
5.3.5. Análisis estadístico .....	35
VI. Resultados y discusión.....	37
6.1. Metabolitos secundarios de las especies arbóreas forrajeras y su efecto sobre la producción de gas y CH <sub>4</sub> .....	37
6.2. Efecto de especies arbóreas con contenido de taninos sobre la producción de gas <i>in vitro</i> y producción de CH <sub>4</sub> en un lapso de 24 h post-incubación .....	38
VII. Conclusiones .....	49
VIII. Literatura Citada .....	50

## Índice de Tablas

Tabla I. Emisiones de CH <sub>4</sub> en el Sector Agropecuario, equivalente a CO <sub>2</sub> (Gg), 1990-2002 .....	8
Tabla II. Emisión de CH <sub>4</sub> en el Sector Pecuario (rumiantes) expresados en Gg de 1990 a 2002 .....	9
Tabla III. Volumen requerido para preparar 600 ml de medio de cultivo .....	34
Tabla IV. Porcentaje de taninos condensados y fenoles totales de las especies arbóreas forrajeras de la región de Tierra Caliente Michoacán.....	37
Tabla V. Coeficientes de Correlación de Pearson para los indicadores: tipo de especie vegetal, concentración, horas post-incubación, volumen de gas y volumen de CH <sub>4</sub> .....	39
Tabla VI. Volumen total de CH <sub>4</sub> producido <i>in vitro</i> a las 24 horas de acuerdo al tipo de especie vegetal y concentración usada.....	42
Tabla VII. Coeficientes de regresión polinomial para la determinación del volumen de CH <sub>4</sub> producido a las 24 horas de acuerdo a la especie vegetal, concentración y horas post-incubación .....	43
Tabla VIII. Disminución de CH <sub>4</sub> de acuerdo a la especie vegetal, concentración y hora de máxima producción post-incubación con respecto a <i>A. sativa</i> .....	47

## Índice de Figuras

Figura I. Rutas metabólicas para formación de CH <sub>4</sub> y CO <sub>2</sub> en rumen .....	11
Figura II. Determinación de la producción de CH <sub>4</sub> a 36 h post-incubación con concentración de 1.0 g de sustrato de especies arbóreas con contenido de taninos, utilizando a <i>A. sativa</i> (sin contenido de taninos) como referencia .....	41
Figura III. Determinación de la producción de CH <sub>4</sub> a 36 h post-incubación con concentración de 0.6 g de sustrato de especies arbóreas con contenido de taninos, utilizando a <i>A. sativa</i> (sin contenido de taninos) como referencia .....	44
Figura IV. Determinación de la producción de CH <sub>4</sub> a 36 h post-incubación con concentración de 0.8 g de sustrato de especies arbóreas con contenido de taninos, utilizando a <i>A. sativa</i> (sin contenido de taninos) como referencia .....	46

## Anexos

Anexo 1. Dibujo (diseño) del equipo de extracción de líquido ruminal .....	65
Anexo 2. Recipiente hermético para recolección de líquido ruminal .....	66
Anexo 3. Composición química (%MS) y metabolitos secundarios del heno de <i>A. sativa</i> y de las especies arbóreas forrajeras (hojarasca) .....	67

## Abreviaturas

<b>CH<sub>4</sub></b>	Metano
<b>CO<sub>2</sub></b>	Bióxido de carbono
<b>N<sub>2</sub>O</b>	Oxido nitroso
<b>NH<sub>3</sub></b>	Amoniaco
<b>H<sub>2</sub>S</b>	Sulfuro de hidrógeno
<b>H<sub>2</sub></b>	Hidrógeno
<b>GEI</b>	Gases efecto invernadero
<b>RTCM</b>	Región de Tierra Caliente Michoacán
<b>EAF</b>	Especies arbóreas forrajeras
<b>Gg</b>	Gigagramos
<b>MO</b>	Materia orgánica
<b>CHS</b>	Carbohidratos solubles
<b>TH</b>	Taninos hidrolizables
<b>TC</b>	Taninos condensados
<b>FT</b>	Fenoles totales
<b>MS</b>	Materia seca
<b>PC</b>	Proteína cruda
<b>FDN</b>	Fibra detergente neutro
<b>FDA</b>	Fibra detergente ácida
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>N</b>	Nitrógeno

## Resumen

El objetivo de la presente investigación fue analizar el efecto de las especies arbóreas forrajeras (EAF) *Cordia elaeagnoides*, *Platymiscium lasiocarpum*, *Vitex mollis* y *Haematoxylon brasiletto*, con contenido de taninos condensados (TC), sobre la producción de gas metano (CH<sub>4</sub>) *in vitro* a 24 h post-incubación. El análisis se realizó mediante la técnica de producción de gas *in vitro* con 3 niveles de concentración/especie: 0.6, 0.8 y 1.0 g y 4 repeticiones/especie/concentración. Las muestras de las EAF se incubaron a 39°C y se midió la producción de CH<sub>4</sub> a 4, 8, 12 y 24 h post-incubación. Los resultados se analizaron mediante correlación de Pearson, regresión polinomial y modelos de efectos fijos y las diferencias entre tratamientos se realizaron mediante la metodología de medias de mínimos cuadrados (LsMeans, siglas en inglés). Los resultados encontraron correlaciones negativas entre EAF-volumen total de gas ( $r = -0.40$ ;  $P < 0.001$ ); EAF-volumen de CH<sub>4</sub> producido ( $r = -0.40$ ;  $P < 0.001$ ) y concentración de sustrato-volumen de CH<sub>4</sub> producido ( $r = -0.20$ ;  $P < 0.001$ ). Así como, correlación positiva entre las horas post-incubación-volumen total de gas ( $r = 0.42$ ;  $P < 0.001$ ) y horas post-incubación-volumen de CH<sub>4</sub> producido ( $r = 0.48$ ;  $P < 0.001$ ). Las EAF: *C. elaeagnoides*, *V. mollis* y *H. brasiletto* poseen potencial, en los tres niveles de concentración analizados, para reducir la emisión de CH<sub>4</sub> *in vitro* (> 34%); en comparación con *P. lasiocarpum*, el cual solo disminuyó en un 17% la producción de CH<sub>4</sub> con base al total de CH<sub>4</sub> a 24 h del forraje referencial *A. sativa*. En base a los resultados obtenidos en la presente investigación se sugiere que, *C. elaeagnoides* -su contenido de PC, FDN y TC- es la mejor alternativa dentro de las EAF analizadas, tanto para la alimentación de los rumiantes como para el control de CH<sub>4</sub>, durante la época de estiaje.

**Palabras clave:** Especies arbóreas forrajeras, taninos condensados, metano, *in vitro*, correlación

## Abstract

The objective of the present investigation was to evaluate the effect of fodder tree species (EAF) with condensed tannin contents: *Cordia elaeagnoides*, *Platymiscium lasiocarpum*, *Vitex mollis* and *Haematoxylon brasiletto*, on *in vitro* methane (CH<sub>4</sub>) production at 24 h post incubation. The analysis was performed using the *in vitro* gas production technique, with three levels of inclusion/specie: 0.6, 0.8 and 1.0 g and with 4 replicates/specie/level of inclusion. The serum bottles with the substrate were incubated at 39°C, and the gas and CH<sub>4</sub> production were recorded at 4, 8, 12 and 24 h post incubation. The data collected was analyzed through Pearson correlation, polynomial regression and fixed effects models. The difference between treatments was done through the least square means (LsMeans) methodology. There were negative correlations between EAF-total gas volume ( $r = -0.40$ ;  $P < 0.001$ ); EAF-volume of CH<sub>4</sub> produced ( $r = -0.40$ ;  $P < 0.001$ ) and between the inclusion level-volume of CH<sub>4</sub> produced ( $r = -0.20$ ;  $P < 0.001$ ). As well as a positive correlation between hours post incubation-total gas volume ( $r = 0.42$ ;  $P < 0.001$ ) and between hours post incubation-volume of CH<sub>4</sub> produced ( $r = 0.48$ ;  $P < 0.001$ ). The EAF: *C. elaeagnoides*, *V. mollis* y *H. brasiletto* have potential, in the three inclusion levels analyzed, to reduce CH<sub>4</sub> emission on *in vitro* trials (> 34%); in comparison with *P. lasiocarpum*, which only reduced 17% the CH<sub>4</sub> production, taking into account the total CH<sub>4</sub> production at 24 h of the forage used as reference (*A. sativa*). It's suggested that *C. elaeagnoides*-according to its CP, NDF and CT content- is the best alternative within the EAF analyzed, for feeding ruminants and for the control of CH<sub>4</sub> emissions during the dry season.

**Keywords:** Fodder tree species, condensed tannins, methane, *in vitro*, correlation

## I. Introducción

El calentamiento global es una de las crisis más importantes en las últimas décadas. Los rumiantes son grandes contribuyentes a este problema ambiental y al deterioro de la capa de ozono, debido a la liberación de altas cantidades de gases como el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y el CH<sub>4</sub> (Leng, 2009). El CH<sub>4</sub>, se produce por la fermentación de los alimentos en rumen y parte baja del tracto digestivo por arqueobacterias metanogénicas y representa una pérdida de 2% a 12% de la energía bruta de los alimentos. A nivel mundial, los rumiantes generan alrededor de 80 x 10<sup>6</sup> TON de CH<sub>4</sub>/año (Johnson y Johnson, 1995).

Las estrategias de mitigación de CH<sub>4</sub> en rumiantes se han enfocado en la obtención de beneficios económico-ambientales (Thornton, 2010). Dentro de las opciones están: inhibidores químicos (Anderson *et al.*, 2008), defaunación (Morgaviet *al.*, 2008) e ionóforos (Beauchemin *et al.*, 2008); que bloquean en el rumen la metanogénesis directa o indirectamente, pero no han confirmado los efectos consistentes en la práctica. Existe una variedad de modificaciones nutricionales, tales como: aumento en la cantidad de concentrado en la dieta (Lovett *et al.*, 2003), inclusión en la dieta de leguminosas forrajeras con elevados contenidos de TC (Animut *et al.*, 2008), complementación de forrajes de baja calidad con proteínas y carbohidratos fácilmente fermentables (Benchaaret *al.*, 2001) y la adición de grasas (Machmüller *et al.*, 2003); se consideran opciones para la reducción de CH<sub>4</sub>. Las modificaciones nutricionales tienen

mayor probabilidad de ser adoptadas por los productores, ya que aumentan la eficiencia de utilización del alimento (Patra, 2011).

Se ha demostrado que el uso de diferentes plantas, tales como árboles y arbustos de leguminosas, tienen el potencial de reducir las emisiones de CH<sub>4</sub> en rumiantes. Debido a que bacterias metanogénicas viven de manera endosimbiótica con protozoarios ruminales, cualquier factor que disminuya la población protozoaria, será capaz de reducir los metanógenos y la producción de CH<sub>4</sub> (Galindo *et al.*, 2009). Igualmente, se reconoce que determinados metabolitos secundarios, como los taninos, tienen la propiedad de inhibir la metanogénesis directamente o a través de la inhibición del crecimiento de los protozoarios. La estructura química y el peso molecular de los metabolitos secundarios y la composición química de las dietas, pueden influir en el efecto de los metabolitos secundarios en la producción de CH<sub>4</sub> (Patra y Saxena, 2010).

Por otra parte, se debe tomar en cuenta la concentración de TC y su efecto en la producción de rumiantes. Waghorn (2008) señala que el consumo de alimento por los animales, se ve disminuido en dietas con altas concentraciones de taninos, debido a una reducción en la palatabilidad de la dieta y disminución en la tasa de digestión ruminal. Sin embargo, los herbívoros han desarrollado adaptaciones fisiológicas y etológicas que les permiten reducir el efecto perjudicial de los compuestos secundarios (Provenza, 1995). El medio ruminal presenta un lugar eficiente de detoxificación para un amplio rango de compuestos secundarios de las plantas (Domínguez-Bello, 1996). Probablemente, el mecanismo primario por el

cual los rumiantes pueden tolerar altos contenidos de taninos en la ración, sea mediante la adaptación de los microorganismos ruminales y su capacidad de destoxificar estos compuestos (Silanikove *et al.*, 1996), siendo así los rumiantes menos susceptibles que el resto de herbívoros a los efectos perjudiciales de los taninos (McLeod, 1974).

### **1.1. La producción ganadera en México**

La producción pecuaria muestra un crecimiento acelerado en las últimas dos décadas. En 2006, se producía 26% más ganado en comparación con la producción promedio de 1995 a 2000 y 62% más que en los años 90 (SAGARPA, 2007).

Según el INEGI (2007), a nivel nacional, un millón 129 mil unidades de producción contaban con ganado bovino, cuyas existencias fueron de 23 millones 316 mil cabezas; de las cuales, 8 millones 671 mil 516 eran vientres. De estos, 3 millones 239 mil cabezas estaban dedicadas exclusivamente a la producción de carne, 2 millones 966 mil a la producción de leche y 2 millones 466 mil para ambos tipos (doble propósito).

La actividad ganadera se desarrolla en diferentes sistemas ecológicos, tecnológicos, de manejo y contextos de objetivos de producción. En consecuencia,

hay diferentes sistemas de producción de acuerdo a las especies explotadas y productos originados. En paralelo, hay diversas especies, razas o genotipos adaptados a la producción y a las condiciones del mercado.

### **1.1.1. La Región de Tierra Caliente Michoacán, México**

La ganadería de la Región de Tierra Caliente (RTCM) en el estado de Michoacán se ha desarrollado bajo un modelo agroforestal, donde: pastos, especies arbóreas y arbustos nativos, amplios agostaderos con terrenos escarpados, clima cálido y una larga época de estiaje, son elementos característicos del sistema. El ganado utiliza como alimento principal los recursos forrajeros naturales o inducidos en los agostaderos, los esquilmos agrícolas y diferentes niveles de complementación, sobre todo energética (Molina *et al.*, 2008).

En la RTCM se registra gran diversidad de especies arbóreas forrajeras (EAF). Ganaderos de 9 municipios refieren un total de 172 EAF (Gutiérrez *et al.*, 2013). González *et al.* (2007) determinaron la composición química de 80 EAF; el 50% contienen entre 16.6 y 19.6% de proteína; que contrasta con los bajos aportes de energía y proteína que ofrecen los pastos y esquilmos agrícolas de la región, generalmente insuficientes para cubrir las necesidades de los animales (Macedo *et al.*, 2007).

## 1.2. La emisión de CH<sub>4</sub> y el efecto invernadero

Las actividades antropogénicas que generan gases, amplifican el efecto invernadero. Dichas emisiones, modifican el equilibrio energético de la tierra entre la radiación solar entrante y el calor liberado al espacio, lo cual resulta en un cambio climático.

La agricultura y la producción pecuaria contribuyen con 25% a las emisiones antropogénicas de CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>O a la atmosfera (Sejian *et al.*, 2011). El aumento en las concentraciones de gases efecto invernadero (GEI), provocan el calentamiento de la superficie terrestre y la destrucción de la capa de ozono. El CO<sub>2</sub> es considerado el más abundante y actualmente tiene mayor aporte al incremento del calentamiento global. Sin embargo, el CH<sub>4</sub> incrementa rápidamente y su efecto es 21 a 30 veces más contaminante que el CO<sub>2</sub>, considerándose que con el tiempo el CH<sub>4</sub> pueda ser predominante (Carmona *et al.*, 2005).

### 1.2.1. Inventario nacional de GEI en el sector agrícola y pecuario

En 2006, las emisiones de CH<sub>4</sub> fueron de 8,828.1 Gg, representando un incremento de 73.7% con respecto a 1990. Las principales fuentes de emisión corresponden a las categorías de desechos, energía y agricultura. Los sectores con mayor contribución porcentual de emisiones de CH<sub>4</sub> en el 2006 fueron: disposición de residuos sólidos en suelo, manejo y tratamiento de aguas residuales, emisiones fugitivas (petróleo y gas) y fermentación entérica; con 27.6,

24.9, 24.3 y 20.1%, respectivamente. Juntas representan el 96.9% de las emisiones de CH<sub>4</sub> (SEMARNAT, 2009).

La categoría del sector agropecuario promedio el 10% de las emisiones totales. Las emisiones de CH<sub>4</sub> estimado para el sector agropecuario en equivalentes de CO<sub>2</sub> fueron de 38,808.9Gg de 1990 a 2002. En la Tabla I, se muestra el equivalente a CO<sub>2</sub> para la ganadería y los cultivos.

**Tabla I.** Emisiones de CH<sub>4</sub> en el Sector Agropecuario, equivalente a CO<sub>2</sub> (Gg), 1990-2002

	Total por sector (eq. CO <sub>2</sub> )							Media
	1990	1992	1994	1996	1998	2000	2002	
Ganadería	39,969.90	39,074.55	38,417.91	36,876.94	37,682.40	37,452.43	38,521.32	38,285.1
Cultivos	653.01	623.50	528.45	521.01	573.08	484.38	283.04	523.8
<b>Total</b>	<b>40,622.91</b>	<b>39,698.05</b>	<b>38,946.36</b>	<b>37,397.95</b>	<b>38,255.48</b>	<b>37,936.81</b>	<b>38,804.36</b>	<b>38,808.9</b>

(SEMARNAT, 2006)

La media de las emisiones de CH<sub>4</sub> en el sector pecuario (rumiantes) durante el período analizado fue de 1,722.26 Gg (Tabla II), y representa los valores de la suma de la fermentación entérica y el manejo de estiércol.

**Tabla II.** Emisión de CH<sub>4</sub> en el Sector Pecuario (rumiantes) expresados en Gg de 1990 a 2002

Emisiones de CH <sub>4</sub>	1990	1992	1994	1996	1998	2000	2002
<b>Bovinos leche</b>	156.19	161.78	170.01	177.90	190.51	217.92	227.55
<b>Bovinos carne</b>	1,551.72	1,508.33	1,459.57	1,384.56	1,415.77	1,377.20	1,414.72
<b>Ovejas</b>	30.04	31.44	33.19	31.78	29.83	31.07	32.98
<b>Cabras</b>	53.75	50.13	52.83	49.26	46.55	44.82	47.01
<b>Total</b>	<b>1,791.7</b>	<b>1,751.68</b>	<b>1,715.6</b>	<b>1,643.5</b>	<b>1,682.66</b>	<b>1,671.01</b>	<b>1,722.26</b>

(SEMARNAT, 2006)

De acuerdo con la Tabla II, la producción de carne y leche de ganado bovino genera la mayor cantidad de emisiones de CH<sub>4</sub> por año. El resto de los rumiantes del sector pecuario contribuyen con muy poco en las emisiones de CH<sub>4</sub>.

### 1.3. Microbiología de la metanogénesis

En rumiantes, la mayor parte de la generación de CH<sub>4</sub> se realiza en rumen, un ecosistema microbiano complejo, diverso y anaeróbico obligado; donde los alimentos, como las hemicelulosas vegetales, se fermentan. La descomposición anaerobia de la materia orgánica de plantas en CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> es compleja, por actividad sintrófica de procariotas anaerobias y Archaeobacterias metanógenas. En la digestión anaerobia, los polímeros son hidrolizados y fermentados por los metanógenos (Figura I). Los polisacáridos se degradan a azúcares, mientras que las proteínas son degradadas a una mezcla de aminoácidos y péptidos pequeños. Los lípidos son degradados a glicerol y ácidos grasos de cadena larga.

El modelo general de la descomposición anaerobia de la materia orgánica vegetal (MO), parte de la bacteria fermentativa, la cual degrada azúcares, aminoácidos, purinas, pirimidinas y glicerol a una variedad de ácidos grasos, CO<sub>2</sub>, formiato e hidrógeno (H<sub>2</sub>). Posteriormente, la actividad bacteriana acetogénica degrada los ácidos grasos en acetato, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> y formiato, sustratos para los metanógenos. Los procesos se llevan a cabo simultáneamente, pero debido a la diferente velocidad de crecimiento y actividad de los metanogénicos involucrados, están parcialmente desacoplados, resultando en la acumulación de ácidos orgánicos. La metanogénesis es dinámica, los metanógenos influyen en el metabolismo de la actividad bacteriana fermentativa y acetogénica por transferencia de H<sub>2</sub> entre especies. Por los grupos funcionales de microorganismos involucrados la descomposición de la materia orgánica vegetal será dirigida a CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>, amonio, NH<sub>3</sub> y pequeñas cantidades de H<sub>2</sub>S (Ready *et al.*, 2010).

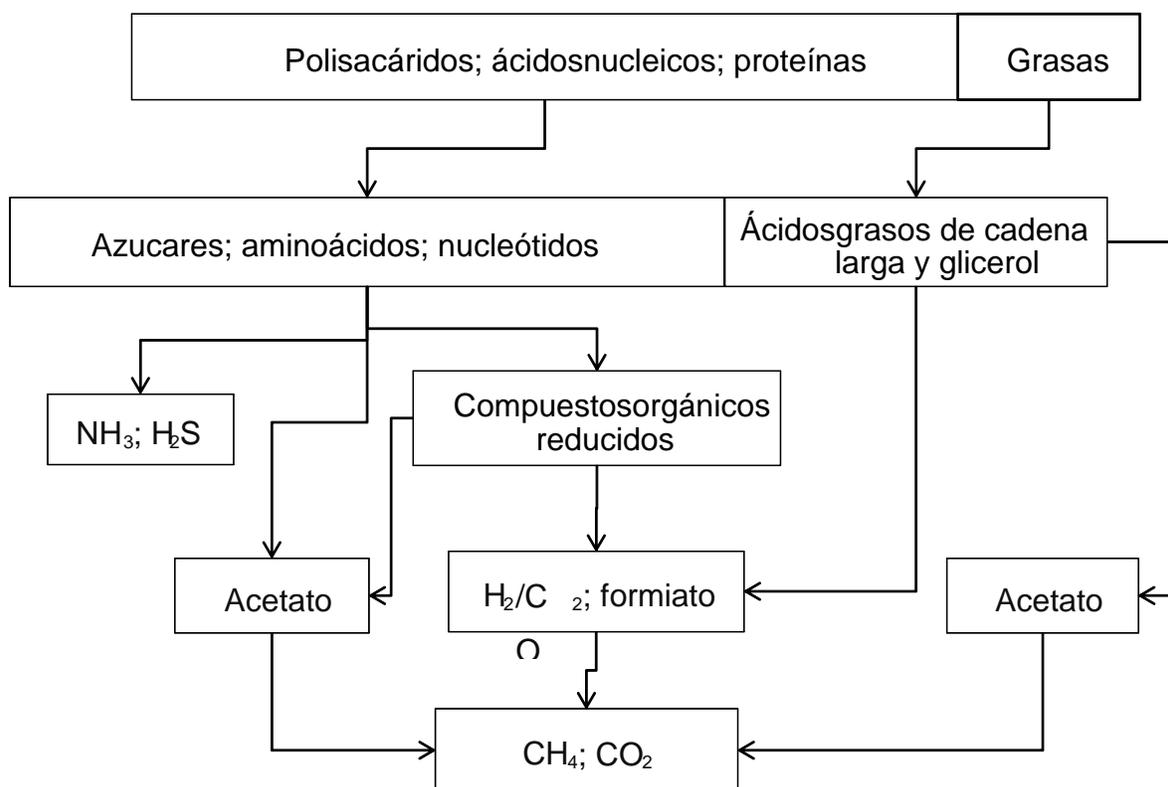


Figura I. Rutas metabólicas para formación de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub> en rumen

## 1.4. Métodos para reducir la emisión de CH<sub>4</sub> en rumiantes

### 1.4.1. Número y productividad de los animales

La generación de CH<sub>4</sub> es directamente proporcional al número de animales. El sacrificio de animales con baja o nula producción es requerido para minimizar la cantidad de CH<sub>4</sub> y mantener solo animales altamente productivos. Así, se aumenta la producción total y se disminuye la emisión de CH<sub>4</sub> por unidad de producto. Además, la prevención de enfermedades y la solución de problemas reproductivos, contribuyen en el decremento de este gas (Eckard *et al.*, 2010). Así,

los países con menos desarrollo tecnológico en donde el potencial genético de los animales no se expresa por la insuficiente alimentación, la eliminación de animales no productivos y la implementación de alternativas no convencionales en la alimentación del ganado (mayor aporte de PC y energía) podrían minimizar, sustancialmente, las emisiones de CH<sub>4</sub> (Mosset *al.*, 2000).

#### **1.4.2. Selección genética de los animales**

Se ha demostrado que, el origen del CH<sub>4</sub> en animales es diferente bajo las mismas condiciones de alimentación. Pinares-Patiño *et al.* (2003) identificaron aquellos de alta y baja generación de CH<sub>4</sub> de acuerdo al consumo de alimento. Hegarty *et al.* (2007) en rumiantes con alimentación para necesidades de mantenimiento y producción, emiten menos CH<sub>4</sub>. Sin embargo, la diferencia en la generación de este gas entre animales bajo condiciones ambientales similares, sugiere variación en el número de metanógenos/animal y/o por su constitución genética (Zhou *et al.*, 2009).

#### **1.4.3. Compuestos ionóforos**

En busca de la eficiencia en la producción de leche y carne se han usado ionóforos, como la monensina. Sin embargo, la inhibición de la metanogénesis no es a largo plazo (Guanet *al.*, 2006), y el uso de estos compuestos está prohibido en la Unión Europea y está restringida en varios países debido a residuos en la carne.

#### 1.4.4. Complementación en la dieta

En países en desarrollo, los rumiantes son alimentados con residuos de cosecha de baja calidad; deficientes en proteína, minerales y vitaminas. La complementación en dietas de baja calidad reduce la generación de CH<sub>4</sub> debido a una mejora en la eficiencia de la fermentación ruminal. Como por ejemplo, el forraje verde (trébol), avena y sorgo en dietas a base de paja y rastrojo de maíz (Haqueet *al.*, 2001). Estas dietas, con niveles apropiados de concentrado, incrementan la síntesis de propionato y disminuye la disponibilidad de H<sub>2</sub> en la formación de CH<sub>4</sub> (Lovett *al.* 2003). Al igual que la utilización en la alimentación animal de esquimos amonificados con urea (Sahoo *et al.*, 1999), los bloques multinutricionales de melaza-urea (Srivastava y Garg, 2002), son útiles en la disminución de CH<sub>4</sub>.

La utilización de grasas en la complementación de las dietas es útil para reducir la emisión de metano, sin embargo, esto depende de factores tales como: la cantidad y origen, formas de suplementación y tipos de dieta (Beauchemin *et al.*, 2008). El efecto de las grasas para minimizar la generación de CH<sub>4</sub> se debe al sinergismo entre: inhibición del crecimiento de metanógenos, número de protozoarios, reducción de la fermentación ruminal e hidrogenación de ácidos grasos insaturados, que actúan sobre la disipación de H<sub>2</sub> en rumen (Machmüller *et al.* 2003).

La inclusión de grasa en la dieta disminuye constantemente la emisión de CH<sub>4</sub> durante periodos largos. La grasa en concentración mayor a 7% disminuye significativamente el consumo y la digestión de MS; la severidad del efecto varia con la grasa usada y el tipo de dieta (Beauchemin *et al.* 2008). A pesar de la disminución de la ingesta, la adición de grasa aumenta la densidad de energía en las dietas e incrementa el rendimiento del animal y la eficiencia alimenticia.

#### **1.4.5. Defaunación**

En ocasiones, la defaunación de protozoarios del rumen se asocia con aumento de proteína microbiana y mejora la productividad animal (Patra y Saxena, 2009). Además, los metanógenos en endosimbiosis con los protozoarios, son responsables de hasta un 37% de la metanogénesis ruminal (Finlay *et al.*, 1994). Se sugiere la defaunación como una forma de reducir la formación de CH<sub>4</sub> con un mínimo efecto negativo en la digestión ruminal (Morgaviet *et al.* 2008).

### **1.5. Los metabolitos secundarios de las plantas**

En años recientes, el uso de los metabolitos secundarios vegetales como agentes potenciales de defaunación (en particular de plantas que contienen taninos) inhibe la síntesis de CH<sub>4</sub>, al suprimir o eliminar los protozoarios ruminales, sin afectar la actividad bacteriana (Patra y Saxena, 2009).

## 1.6. Los taninos

### 1.6.1. Definición y clasificación

Son compuestos químicos formados por fenoles solubles en agua con un peso molecular que varía entre los 500 y 20,000 daltones, precipitan alcaloides, carbohidratos y proteínas (Vaithiyathan y Kumar, 1993). Los taninos normalmente se dividen en dos grupos, los taninos hidrolizables (TH) y los taninos condensados (TC).

Los TH son polímeros de ácidos esterificados como: el ácido gálico, ácido egálico, ácido fecarboxílico (fenolato de ácido gallico, gallotanin) o de ácido hexaidroxydifeníl. Tienen una molécula central, como la glucosa o un polifenol como la catequina, se disocian por hidrólisis, con ácidos ó porenzimas (Leinmüller *et al.*, 1991; Reed, 1995). Los TH son potencialmente tóxicos para los rumiantes, pues se degradan por los microorganismos del rumen y absorben como pirogalol, una toxina con efecto hepatotóxico y nefrotóxico (Reed, 1995).

Los TC ó proantocianidinas, se encuentran en forrajes de leguminosas y están formados por polímeros compuestos de catequina, leucoanthocyanidinas ó sus derivados, ligados a doble carbono ó carbono-oxígeno (C-C o C-O-C), no susceptibles a hidrólisis (Leinmüller *et al.*, 1991). Los TC no son absorbidos por el animal, por lo tanto, no son tóxicos; sin embargo, están asociados con lesiones de la mucosa intestinal (Reed, 1995).

### **1.6.2. Propiedades químicas**

Los taninos, en las numerosas especies vegetales, adquieren diferentes propiedades físicas y químicas; las biológicas son diversas (Mangan, 1988). La afinidad de los taninos por proteínas, reside en el número de grupos fenólicos, que proporcionan sitios para la unión con grupos carbonilo de péptidos. La formación de tales complejos es específica, tanto del tanino como proteína implicada. En los taninos, los factores que promueven la formación de complejos incluyen: su elevado peso molecular y su flexibilidad estructural. Las proteínas de mayor afinidad para taninos son grandes e hidrófobas, tienen una estructura abierta, flexible y son ricas en prolina (Hagerman y Butler, 1991). Los complejos taninos-proteína son inestables.

Kumary Singh (1984) propusieron que la formación de complejos puede darse mediante cuatro tipos de enlace: 1) enlaces de H<sub>2</sub> reversible y dependiente del pH, entre los radicales hidroxilo (OH<sup>-</sup>) de los grupos fenólicos y el oxígeno (O<sub>2</sub>) de los grupos amida en los enlaces peptídicos de proteínas, 2) por interacciones hidrófobas reversible y dependiente del pH, entre el anillo aromático de los compuestos fenólicos y las regiones hidrófobas de la proteína, 3) por enlaces iónicos reversible entre el ion sulfito (SO<sub>3</sub>) y el sitio catiónico de la proteína exclusivo de TH, y 4) por enlace covalente irreversible a través de la oxidación de los polifenoles a quinonas y posterior condensación con grupos nucleófilos de la proteína.

### **1.6.3. Efecto de los taninos en la nutrición de rumiantes**

Los taninos pueden ser benéficos o perjudiciales para los rumiantes, esto va a depender de factores como: el tipo y cantidad consumida, estructura y peso molecular del compuesto y la fisiología de las especies que lo consumen (Hagerman y Butler, 1991).

#### **1.6.3.1. Consumo voluntario de alimento**

Hasta hace poco, la mayoría de los investigadores creía que el consumo de los taninos reducía el consumo voluntario. Sin embargo, con la información que se tiene, se hacen afirmaciones más precisas acerca de los taninos, sus dosis y sus efectos sobre las especies que los consumen. Se sugieren tres mecanismos para explicar los efectos negativos de las altas concentraciones de taninos sobre el consumo voluntario: 1) reducción en la palatabilidad de los alimentos; 2) disminución en la digestión y 3) desarrollo de aversiones condicionadas (Frutos *et al.*, 2004).

#### **1.6.3.2. Digestibilidad de la dieta**

Los taninos principalmente ejercen este efecto sobre las proteínas, pero también afectan otros componentes del alimento (Kumar y Singh, 1984). El efecto sobre las proteínas se basa en su capacidad para formar enlaces de H<sub>2</sub>, los cuales son estables entre un pH de 3.5 a 8 (aproximadamente). Estos complejos, estables a pH ruminal, se disocian cuando el pH es menor a 3.5 (abomaso, pH 2.5 a 3) o mayor

que8 (duodeno, pH 8), lo que explica la actividad de los taninos en el tracto digestivo (Hagerman *et al.*, 1992).

Las modificaciones de la digestibilidad causada por la ingestión de taninos están asociadas a los cambios en el patrón de fermentación ruminal, junto con los cambios en la digestibilidad intestinal. El aumento de N en la excreción fecal en dietas con elevado contenido de taninos muestra que estos reducen la digestibilidad de los alimentos (Frutos *et al.*, 2004).

#### **1.6.3.3. Fermentación ruminal**

La reducción de la degradación de la proteína ruminal es un efecto más importante de los taninos (Hagerman *et al.*, 1992). La afinidad de los taninos por estas moléculas y el pH del medio ruminal favorecen la formación de complejos proteína-tanino. La degradación de la proteína se asocia con menor producción de nitrógeno amoniacal y mayor deficiencia en el flujo de nitrógeno no amoniacal al duodeno (Barry y Manley, 1984). El efecto de los taninos en la degradación de proteínas es básicamente una disminución en la fracción inmediatamente degradable, y una disminución de la tasa de degradación fraccional (Hervás *et al.*, 2000).

Los taninos también tienen efecto sobre la hemicelulosa, celulosa, almidón y pectinas (Barry y Manley, 1984). Durante mucho tiempo, el efecto de los taninos sobre la degradación de la fibra fue visto como un efecto anti-

nutricional secundario. Sin embargo, varios estudios han demostrado que la degradación de la fibra en rumen, reduce drásticamente en animales que consumen alimentos ricos en taninos (Barry y McNabb, 1999).

Los mecanismos por los que los taninos reducen la degradación ruminal de los diferentes componentes de la dieta son: privación del sustrato (McMahon *et al.*, 2000), inhibición enzimática (Barry y Manley, 1984) y la acción directa sobre los microorganismos del rumen (Leinmüller *et al.*, 1991).

#### **1.6.3.4. Digestibilidad intestinal**

Si bien los TC aumentan la digestibilidad de la materia orgánica intestinal, también ejercen efecto negativo sobre la absorción de nutrientes en intestino delgado (McNabb *et al.*, 1998). Esto se atribuye a causas como: persistencia en intestino de los complejos tanino-proteína, formación de complejos entre enzimas digestivas-taninos, nuevos complejos entre taninos-proteína de la dieta ó a cambios en la absorción intestinal debido a la interacción de los taninos con la mucosa intestinal.

El complejo tanino-proteína se disocia a pH < 3.5 (pH del abomaso), sin embargo, McNabb *et al.* (1998) señalan que el pH de 5.5 al inicio del intestino, podría permitir la formación del complejo tanino-proteína e impedir la digestión. Así

mismo, Kumar y Singh (1984) sugieren que los taninos inhiben las enzimas digestivas al formar complejos insolubles ó solubles pero inactivos.

Sin embargo, la mayoría de los estudios que afirman que los taninos afectan negativamente la digestibilidad intestinal se han realizado *in vitro*. Autores indican que estos ensayos no consideran las sales biliares (Blyttet *al.*, 1988), que son detergentes y evitan la unión de taninos con enzimas digestivas.

#### **1.6.3.5. Toxicidad**

La toxicidad de los taninos está relacionada con su tamaño molecular (McLeod, 1974), taninos con elevados pesos moleculares no son absorbidos. Las intoxicaciones por TH se caracterizan por: anorexia, depresión, atonía ruminal, fallo hepático y renal, úlceras en tracto digestivo y gastroenteritis. La gravedad de las lesiones depende de la dosis y la estructura del tanino (Plumlee *etal.*, 1998). Sin embargo, la mayoría de estos trabajos son descripciones de intoxicaciones ocurridas naturalmente, por lo que es difícil saber qué tanino, y cuánto de este, estuvo involucrado.

Con respecto a los TC, dosis altas son necesarias para que ocurra una intoxicación grave (Hervás *etal.*, 2003). Finalmente, es importante señalar que las intoxicaciones provocadas por taninos sólo se producen cuando los animales

son obligados a ingerir alimento rico en taninos debido a la falta de recursos vegetales alternativos.

#### 1.6.4. Efecto de los taninos en la producción animal

Los taninos en varios tipos de forraje tienen efectos benéficos en cantidades moderadas. Barry y McNabb, (1999) señalan que la ingestión de cantidades menores a 50 g TC kg<sup>-1</sup>MS, mejora la utilización digestiva de alimento en rumiantes, debido a la reducción en la degradación ruminal de proteínas y a mayor disponibilidad de aminoácidos para la absorción en intestino delgado.

Wang *et al.* (1996a) indican que el pastoreo de *L. corniculatus* (34 g TC kg<sup>-1</sup> MS) redujo el consumo de alimento, pero aumentó la ganancia de peso vivo y peso en canal. Además de una mejora del 23% en el aumento de peso vivo cuando los corderos pastaban *Holcus lanatus* (4.2 g TC kg<sup>-1</sup>MS). Para la producción láctea, Wang *et al.* (1996b) obtienen hasta 21% de incremento durante la lactancia media y tardía en ovejas alimentadas con *L. corniculatus* (44,5 g TC kg<sup>-1</sup>MS); aumento en la eficiencia de la producción láctea, en la producción de proteína y lactosa y disminución en el contenido de grasa de la leche.

Con respecto al efecto de los TC sobre la eficiencia reproductiva, Min *et al.* (1999) observan que ovejas en pastoreo con *L. corniculatus* (17 g TC kg<sup>-1</sup>MS) aumentaron la producción de corderos hasta 25%, debido a mayores tasas de ovulación y al aumento en el porcentaje de partos.

### **1.6.5. Tratamientos para revertir el efecto negativo de los taninos**

Para revertir el efecto de los taninos, Makkar (2003) sugiere: mojar el alimento con agua o soluciones alcalinas para separar los compuestos fenólicos de las partes nutritivas; tratamientos con ceniza o urea, como fuente de álcali; cortar y almacenar las hojas (oxidación de taninos).

Alternativas recientes incluyen el tratamiento con PEG, polivinil-polipirrolidona e hidróxido de calcio (Makkar, 2003). Estos agentes, de unión a taninos, evitan la formación de complejos tanino-proteína y se han utilizado en la investigación para analizar los efectos de los taninos sobre la fermentación ruminal.

### **1.6.6. Uso práctico de los taninos**

#### ***1.6.6.1. Protección de la proteína dietética, prevención del timpanismo y control de parásitos internos***

En condiciones de pastoreo, el manejo adecuado de los recursos naturales con contenidos de taninos (el pastoreo selectivo o la suplementación con el tipo adecuado de arbustos) proporciona beneficios, con respecto a la degradación de proteínas, ya que los taninos se unen a las proteínas de los alimentos, logrando que estas no sean degradadas en rumen por parte de los microorganismos.

Otro beneficio de los taninos es la prevención del timpanismo. Los gases producidos en el rumen durante la fermentación de grandes cantidades de plantas

leguminosas (por ejemplo, alfalfa o trébol), no son liberados de forma normal, ya que están atrapados en una espuma persistente, causada por la liberación rápida de las proteínas solubles durante la masticación y degradación ruminal. Sin embargo, esto no sucede cuando estos animales se alimentan de leguminosas que contienen TC (Barry McNabb, 1999). Además, los taninos también ayudan a controlar ciertos parásitos internos de los animales. Se especula que el efecto positivo en el hospedero puede estar asociado con un efecto negativo sobre los parásitos (Miny Hart, 2003).

#### **1.6.6.2. Reducción de la emisión de CH<sub>4</sub>**

A nivel mundial, se han realizado investigaciones sobre el efecto de los metabolitos secundarios en la reducción de emisión de CH<sub>4</sub> en rumiantes. Hesse *et al.* (2006) obtienen resultados favorables en el uso de taninos como medio para limitar la emisión de CH<sub>4</sub> del ganado rumiante. La suplementación del extracto de taninos disminuyó en promedio la liberación de CH<sub>4</sub> en 13%. Así mismo, Min *et al.* (2006) mencionan que la suplementación de taninos condensados disminuye la tasa de producción de gas *in vitro* en respuesta dosis-dependiente.

Hoet *et al.* (2011) señalan que niveles relativamente bajos (15 mg de TC/ 500 mg MS) de la especie *Leucaena leucocephala* variedad Rendang redujo la generación de CH<sub>4</sub> hasta 47% con solo 7% de disminución en la degradación de MS. Del mismo modo, Gurbuz (2009) determinó que las leguminosas *Arygrobium*, *Coronilla*

*orientalis*, *Lotus corniculatus*, *vartenofolius* y *Dorycnium pentaphyllum* con contenido de taninos 0.75, 3.78, 8.97 y 18.41 mg/kg MS, respectivamente, disminuyó la generación de CH<sub>4</sub> y CO<sub>2</sub>.

Por otra parte, Jayanegara *et al.* (2009) determinan que las especies *Rhenum undulatum*, *Bergenia crassifolia*, *Rhustyphina* y *Peltiphyllum peltatum* con dosis totales de TC de 7.1, 14.1, 0.8 y 15.7 g/kg MS respectivamente tuvieron potencial (>25%) para minimizar la generación de CH<sub>4</sub> en los rumiantes. No obstante, Kumara *et al.* (2011) determinan que especies de *Eugenia jambolana* con contenido de taninos totales de 3.6% y *Mangifera indica* con 6.1% tuvieron el potencial para inhibir la metanogénesis ruminal sin afectar negativamente otras características fermentativas del rumen.

Kamra *et al.* (2009) y Delgado *et al.* (2009) determinan que las plantas con metabolitos secundarios reportaron resultados prometedores en experimentos *in vitro* con potencial como moduladores del rumen en el control de emisiones de CH<sub>4</sub> en rumiantes.

### **1.7. Especies arbóreas forrajeras de la RTCM**

En la investigación realizada por González-Gómez *et al.* (2006) en la RTCM para la determinación de fenoles totales y taninos condensados en 67 especies arbóreas con potencial forrajero se obtuvieron los siguientes resultados: de las

especies arbóreas evaluadas, 52.23% tuvieron valores menores a 2% de TC. El 19.40% registraron niveles de taninos entre 2 y 4%. El 28.25% de los árboles forrajeros, contenían niveles de taninos que varían de 5% hasta 45%. Por su parte Ávila *et al.* (2007) analizaron el contenido de taninos condensados en 50 especies arbóreas en la época de estiaje (hojarasca). El 60% de las especies contenía cantidades menores a 2% de TC. El 20% tenía entre 2 y 4% y el restante 20% presentó niveles entre 5% hasta 30%.

El cueramo (*Cordia elaeagnoides*), atuto (*Vitex mollis*), granadillo (*Platymiscium lasiocarpum*) y brasil (*Haematoxylon brasiletto*), son EAFM promisorias, ya que poseen 4 o más de los siguientes atributos: 1) producen fruto, con posible aporte de energía para el ganado; 2) proporcionan confort al animal porque se mantienen verdes (total o parcialmente); 3) contienen menos de 50 % de fibra detergente neutro y posiblemente sean de alta digestibilidad; 4) poseen menos de 5 % de taninos para que no afecten la digestibilidad de proteína; 5) tienen una concentración igual o superior a 0.2 de fósforo (Ávila *et al.*, 2011).

### 1.7.1. *Vitex mollis*

#### **Taxonomía**

**Phylum:** Magnoliophyta

**Clase:** Magnoliopsida

**Orden:** Lamiales

**Familia:** Verbenaceae

**Género:** *Vitex*

**Especie:** *mollis*

**Nombre común:** atuto

Se encuentra en la vertiente del Pacífico, desde Sonora y Chihuahua. En cañadas protegidas de la Sierra Madre Occidental hasta Oaxaca, incluyendo la cuenca del río Balsas y la zona seca de Oaxaca en la región de Cuicatlán; forma parte de las especies dominantes de selvas medianas subcaducifolias y caducifolias, en suelos someros derivados de materiales graníticos o basálticos y con buen drenaje, desde cerca del nivel del mar hasta los 1800 m (Pennington y Sarukhán, 2005).

### 1.7.2. *Haematoxylon brasiletto*

#### **Taxonomía**

**Phylum:** Magnoliophyta

**Clase:** Magnoliopsida

**Orden:** Fabales

**Familia:** Leguminosae

**Género:** *Haematoxylum*

**Especie:** *brasiletto*

**Nombre común:** brasil

Durante mucho tiempo se ha considerado a las poblaciones de la vertiente del Pacífico como pertenecientes a esta especie, la cual es sumamente parecida a *H.*

*campechianum*, pero con la inflorescencia más corta y casi fasciculada. Se encuentra en laderas, pasturas, selva baja caducifolia obosque espinoso, a menudo en hábitats perturbados. En laderas de la vertiente del Pacífico y en el interior de la cuenca de Santiago, 1000msnm y la floraciones de octubre a mayo. Desde Baja California hasta Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Chiapas (Pennington y Sarukhán, 2005).

### 1.7.3. *Cordia elaeagnoides*

#### **Taxonomía**

**Phylum:** Magnoliophyta

**Clase:** Magnoliopsida

**Orden:** Lamiales

**Familia:** Boraginaceae

**Género:** *Cordia*

**Especie:** *elaegnoides*

**Nombre común:** cueramo

Se distribuye exclusivamente en la vertiente del Pacífico en Sinaloa y desde Jalisco hasta Oaxaca, incluyendo la cuenca del río Balsas. Es un conspicuo componente de la selva mediana subcaducifolia y baja caducifolia, es la especie dominante en la parte expuesta de laderas y en las cimas de pequeñas lomas,

sobre suelos someros de origen volcánico, metamórfico y calizo, hasta una altitud de 500 msnm (Pennington y Sarukhán, 2005).

#### **1.7.4. *Platymiscium lasiocarpum***

##### **Taxonomía**

**Phylum:**Tracheophyta

**Clase:**Magnoliopsida

**Orden:**Fabales

**Familia:**Fabaceae

**Género:***Platymiscium*

**Especie:***lasiocarpum*

**Nombre común:** granadillo

Se distribuye en la vertiente del Pacífico, en Jalisco y Michoacán. Lechos de los ríos, quebradas, llanos, campos, caminos, bosques caducifoliostropicales. Desde el nivel del mar hasta 1,500 msnm en las tierras bajas y laderas de la vertiente del Pacífico, la floración y fructificaciones de enero a mayo (Barneby, 1987).

## II. Justificación

Una tecnología para reducir la emisión de GEI son las buenas prácticas de alimentación. Los animales con alta producción disminuyen la emisión de CH<sub>4</sub> sin afectar la producción total de insumos de origen animal. La selección genética de animales con menor generación de CH<sub>4</sub> es una alternativa y esta selección no compromete su producción. Otra alternativa para mitigar sin afectar la producción, es la adecuada complementación de grasa. Sin embargo, el costo de grasas y aceites comestibles podría no ser rentable para los ganaderos pecuarios.

Las investigaciones en el mundo muestran resultados positivos con el uso de taninos para evitar las emisiones de CH<sub>4</sub> en rumiantes. En el estado de Michoacán, principalmente en la Región de Tierra Caliente, González-Gómez *et al.* (2006) y Ávila *et al.* (2007) reportan el contenido de taninos en especies arbóreas forrajeras como: *Cordia elaeagnoides*, *Vitex mollis*, *Platymiscium lasiocarpum* y *Haematoxylon brasiletto*; buenas opciones de alimentación para rumiantes y alimentos que pueden bloquear la generación de CH<sub>4</sub> por la ganadería.

## III. Hipótesis

Los contenidos de taninos de las especies arbóreas *Cordia elaeagnoides*, *Vitex mollis*, *Platymiscium lasiocarpum* y *Haematoxylon brasiletto* evitarán la liberación de CH<sub>4</sub> *in vitro* de manera significativa.

## IV. Objetivos

### 4.1. Objetivo general

- Analizar *in vitro* el efecto de *Cordia elaeagnoides*, *Vitex mollis*, *Platymiscium lasiocarpum* y *Haematoxylon brasiletto* en la producción de CH<sub>4</sub> ruminal.

### 4.2. Objetivos particulares

- Caracterizar la composición fisicoquímica de las especies (% de taninos, proteína cruda, digestibilidad).
- Estandarizar la metodología *in vitro*, para la detección de CH<sub>4</sub> ruminal
- Evaluar el efecto de *Cordia elaeagnoides*, *Vitex mollis*, *Platymiscium lasiocarpum* y *Haematoxylon brasiletto* en la producción *in vitro* de CH<sub>4</sub> a corto plazo.

## V. Materiales y Métodos

### 5.1. Localización del área de estudio

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Fisiología Vegetal y el Laboratorio de Residuos Sólidos y Medio Ambiente del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

La colección de las plantas se realizó en el rancho Zacapungamio, ubicado en N 18° 57' 46'' W 101° 03' 39''; del municipio de Carácuaro ubicado en la Región de Tierra Caliente Michoacán, México. El municipio se ubica en altitud que varía de los 300 a los 1900 msnm, con grupo de climas cálidos húmedos (Aw0), y temperatura media anual mayor de 22°C, y la de invierno oscila en torno a los 18°C, y precipitación anual de 800 a 1000 mm (INEGI, 2000).

### 5.2. Composición química y metabolitos secundarios de *Cordia elaeagnoides*, *Vitex mollis*, *Platymiscium lasiocarpum* y *Haematoxylon brasiletto*

Los análisis de proteína cruda (PC), fibra detergente neutra (FDN), fibra detergente ácida (FDA), TC y FT se realizaron en el Laboratorio de Nutrición Animal en el Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatán. Los TC y FT se analizaron por la técnica de Price y Butler (1997). Las fracciones de FDN por medio de la técnica descrita por Van Soest *et al.* (1991). PC según los métodos descritos por AOAC (1995).

### 5.3. Producción de gas *in vitro*

Se utilizó la técnica descrita por Menke y Steingass (1988), modificada, se sustituyeron jeringas graduadas por frascos de 70 ml y tapón suba-seal #33 (Sigma-Aldrich) para la incubación de las EAF. La producción de gas se midió utilizando un sistema de medición de biogás (Beuvinck *et al.*, 1992).

#### 5.3.1. Material vegetal

Las EAF utilizadas como materia prima *Cordia elaeagnoides*, *Vitex mollis*, *Platymiscium lasiocarpum* y *Haematoxylon brasiletto* se colectaron a mediados del mes de diciembre. El follaje vegetal fue secado durante 48 horas a 70°C (Horno de secado Terlab) y molido con criba de 1mm (Molino Arthur H. Thomas Co. Scientific Apparatus). El material molido fue almacenado en bolsas herméticas hasta su análisis.

#### 5.3.2. Inóculo ruminal para prueba *in vitro*

El líquido ruminal se obtuvo de un toro de aproximadamente 400 kg de peso vivo, alimentado *ad libitum* (previo periodo de adaptación de 7 días) con heno de avena, suplementado con sales minerales y con acceso a agua (para asimilar las condiciones de alimentación en la época de estiaje). El inóculo ruminal se obtuvo por sondeo, mostrado en el Anexo 1 y 2, de un equipo de extracción ruminal diseñado por Geishauser (1993).

Para tranquilizar el animal se utilizó xilacina por vía intramuscular a una dosis de 0.1 mg/kg equivalente a 0.1 ml por cada 100 kg de peso vivo. La colecta se realizó a las 07:00 horas, antes de que el animal fuese alimentado; el líquido fue trasladado inmediatamente al laboratorio. En el laboratorio el líquido se filtró a través de cuatro capas de gasa y se mantuvo a 39°C bajo una atmósfera de N<sub>2</sub> (grado industrial).

### 5.3.3. Medio de cultivo para la prueba *in vitro* de producción de CH<sub>4</sub>

El medio de cultivo (Tabla III) se preparó según Menke y Steingass (1988). Está constituido por:

	<b>Cantidad (g)</b>
• <b>Macrominerales</b> (1 litro con agua destilada)	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	5.7
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6.2
MgSO <sub>4</sub>	0.6
• <b>Microminerales</b> (1 litro con agua destilada)	
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	13.2
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	10
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1
FeCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.8
• <b>Solución amortiguadora</b> (1 litro con agua destilada)	
NaHCO <sub>3</sub>	35
(NH <sub>4</sub> ) HCO <sub>3</sub>	4
• <b>Resazurina</b> (100 ml con agua destilada)	0.1

**Tabla III. Volumen requerido para preparar 600 ml de medio de cultivo**

<b>Medio de cultivo</b>	<b>Volumen (ml)</b>
Agua destilada	285
Solución macromineral	144
Solución amortiguadora	144
Solución micromineral	0.07
Resazurina	0.73
<b>Solución Reductora</b>	
Agua destilada	28.5
Hidróxido de sodio	1.2
Sulfuro de sodio (mg)	201.6

El medio se preparó y se inoculó con técnicas asépticas en anaerobiosis utilizando un termo agitador (Isotemp, Fisher Scientific) para mantener la temperatura a 39°C y con flujo continuo de N. Para el proceso de fermentación se utilizaron botellas de vidrio color ámbar de 70 ml selladas con tapones de caucho (Suba-Sealsepta red rubber #33, Sigma-Aldrich). Utilizando una balanza analítica (Explorer Pro, Ohaus), se pesaron 600, 800 y 1000 mg de cada especie a evaluar; se incubaron junto con 30 ml de la mezcla integrada por líquido ruminal y medio de cultivo, en una relación de una parte de líquido ruminal y dos partes de medio de cultivo. Para la producción de gas se incubaron las botellas, sin agitar y previo barrido del headspace con N, a 39°C por un período de 24 horas (Makkaret *al.*, 1995). Después de realizar las lecturas, las botellas se agitaron y se colocaron nuevamente en la incubadora.

#### **5.3.4. Medición de producción de gas *in vitro* y producción de CH<sub>4</sub>**

Para cuantificar la producción de CH<sub>4</sub> se utilizó un cromatografo de gases (CG) Varian CP-3800, el cual funciona con un detector FID y una columna empacada HAY-ESEP-Q-80-100-MESH, las temperaturas de operación del inyector, el detector y la columna son 170, 170 y 90°C respectivamente. El gas de arrastre utiliza un flujo de 30 ml/min. Para su operación se usó el programa Galaxie Workstation. Antes de cada determinación se cambió el septo del CG (3/8 CR246124, Varian) y se calibró con 9 inyecciones de CH<sub>4</sub> (Praxair grado reactivo): 3 inyecciones de 10 µL, 3 de 20 µL y 3 de 30 µL. Se tomó 30 µL de la muestra de cada frasco incubado con una jeringa cromatográfica (Hamilton Company chromatographysyringes) a las 4, 8, 12 y 24 horas post inoculación.

La producción de gas se midió utilizando un sistema de medición de biogás. Este sistema mide la cantidad de agua desplazada (ml) debido a la acumulación de gas en el headspace de los frascos. Esto se realizó a las 4, 8, 12 y 24 horas, después de medir la producción de CH<sub>4</sub>.

#### **5.3.5. Análisis estadístico**

Con la información recabada se elaboró una base de datos para su análisis estadístico mediante la metodología de correlación de Pearson, regresión polinomial, modelos de efectos fijos y las diferencias entre tratamientos se obtuvieron mediante la metodología de medias de mínimos cuadrados (LS means, por sus siglas en inglés). El paquete estadístico utilizado fue

StatisticalAnalysisSystem (SAS, 2000). El modelo utilizado para la regresión polinomial fue:

$$\hat{Y}_i = \beta_0 + \beta_1 * N + \beta_2 * t + \beta_2 * t^2$$

Dónde:

$\hat{Y}_i$  = producción de CH<sub>4</sub> de: *A. sativa*, *C. elaeagnoides*, *P. lasiocarpum*, *V. mollis* y *H. brasiletto*

**N** = nivel de concentración

**t** = horas post-incubación

Para el modelo de efectos fijos se utilizó el siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

Dónde:

$Y_{ij}$  = producción de CH<sub>4</sub> a 24 h

$\mu$  = promedio general

$T_i$  = tratamiento con  $i = A. sativa$  0.6, 0.8 y 1.0 g; *C. elaeagnoides* 0.6, 0.8 y 1.0 g;... *H. brasiletto* 0.6, 0.8 y 1.0 g

$E_{ij}$  = error (NID~0,  $\hat{\sigma}^2$ )

## VI. Resultados y discusión

### 6.1. Metabolitos secundarios de las especies arbóreas forrajeras y su efecto sobre la producción de gas y CH<sub>4</sub>

De acuerdo con el análisis de los metabolitos secundarios, como son los TC y FT de las especies arbóreas analizadas, se encontró un rango de 0.98 a 60.78% de TC y de 2.21 a 19.62% de FT (Tabla IV); lo que permite destacar que la especie *H. brasilettoes* la que muestra tendencia hacia un mayor contenido de TC y FT: 60.78 y 19.62%, respectivamente. Mientras que *C. elaeagnoides* 0.98% de TC y 2.21% de FT. Resultados que difieren de los obtenidos por Ávila *et al.* (2007), quienes encontraron en *H. brasiletto*, 14.65 y 6.61% de TC y FT, respectivamente y en *C. elaeagnoides*, 0.34 y 0.54% de TC y FT, en su orden.

**Tabla IV.** Porcentaje de taninos condensados y fenoles totales de las especies arbóreas forrajeras de la región de Tierra Caliente Michoacán

Especie	Taninos condensados*	Fenoles totales**
<i>A. sativa</i>	ND	ND
<i>V. mollis</i>	10.91	9.22
<i>C. elaeagnoides</i>	0.98	2.21
<i>P. lasiocarpum</i>	1.96	4.43
<i>H. brasiletto</i>	60.78	19.62

<sup>ND</sup>= No detectado; \*Equivalentes a Catequina; \*\*=Equivalentes a Acido Gálico

Posiblemente estas diferencias en los porcentajes de TC y FT, en las especies arbóreas analizadas, se debieron a factores tales como: temperatura, intensidad de la luz, agua, topografía ó calidad del suelo; factores que pueden mantener a la

planta en confort o en estrés; que influyen en la concentración de metabolitos secundarios en las plantas (Waghorn, 2008).

El uso de los metabolitos secundarios en las plantas ha sido utilizado para analizar su efecto en la inhibición de la producción de CH<sub>4</sub> en rumiantes. Hessel *et al.* (2006), establecen que en rumiantes el uso de taninos reduce la emisión de CH<sub>4</sub> hasta en 13%. Lo que concuerda con Min *et al.* (2006), quienes determinan que los TC reducen en respuesta dosis-dependiente la cantidad de gas *in vitro*. No obstante, Jayanegara *et al.* (2009) sugieren que los TC, en sinergia con la digestión de la fibra, disminuye la producción de CH<sub>4</sub>. Las EAF de la región de Tierra Caliente Michoacán poseen concentraciones de TC; por lo que, las cuatro especies utilizadas en este estudio fueron seleccionadas con el fin de poner a prueba su capacidad para disminuir la producción de CH<sub>4</sub> *in vitro*.

Al respecto, a continuación se discute el efecto de los TC en las especies arbóreas empleadas para inhibir la generación de CH<sub>4</sub> *in vitro*.

## **6.2. Efecto de especies arbóreas con contenido de taninos sobre la producción de gas *in vitro* y producción de CH<sub>4</sub> en un lapso de 24 h post-incubación**

Los resultados mostraron la existencia de correlaciones negativas (Tabla V) entre especie arbórea-volumen total de gas *in vitro* ( $r = -0.40$ ;  $P < 0.05$ ) y especie arbórea-volumen de CH<sub>4</sub> producido ( $r = -0.40$ ;  $P < 0.05$ ). Lo que implicó la disminución total de gas y de CH<sub>4</sub> producido *in vitro* en presencia de sustratos de

especies arbóreas que contienen TC. Resultados que concuerdan con Bhatta *et al.* (2009) y Jayanegara *et al.* (2011), quienes también encontraron una correlación negativa entre contenido de taninos y producción de CH<sub>4</sub>; por lo que, conforme aumenta el contenido de taninos, disminuye la producción de CH<sub>4</sub>. Salem (2005) y Salem *et al.* (2007), concluyen que, a mayor cantidad de compuestos secundarios contenidos en las especies arbóreas menor es la producción de gas *in vitro*.

**Tabla V.** Coeficientes de Correlación de Pearson para los indicadores: tipo de especie vegetal, concentración, horas post-incubación, volumen de gas y volumen de CH<sub>4</sub>

	EAF	CON	Hp	VG	VM
EAF	1.0				
CON	0.0 <sup>NS</sup>	1.0			
Hp	0.0 <sup>NS</sup>	0.0 <sup>NS</sup>	1.0		
VG	-0.40 <sup>**</sup>	0.01 <sup>NS</sup>	0.42 <sup>**</sup>	1.0	
VM	-0.40 <sup>**</sup>	-0.20 <sup>**</sup>	0.48 <sup>**</sup>	0.87 <sup>**</sup>	1.0

EAF= Especie arbórea forrajera; CON=concentración de sustrato de EAF; Hp= Horas post-incubación; VG= Volumen total de gas; VM= Volumen de CH<sub>4</sub>.

<sup>NS</sup>= No significativo estadísticamente (P > 0.05)

<sup>\*\*</sup>= Altamente significativo estadísticamente (P < 0.001)

De acuerdo con la Tabla V, concentración de sustrato (CON) sólo se correlacionó de forma negativa con volumen de CH<sub>4</sub>(VM) (r = -0.20; P < 0.001); es decir, a mayor CON menor cantidad de VM. Resultados que concuerdan con Hoet *et al.* (2011), Huang *et al.* (2010) y Bhatta *et al.* (2009), quienes encontraron que, a mayor nivel de concentración de TC menor producción de CH<sub>4</sub>. En relación a la correlación entre horas post-incubación (Hp)-volumen total de gas (VG) (r = 0.42; P < 0.001) y Hp-VM (r = 0.48; P < 0.001), estas fueron positivas, es decir,

conforme transcurren las horas de incubación, se incrementa el volumen de gas y de CH<sub>4</sub>. Aspecto que concuerda con Salem (2005), quien determinó que el perfil de producción acumulada de gas a 24 h está en función de las horas post-incubación, tratándose de especies arbóreas con contenido de TC .

Por otra parte, se encontró que la producción total promedio de CH<sub>4</sub>, en el transcurso de 24 h, fue de 33.9 ± 0.70 ml, con un CV 2.1% y una R<sup>2</sup> = 0.99. Promedio afectado por el tratamiento (P<0.001), las horas post-incubación (P < 0.001) y la interacción tratamiento\*horas post-incubación (P< 0.001). Resultado que concuerda con Meagher *et al.* (2005), O'Kiely *et al.* (2011), Selmi *et al.* (2013); mismos que establecieron que la cantidad de compuestos secundarios (TC y FT) contenidos en cada forraje determinan la producción de CH<sub>4</sub> durante la fermentación. Así mismo, Salem (2005) y Abdalla *et al.* (2012) determinaron que el CH<sub>4</sub> se incrementa conforme transcurren las horas post-incubación, pero este aumento está en función de la concentración de TC del sustrato.

En relación al efecto de tratamiento sobre la producción total de CH<sub>4</sub> (a 24 h post-incubación) se encontró que, la producción de CH<sub>4</sub> fue menor (P < 0.05) en los tratamientos con *C. elaeagnoides* y *H. brasiletto* a una concentración de 1.0 g (Tabla VI). Con respecto a la producción de CH<sub>4</sub> derivado de la especie *H. brasiletto*, es posible que esta menor cantidad de CH<sub>4</sub> (Figura II; Tabla VII) esté relacionada con el alto contenido de TC presentes en esta especie.

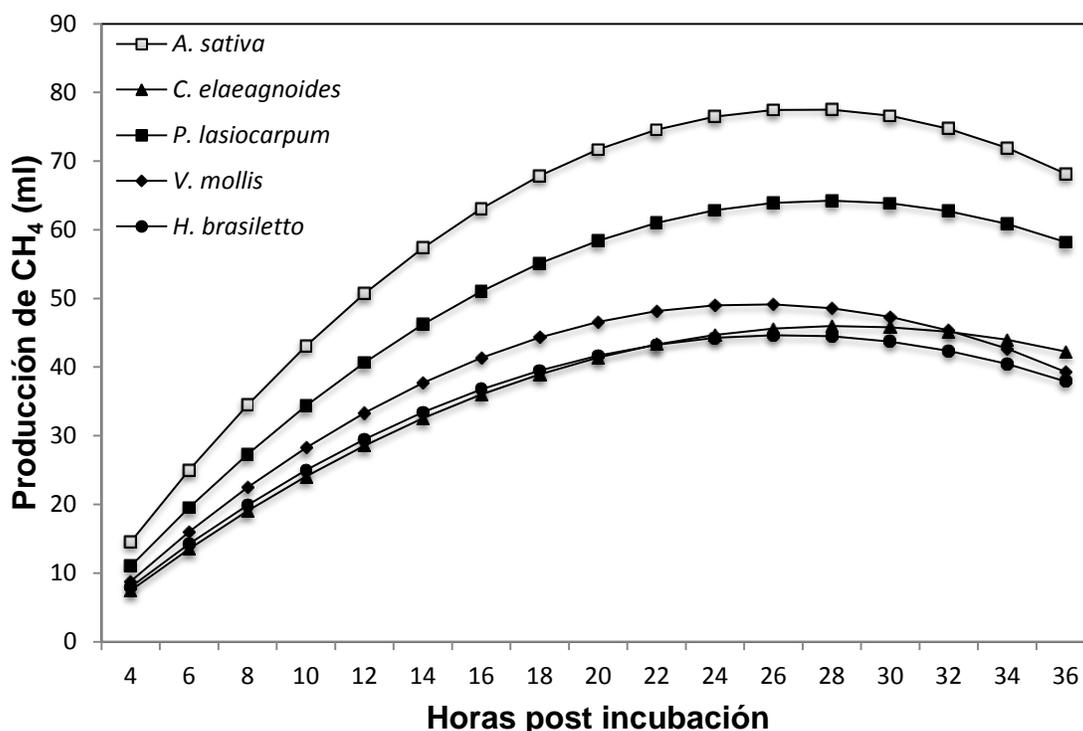


Figura II. Determinación de la producción de CH<sub>4</sub> a 36 h post-incubación con concentración de 1.0 g de sustrato de especies arbóreas con contenido de taninos, utilizando a *A. sativa* (sin contenido de taninos) como referencia

En la Figura II se puede observar que, la producción máxima de CH<sub>4</sub> en *H. brasiletto* y en *C. elaeagnoides* fue a 26 y 28 h post incubación con 44.7 ml y 46.0 ml, respectivamente; ambos estadísticamente iguales ( $P < 0.05$ ). En comparación con *P. lasiocarpum*, especie que presentó la máxima producción de CH<sub>4</sub> (64.3 ml) a 28 h: En el nivel de concentración de 1.0 g, *P. lasiocarpum* produjo 17.0% menos CH<sub>4</sub> con respecto con *A. sativa*; mientras que la reducción en la producción de CH<sub>4</sub> producido por *V. mollis*, *C. elaeagnoides* y *H. brasiletto* con respecto a *A. sativa*, fue del 36.5, 40.8 y 39.9%, respectivamente (Tabla VIII).

**Tabla VI.** Volumen total de CH<sub>4</sub> producido *in vitro* a las 24 horas de acuerdo al tipo de especie vegetal y concentración usada

Tratamiento	Concentración (g)	Promedio (ml)	Error	Pr >  t
<i>A. sativa</i>	0.6	81.68 <sup>a</sup>	0.47	< .001
<i>C. elaeagnoides</i>	0.6	45.75 <sup>b</sup>	0.47	< .001
<i>V. mollis</i>	0.6	51.49 <sup>c</sup>	0.47	< .001
<i>P. lasiocarpum</i>	0.6	67.42 <sup>d</sup>	0.47	< .001
<i>H. brasiletto</i>	0.6	46.12 <sup>b</sup>	0.47	< .001
<i>A. sativa</i>	0.8	87.98 <sup>e</sup>	0.47	< .001
<i>C. elaeagnoides</i>	0.8	52.99 <sup>f</sup>	0.47	< .001
<i>V. mollis</i>	0.8	58.07 <sup>g</sup>	0.47	< .001
<i>P. lasiocarpum</i>	0.8	72.51 <sup>h</sup>	0.47	< .001
<i>H. brasiletto</i>	0.8	51.11 <sup>i</sup>	0.47	< .001
<i>A. sativa</i>	1.0	66.63 <sup>d</sup>	0.47	< .001
<i>C. elaeagnoides</i>	1.0	43.09 <sup>j</sup>	0.47	< .001
<i>V. mollis</i>	1.0	44.79 <sup>b</sup>	0.47	< .001
<i>P. lasiocarpum</i>	1.0	54.16 <sup>f</sup>	0.47	< .001
<i>H. brasiletto</i>	1.0	41.95 <sup>j</sup>	0.47	< .001

Literales distintas en la misma columna muestran diferencia estadística (p<0.05)

Jayanegara *et al.* (2009), Huang *et al.* (2010) y Ho *et al.* (2011), establecieron que, a mayor concentración de TC menor es la producción total de CH<sub>4</sub>. Carulla *et al.* (2005), atribuyen la disminución en la producción de CH<sub>4</sub> de la especie *A. mearnsii* al efecto directo de los TC, especie arbórea que contiene 61.5% de TC, Mientras que en *H. brasiletto* se encontró 60.78% de TC.

Getachewet *al.* (1998), señalan que, el aumento en el nivel de concentración de sustrato produce disminución en la producción de gas ruminal por cada gramo de MS, debido a la baja proporción de microorganismos en relación al sustrato o al agotamiento del tampón. Aspecto que pudiera asociarse con la disminución de CH<sub>4</sub> en las especies *C. elaeagnoides* y *H. brasiletto* analizadas a una concentración de 1.0 g.

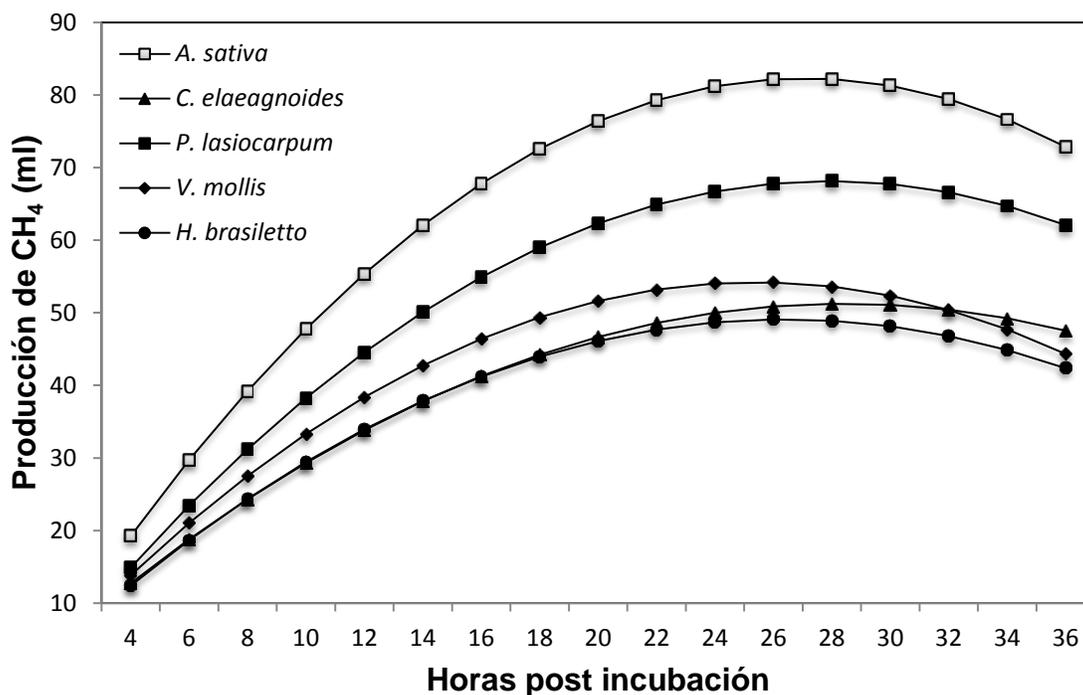
**Tabla VII.** Coeficientes de regresión polinomial para la determinación del volumen de CH<sub>4</sub> producido a las 24 horas de acuerdo a la especie vegetal, concentración y horas post-incubación

Sustrato	Intercepto $\beta_0$	Concentración $\beta_1$	Horas $\beta_2$	Horas <sup>2</sup> $\beta_3$
<i>A. sativa</i>	2.52089549 <sup>NS</sup>	-11.7265625*	6.41402337**	-0.11844884**
<i>C. elaeagnoides</i>	6.99969843**	-13.15937500**	3.66891287**	-0.06453326**
<i>V. mollis</i>	4.92418048 <sup>NS</sup>	-12.5984375**	4.47458621**	-0.08803983**
<i>P. lasiocarpum</i>	1.425105893 <sup>NS</sup>	-9.696875000*	5.195404006**	-0.093010186**
<i>H. brasiletto</i>	4.79146179*	-11.07968750**	3.86153718**	-0.07312975**

<sup>NS</sup> = No significativo (P>0.05); \* = Significativo (P<0.05); \*\* = Altamente significativo (P < 0.001)

No obstante, al analizar los volúmenes totales de CH<sub>4</sub> obtenidos con niveles menores de concentración a 1.0 g (Tablas VI y VII; Figura III), se observó el mismo comportamiento en la producción de este gas; es decir, una disminución en la producción de CH<sub>4</sub> (P < 0.05) con las especies arbóreas *H. brasiletto* y *C. elaeagnoides*: las cuales produjeron la menor cantidad de CH<sub>4</sub> con un nivel de concentración de 0.6 g. Estos resultados confirman que el contenido de TC presentes en estas especies, y no a la saturación del sustrato, fue lo que ocasionó

una menor acción de los microorganismos ruminales responsables de la producción de CH<sub>4</sub>.



**Figura III. Determinación de la producción de CH<sub>4</sub> a 36 h post-incubación con concentración de 0.6 g de sustrato de especies arbóreas con contenido de taninos, utilizando a *A. sativa* (sin contenido de taninos) como referencia**

En la Figura III se observa que la producción máxima de CH<sub>4</sub> en *H. brasiletto* fue de 49.1 ml a 26 h post-incubación y *C. elaeagnoides* presentó la máxima producción a 28 h post-incubación (51.2 ml). Valores inferiores a *P. lasiocarpum*, misma que produjo 68.2 ml de CH<sub>4</sub> como máximo en 28 h. Así mismo, la concentración de 0.6 g de las especies arbóreas determinó que, *P. lasiocarpum* produjo 17.0% menos del gas CH<sub>4</sub>, en comparación con la reducción del 37.7 y 40.3% de producción de CH<sub>4</sub> con las especies *C. elaeagnoides* y *H.*

*brasiletto*, respectivamente; reducción en torno a 82.2 ml de producción máxima de CH<sub>4</sub> obtenido con *A. sativa* (Tabla VIII).

Por otra parte, en el nivel de concentración de 0.8 g, se encontraron diferencias entre tratamientos ( $P < 0.05$ ), incluido el tratamiento referencial (*A. sativa*). Dentro de los tratamientos, con los sustratos que poseen TC, la mayor producción de CH<sub>4</sub> a 24 h post-incubación fue para *P. lasiocarpum* (72.51 ml) y el sustrato que generó menos gas fue *H. brasiletto* (51.11 ml) (Tabla VI; Figura IV). Waghorn *et al.* (2002) atribuyen que los TC tienen un efecto sobre los protozoarios ruminales y en consecuencia disminuye la producción de CH<sub>4</sub> hasta en un 16%. Al respecto, *C. elaeagnoides*, mostró una menor concentración de TC (Tabla IV), pero mayor concentración de PC (16.7%) y un menor valor de FDN (igual a 40.9%), en comparación con los valores de *A. sativa*: 7.79 y 63.25% para PC y FDN, respectivamente (Anexo 3).

Tanto la PC y la FDN en *C. elaeagnoides*, podría ser la respuesta de la menor producción de CH<sub>4</sub> por esta especie arbórea forrajera (Figura IV). Kume (2002), sugiere que, la reducción de CH<sub>4</sub> es atribuido al bajo contenido de FDN y a un alto contenido de PC. Lo que concuerda con Meagher *et al.* (2005), ellos utilizaron la especie *M. sativa*, misma que está exenta de TC, pero con bajos niveles de FDN (34.8%) y alto contenido de PC (30.1%), lo que ocasiona una reducción en el volumen de CH<sub>4</sub>. Jayanegara *et al.* (2009), determinaron que los altos contenidos de FDN en los forrajes ocasiona aumento en la producción de CH<sub>4</sub>, debido a que

cambia la proporción de ácidos grasos volátiles de cadena corta hacia acetato, el cual produce más H<sub>2</sub>.

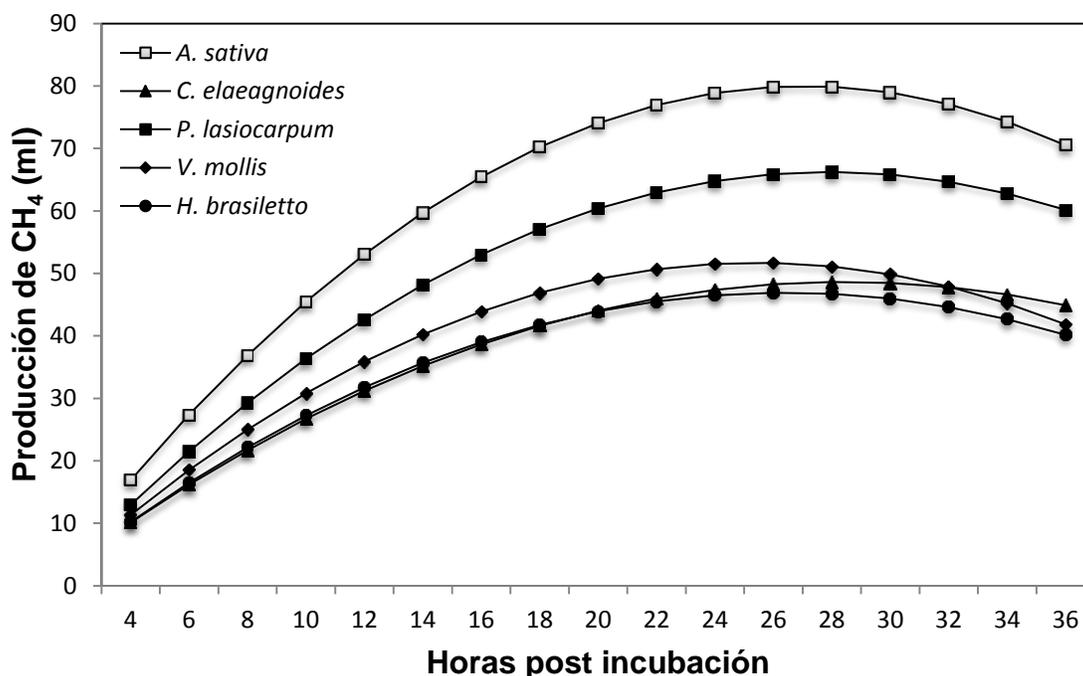


Figura IV. Determinación de la producción de CH<sub>4</sub> a 36 h post-incubación con concentración de 0.8 g de sustrato de especies arbóreas con contenido de taninos, utilizando a *A. sativa* (sin contenido de taninos) como referencia

En la Figura IV se observa que, *H. brasiletto* produjo como máximo 46.9 ml de CH<sub>4</sub> en 26 h post-incubación y *C. elaeagnoides* 48.6 ml en 28 h post-incubación. Valores inferiores ( $P < 0.05$ ) a los obtenidos por *P. lasiocarpum*, 66.2 ml en 28 h post-incubación. En este nivel de concentración de sustrato (0.8 g), *P. lasiocarpum* redujo la producción de CH<sub>4</sub> en 17.1% y *H. brasiletto* en 41.3%, tomando como referencia la máxima producción de CH<sub>4</sub> por *A. sativa*: 79.9 ml en 28 h post-incubación (Tabla VIII).

**Tabla VIII.** Disminución de CH<sub>4</sub> de acuerdo a la especie vegetal, concentración y hora de máxima producción post-incubación con respecto a *A. sativa*

Especie	Concentración	HMP post-incubación	MPCH <sub>4</sub>	Disminución <sup>&amp;</sup> de CH <sub>4</sub> (%)
	1 g	28	77.5 <sup>Z</sup>	--
<i>A. sativa</i>	0.8 g	28	79.9 <sup>W</sup>	--
	0.6 g	28	82.2 <sup>Q</sup>	--
<i>V. mollis</i>	1 g	26	49.2	36.5
<i>P. lasiocarpum</i>	1 g	28	64.3	17.0
<i>C. elaeagnoides</i>	1 g	28	45.9	40.8
<i>H. brasiletto</i>	1 g	26	46.6	39.9
<i>V. mollis</i>	0.8 g	26	51.7	35.3
<i>P. lasiocarpum</i>	0.8 g	28	66.2	17.1
<i>C. elaeagnoides</i>	0.8 g	28	48.6	39.2
<i>H. brasiletto</i>	0.8 g	26	46.9	41.3
<i>V. mollis</i>	0.6 g	26	54.2	34.1
<i>P. lasiocarpum</i>	0.6 g	28	68.2	17.0
<i>C. elaeagnoides</i>	0.6 g	28	51.2	37.7
<i>H. brasiletto</i>	0.6 g	26	49.1	40.3

HMP post-incubación= Hora de máxima producción de CH<sub>4</sub> post-incubación; MPCH<sub>4</sub>= Máxima producción de CH<sub>4</sub>

&= disminución de CH<sub>4</sub> en base a producción máxima de *A. sativa*/nivel de concentración.

<sup>Z</sup>=Valor tomado como 100% de producción máxima a un nivel de 1 g

<sup>W</sup>=Valor tomado como 100% de producción máxima a un nivel de 0.8 g

<sup>Q</sup>=Valor tomado como 100% de producción máxima a un nivel de 0.6 g

Por último y de acuerdo con la Tabla VIII, las EAF con la menor contribución (porcentaje) en la disminución de CH<sub>4</sub> fueron: *P. lasiocarpum* y *V. mollis*, en los tres niveles de concentración analizados. *P. lasiocarpum* solo fue capaz de disminuir la producción de CH<sub>4</sub> en 17.0%, tomando como referencia a *A. sativa*. Mientras que *V. mollis* contribuyó en la disminución de CH<sub>4</sub> dentro de un rango de

34.1 a 36.5%, dependiendo del nivel de concentración. Finalmente, las especies con un mayor potencial para contribuir a la disminución de CH<sub>4</sub> fueron *C. elaeagnoides* y *H. brasiletto*, no obstante, de acuerdo con el contenido de PC, FDN y TC, *C. elaeagnoides* pudiera considerarse como la mejor especie arbórea forrajera en la alimentación de los rumiantes y en el control de CH<sub>4</sub>. En relación con lo anterior, Waghorn (2008) señala que el consumo de alimento por los animales se ve disminuido en dietas con altas concentraciones de taninos. Al respecto, se tiene que tomar en cuenta la utilización de *H. brasiletto* en la dieta de los rumiantes, por ser el que obtuvo mayor concentración de TC.

## VII. Conclusiones

Hubo una correlación negativa entre la concentración de las especies arbóreas forrajeras probadas y el volumen de CH<sub>4</sub> generado *in vitro* durante 24 h. Lo que significa que a mayor concentración de 0.6 a 1 g, se reduce la producción de CH<sub>4</sub>. Así mismo, la regresión polinomial estableció que la especie arbórea forrajera que favoreció la generación de CH<sub>4</sub> después de 24 h post-incubación fue *P. lasiocarpum*, en las tres concentraciones; 0.6, 0.8 y 1 g. Mientras que *H. brasiletto* y *C. eleagnoides* fueron las especies arbóreas forrajeras con el mayor potencial de inhibición de CH<sub>4</sub> en 24 h, a concentración de 1 g. En síntesis, de acuerdo con el contenido de PC, FDN y TC en *C. eleagnoides* es la mejor alternativa tanto para la alimentación de los rumiantes como para la inhibición de CH<sub>4</sub>, durante la época de estiaje.

## VIII. Literatura Citada

1. Abdalla, A. L., Louvandini, H., Sallam, S. M. A. H., Bueno, I. C. D. S., Tsai, S. M., and Figueira, A. V. D. O. 2012. *In vitro* evaluation, *in vivo* quantification, and microbial diversity studies of nutritional strategies for reducing enteric methane production. *Tropical Animal Health and Production*, 44(5), 953–64.
2. Anderson, R.C., Krueger, N.A., Stanton, T.B., Callaway, T.R., Edrington, T.S., Harvey, R.B., et al., 2008. Effects of select nitrocompounds on *in vitro* ruminal fermentation during conditions of limiting or excess added reductant. *Bioresource Technology*. 99, 8655-8661.
3. Animut, G., Goetsch, A. L., Puchala, P., Patra, A. K., Sahlu, T., Varel, V. H. *et al.*, 2008. Methane emission by goats consuming diets with different levels of condensed tannins from lespedeza. *Animal Feed Science and Technology*. 144, 212-227.
4. AOAC. 1995. *Official Methods of Analysis*, 16<sup>th</sup> ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
5. Ávila, R. N.A. 2007. Arboles y arbustos con potencial forrajero de la selva baja caducifolia en el Municipio de la Huacana, Michoacán, México. Tesis, Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo-Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales. 115p.
6. Ávila, R.N.A., González, G.J.C., Gutiérrez, V.E., Juárez, C.A. y Maldonado, H.G.I. 2011. Especies arbóreas promisorias de la selva baja caducifolia (SBC) en el

estado de Michoacán, México. XXXIX Reunión Anual de la Asociación Mexicana de Producción Animal. Chapingo, México: 4 y 5 de mayo.

7. Barneby, C. R. 1987. Flora Novo-Galiciana: Vol. 5, Leguminosae. Brittonia; 39(3): 405 p.
8. Barry, T.N. and Manley, T.R. 1984. The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep. 2. Quantitative digestion of carbohydrates and proteins. British Journal of Nutrition. 51: 493-504.
9. Barry T.N. and McNabb, W.C. 1999. The implications of condensed tannins on the nutritive value of temperate forages fed to ruminants. British Journal of Nutrition. 81: 263-272.
10. Beauchemin, K. A., Kreuzer, M., O'Mara, F., and McAllister, T. A. 2008. Nutritional management for enteric methane abatement: A review. Australian Journal of Experimental Agriculture. 48: 21-27.
11. Benchaar, C., Pomar, C. and Chiquette, J. 2001. Evaluation of diet strategies to reduce methane production in ruminants: A modelling approach. Canadian Journal of Animal Science. 81, 563-574.
12. Beuvink, J., Spoelstra, S. and Hogendorp, R. 1992. An automated method for measuring time course of gas production of feedstuffs incubated with buffered rumen fluid. Netherlands Journal of Agricultural Science: 40, 401–407.
13. Bhatta, R., Uyeno, Y., Tajima, K., Takenaka, A., Yabumoto, Y., Nonaka, I., Enishi, O. and Kurihara, M. 2009. Difference in the nature of tannins on *in vitro* ruminal methane and volatile fatty acid production and on methanogenic archaea and protozoal populations. Journal of Dairy Science. 92: 5512-5522.

14. Blytt, H.J., Guscar, T.K. and Butler, L.G. 1988. Antinutritional effects and ecological significance of dietary condensed tannins may not be due to binding and inhibiting digestive enzymes. *Journal of Chemical Ecology*. 14: 1455-1465.
15. Carmona, J. C., Bolívar, D. M. y Giraldo, L. A. 2005. El gas metano en la producción ganadera y alternativas para medir sus emisiones y aminorar su impacto a nivel ambiental y productivo. *Revista Colombiana Ciencias Pecuarias*. 18: 49-63.
16. Carulla, J.E., Kreuzer, M., Machmüller, A., Hess, H.D., 2005. Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. *Australian Journal of Agricultural Research*. 56, 961–970.
17. Delgado, D.C., Galindo, J., Gonzales, R. and Gonzales, N. 2009. Potential of tropical plants to exerting defaunating effects on the rumen and to reduce the methane production. *FAO/IAEA International Symposium on Sustainable Improvement of Animal Production and Health*. 167-168.
18. Domínguez-Bello, M.G. 1996. Detoxification in the rumen. *Annales de Zootechnie*. 45, suppl.: 323-327.
19. Eckard, R. J., Grainger, C., and de Klein, C. A. M. 2010. Options for the abatement of methane and nitrous oxide from ruminant production: A review. *Livestock Science*. 130: 47-56.
20. Finlay, B. J., Esteban, G., Clarke, K. J., Williams, A. G., Embley, T. M., and Hirt, R. R. 1994. Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens. *FEMS Microbiology Letters*. 117: 157-162.

21. Frutos, P., Hervás, G., Giráldez, F. J. and Mantecón, A. R. 2004. Review: Tannins and ruminant nutrition. Spanish Journal of Agricultural Research.2(2): 191-202.
22. Galindo, J., Gonzales, N., Delgado, D., Sosa, A., Marrero, Y., Gonzales, R., Aldana, A. I. y Moreira, O. 2008. Efecto modulador del *Leucaenaleucocephala* sobre la microbiota ruminal. Zootecnia Tropical. 26(3): 249-252.
23. Galindo, J., González, N., Marrero, Y., Sosa, A., Aldama, A., Moreira, O., Delgado, D., Ruiz, T., Febles, G., Torres, V., La O, O., Sarduy, L., Noda, A y Achang, O. 2009. Los árboles como controladores de la producción de metano en rumen. Memorias VIII Taller Internacional Los árboles y Arbustos en la Ganadería. 20 y 23 de octubre. Varadero Cuba. pp 190.
24. Geishauser, T. 1993. An instrument for collection and transfer of ruminal fluid and for administration of water soluble drugs in adult cattle. The Bovine Practitioner. 27: 38-42.
25. Getachew, G., Blummel, M., Makkar, H. P. S. and Becker, K. 1998. *In vitro* gas measuring techniques for assessment of nutritional quality of feeds: a review. Animal FeedScience and Technology, 72, 261–281.
26. González-Gómez, J.C., Ayala-Burgos, A., y Gutiérrez-Vázquez, E. 2006 Determinación de fenoles totales y taninos condensados en especies arbóreas con potencial forrajero de la Región de Tierra Caliente Michoacán, México. LivestockResearchfor Rural Development 18 (11).
27. González, G., Ayala, A. and Gutiérrez, V. 2007. Chemical composition of tree species with forage potential from the region of Tierra Caliente, Michoacán, México. Cuban Journal of Agricultural Science. 41(1):81-86.

28. Guan, H., Wittenberg, K. M., Ominski, K. H., and Krause, D. O. 2006. Efficacy of ionophores in cattle diets for mitigation of enteric methane. *Journal of Animal Science*.84: 1896-1906.
29. Gurbuz, Y. 2009. Efectos del contenido de taninos condensados de algunas especies de leguminosas en la emisión de gas metano. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 43(3): 265-272.
30. Gutiérrez, V. E., Ávila, R. N. A., González, G. J. C., Hernández, M. G. I., Juárez C. A. y Quintana, B. B. 2013. Usos y potencial forrajero de las especies arbóreas del trópico seco en el estado de Michoacán. Tercer Simposio Internacional sobre Producción Animal. Universidad Autónoma del estado de México. 6 y 7 de mayo
31. Hagerman A.E. and Butler L.G., 1991. Tannins and lignins. In: *Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites*, Vol I: The chemical participants, (Rosenthal G.A. and Berenbaum M.R., eds.), Academic Press, NY (USA), pp. 355-388.
32. Hagerman, A.E., Robbins, C.T., Weerasuriya, Y., Wilson, T.C. and McArthur, C. 1992. Tannin chemistry in relation to digestion. *Journal of Range Management*. 45: 57-62.
33. Haque, N., Saraswat, M. L., and Sahoo, A. 2001. Methane production and energy balance in crossbred male calves fed on rations containing different ratios of green sorghum and wheat straw. *Indian Journal of Animal Sciences*.71: 797-799.
34. Hegarty, R.S., Goopy, J.P., Herd, R.M., and McCorkell, B. 2007. Cattle selected for lower residual feed intake have reduced daily methane production. *Journal of Animal Science*. 85:1479-1486.

35. Hervás, G., Frutos, P., Serrano, E., Mantecón, A.R. and Giráldez, F.J. 2000. Effect of tannic acid on rumen degradation and intestinal digestion of treated soya bean meals in sheep. *Journal of Agricultural Science*. 135: 305-310.
36. Hervás, G., Pérez, V., Giráldez, F.J., Mantecón, A.R., Almar, M.M. and Frutos, P. 2003. Intoxication of sheep with quebracho tannin extract. *Journal of Comparative Pathology*. 129: 44-54.
37. Hess, H.D., Tiemann, T.T., Noto, F., Carulla, J.E., and Kreuzer, M. 2006. Strategic use of tannins as means to limit methane emission from ruminant livestock. *International Congress Series*. 1293. 164-167.
38. Ho, Y.W., Sieo, C.C., Abdullah, N., Liang, J.B., Huang, X.D. and Tan, H.Y. 2011. Effects of condensed tannins from *Leucaena* on methane production, rumen fermentation and populations of methanogens and protozoa *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology*. 169(3): 185-193.
39. Huang, X. D., Liang, J. B., Tan, H. Y., Yahya, R., Khamseekhiew, B. and Ho, Y. W. 2010. Molecular weight and protein binding affinity of *Leucaena* condensed tannins and their effects on *in vitro* fermentation parameters. *Animal Feed Science and Technology*, 159(3-4), 81–87.
40. INEGI (Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática). 2000. *Enciclopedia de los Municipios de Michoacán*. México. p 30-33.
41. INEGI (Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática). 2007. *El VIII censo agrícola, ganadero y forestal 2007: aspectos metodológicos y principales resultados*. México. P 1-29.

42. Jayanegara, A., Togtokhbayar, N., Makkar, H. P. S. and Becker, K. 2009. Tannins determined by various methods as predictors of methane production reduction potential of plants by an *in vitro* rumen fermentation system. *Animal Feed Science and Technology*, 150(3-4), 230–237.
43. Jayanegara, A., Wina, E., Soliva, C. R., Marquardt, S., Kreuzer, M. and Leiber, F. 2011. Dependence of forage quality and methanogenic potential of tropical plants on their phenolic fractions as determined by principal component analysis. *Animal Feed Science and Technology*, 163(2-4), 231–243.
44. Johnson, K.A. and Johnson, D.E. 1995. Methane emissions from cattle. *Journal of Animal Science*. 73, 2483-2492.
45. Kamra, D.N., Agarwal, N., Chaudhary, L.C., and Bhar, R. 2009. Methane emission by livestock in India and mitigation strategies. *FAO/IAEA International Symposium on Sustainable Improvement of Animal Production and Health*. 163-164.
46. Kume, S., 2002. In: Takahashi, J., Young, B.A. (Eds.), *Establishment of Profitable Dairy Farming System on Control of Methane Production in Hokkaido Region in Greenhouse Gases and Animal Agriculture*. Elsevier Science, Obihiro, Japan, pp. 87–94.
47. Kumar, R., Kamra, D.N., Agarwal, N., Chaudhary, L.C. and Zadbuke, S.S. 2011. Effect of tree leaves containing plant secondary metabolites on *in vitro* methanogenesis and fermentation of feed with buffalo rumen liquor. *Animal Nutrition and Feed Technology*. 11: 103-114.
48. Kumar, R. and Singh, M., 1984. Tannins: their adverse role in ruminant nutrition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 32: 447-453.

49. Leinmüller, E., Steingass, H. and Menke, H.K. 1991. Tannins in ruminant feedstuff. *Animal Research and Development*. 33:9.
50. Leng, R.A. 2009. Decline in available world resources – implications for livestock production system. *FAO/IAEA International Symposium on Sustainable Improvement of Animal Production and Health*. 5-6.
51. Lovett, D. K., Lovell, S., Stack, L., Callan, J., Finlay, M., Conolly, J. *et al.* 2003. Effect of forage/concentrate ratio and dietary coconut oil level on methane output and performance of finishing beef heifers. *LivestockProductionScience*. 84: 135-146.
52. Macedo, A., Gutiérrez, E. y Salas, G. 2007. Efecto de la suplementación con bloques multinutricionales de melaza urea en vacas anéstricas en Carácuaro, Michoacán, México. *LivestockResearchfor Rural Development*. 18(11):1-13.
53. Machmüller, A., Soliva, C. R., and Kreuzer, M. 2003. Effect of coconut oil and defaunation treatment on methanogenesis in sheep. *Reproduction Nutrition andDevelopment*. 43: 41-55.
54. Makkar, H.P.S. 2003. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Research*. 49: 241-256.
55. Makkar, H.P.S., Blummel, M. and Becker, K. 1995. Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins, and their implication in gas production and true digestibility in *in vitro* techniques. *British Journal of Nutrition*. 73: 897-913

56. Mangan, J.L. 1988. Nutritional effects of tannins in animal feeds. *Nutrition Research Reviews*. 1: 209-231.
57. McLeod, M.N. 1974. Plant tannins - Their role in forage quality. *Nutrition Abstracts and Reviews*. 44: 803-812.
58. McMahon, L.R., McAllister, T.A., Berg, B.P., Majak, W., Acharya, S.N., Popp J.D., Coulman, B.E., Wang, Y. and Cheng, K.J. 2000. A review of the effects of forage condensed tannins on ruminal fermentation and bloat in grazing cattle. *Canadian Journal of Plant Science*. 80: 469-485.
59. McNabb, W.C., Peters, J.S., Foo, L.Y., Waghorn, G.C. and Jackson, S.J. 1998. Effect of condensed tannins prepared from several forages on the *in vitro* precipitation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (rubisco) protein and its digestion by trypsin (EC 2.4.21.4) and chymotrypsin (EC 2.4.21.1). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 77: 201-212.
60. Meagher, L., Tavendale, M., Pacheco, D., Walker, N., Attwood, G. and Sivakumaran, S. 2005. Methane production from *in vitro* rumen incubations with *Lotus pedunculatus* and *Medicago sativa*, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. *Animal Feed Science and Technology*, 123-124(Part 1), 403-419.
61. Menke, K. and Steingass, H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development*. 28: 7-55.
62. Min, B.R. and Hart, S.P. 2003. Tannins for suppression of internal parasites. *Journal of Animal Science*. 81 (E. Suppl. 2): E102-E109.

63. Min, B.R., McNabb, W.C., Barry, T.N., Kemp, P.D., Waghorn, G.C. and McDonald, M.F. 1999. The effect of condensed tannins in *Lotus corniculatus* upon reproductive efficiency and wool production in sheep during late summer and autumn. *Journal of Agricultural Science*. 132: 323-334.
64. Min, B.R., Pinchak, W.E., Anderson, R.C., Fulford, J.D., and Puchala, R. 2006. Effects of condensed tannins supplementation level on weight gain and *in vitro* and *in vivo* bloat precursors in steers grazing winter wheat. *Journal of Animal Science*. 84: 2546-2554.
65. Molina, M., Gutiérrez, V., Herrera, C., Gómez, R., Ortiz, R. y Santos, F. 2008. Caracterización y modelación grafica de los sistemas silvopastoriles de producción bovina en Tierra Caliente, Michoacán: 1 Bovinos productores de carne. *Livestock Research for Rural Development*. 20(2): 1-9.
66. Morgavi, D. P., Jouany, J. P. and Martin, C. 2008. Changes in methane emission and rumen fermentation parameters induced by refaunation in sheep. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 48: 69-72.
67. Moss, A. R., Jouany, J. P. and Newbold, C. J. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Annales de Zootechnie*. 49: 231-253.
68. O'Kiely, P., Navarro-Villa, A., O'Brien, M., López, S. and Boland, T. M. 2011. *In vitro* rumen methane output of red clover and perennial ryegrass assayed using the gas production technique (GPT). *Animal Feed Science and Technology*, 168(3-4), 152–164.

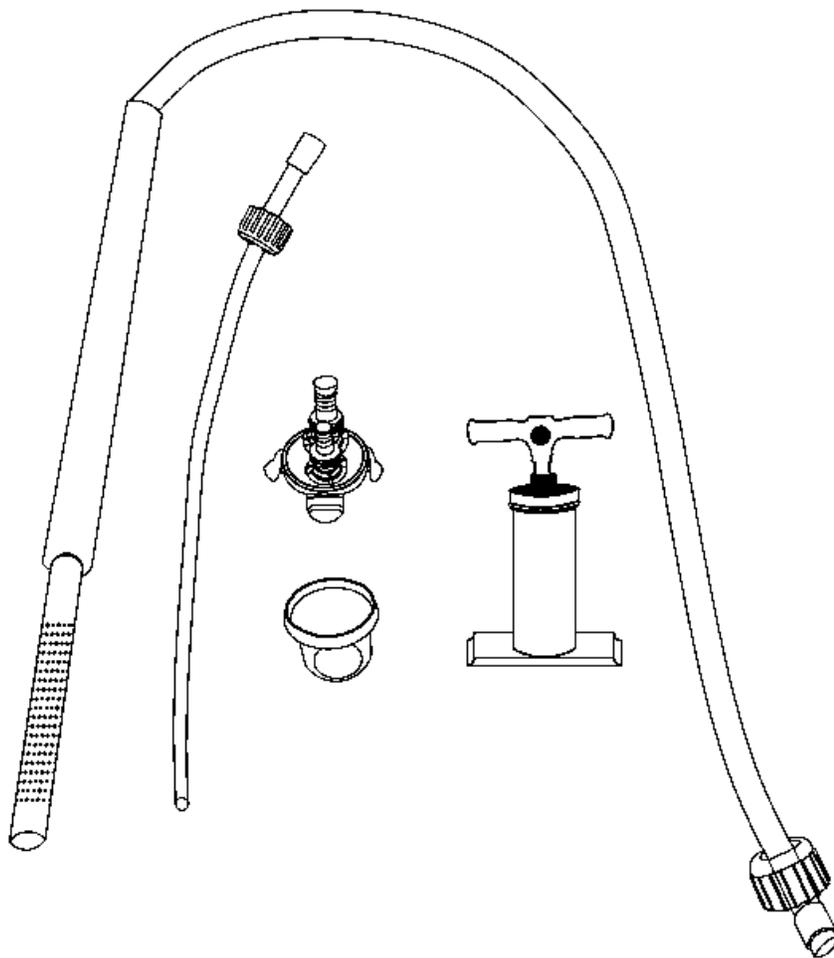
69. Patra, A. K., and Saxena, J. 2009. The effect and mode of action of saponins on microbial populations and fermentation in the rumen and ruminant production. *Nutrition Research Reviews*. 22: 204-219.
70. Patra, A.K. and Saxena, J. 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*. 71(11-12):1198-222.
71. Patra, A.K. 2011. Enteric methane mitigation technologies for ruminant livestock: a synthesis of current research and future directions. *Environmental Monitoring and Assessment*. May 6.
72. Pennington, T.D. y Sarukhán, J. 2005. *Arboles tropicales de México; Manual para la identificación de las principales especies*. (3ra ed.) México: UNAM/FCE. 523 p.
73. Pinares-Patiño, C. S., Ulyatt, M. J., Lassey, K. R., Barry, T. N. and Holmes, C. W. 2003. Persistence of differences between sheep in methane emission under generous grazing conditions. *Journal of Agricultural Science*. 140: 227-233.
74. Plumlee, K.H., Johnson B. and Galey F.D. 1998. Comparison of disease in calves dosed orally with oak or commercial tannic acid. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 10: 263-267.
75. Price, M.L. and Butler, L.G. 1997. Radip visual estimation and spectrophotometric determination of sorghum grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 25:1268-1273.
76. Provenza, F.D. 1995. Postingestive feedback as an elementary determinant of food preference and intake in ruminants. *Journal of Range Management*. 48: 2-17.

77. Ready, D., Smith, P. and Van Amstel, A. 2010. Methane and climate change. Earthscan Publishing. Washington D.C. USA. Pg. 14-26.
78. Reed, J.D. 1995. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. Journal of Animal Science. 73:1516.
79. SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación). 2007. Programa Sectorial de Desarrollo Agropecuario y Pesquero 2007-2012. México. P. 1-96.
80. Sahoo, B., Saraswat, M.L., Haque, N. and Khan, M.Y. 1999. Energy balance and methane production in sheep fed chemically treated wheat straw. Small Ruminant Research. 35: 13-19.
81. Salem, A.-F. Z. M. 2005. Impact of season of harvest on *in vitro* gas production and dry matter degradability of *Acacia saligna* leaves with inoculum from three ruminant species. Animal Feed Science and Technology, 123-124, 67–79.
82. Salem, A. Z. M., Robinson, P. H., El-Adawy, M. M. and Hassan, A. A. 2007. *In vitro* fermentation and microbial protein synthesis of some browse tree leaves with or without addition of polyethylene glycol. Animal Feed Science and Technology, 138(3-4), 318–330.
83. SAS. 2000. Statistical Analysis System. Institute Inc. North Carolina. USA.
84. Sejian, V., Lal, R., Lakritz, J. and Ezeji, T. 2011. Measurement and prediction of enteric methane emission. International Journal of Biometeorology. 55: 1-16.
85. Selmi, H., Jemmali, B., Ben Gara, A., Rekik, B. and Rouissi, H. 2013. Alternative feed resources and their effects on the parameters of rumen fermentation, *in*

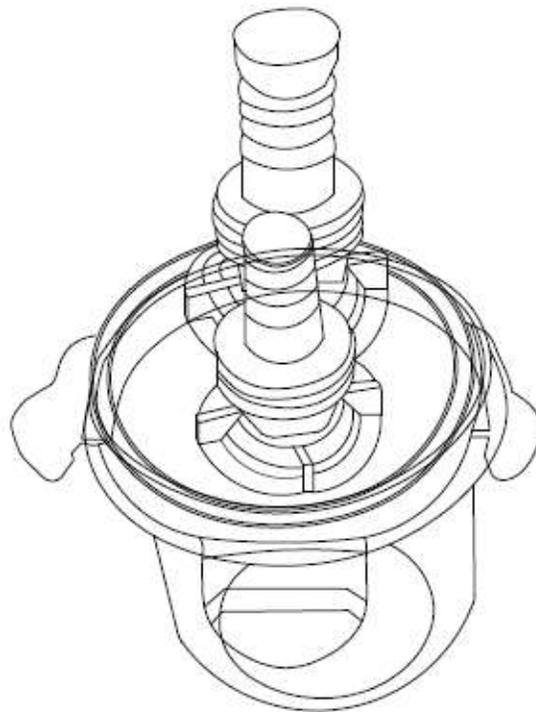
- situedeградability, the population of ciliated protozoa and the *in vitro* gas production profile in Sicilo-Sarde sheep. Iranian Journal of Applied Animal Science, 3, 91–99.
86. SEMARNAT (Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2006. Inventario nacional de emisiones de gases efecto invernadero 1990-2000. Mexico. Pp. 1-32.
87. SEMARNAT (Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2009. Cuarta comunicación nacional ante la convención marco de las naciones unidas sobre el cambio climático. Mexico. Pp.61-110.
88. Silanikove, N., Gilboa, N., Perevolotsky, A. and Nitsan, Z. 1996. Goats fed tannin-containing leaves do not exhibit toxic syndromes. Small Ruminant Research, 21: 195-201.
89. Srivastava, A.K. and Garg, M.R. 2002. Use of sulfur hexafluoride tracer technique for measurement of methane emission from ruminants. Indian Journal of Dairy Science. 55: 36-39.
90. Thornton, P. K. 2010. Livestock production: recent trends, future prospects. Philosophical Transaction of the Royal Society, Series B, Biological Sciences. 365(1554), 2853-67.
91. Vaithyanathan, S. and Kumar, R. 1993. Relationship between protein-precipitating capacity of fodder tree leaves and their tannin content. Animal Feed Science and Technology. 44:281.
92. Van Soest, P.J., Robertson, J.B. and Lewis, B.A. 1991. Methods for dietary fiber neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. Journal of Dairy Science. 74(10):3583-3597.

93. Waghorn, G.2008. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production - progress and challenges. *Animal Feed Science and Technology*. 147(1-3): 116-139.
94. Waghorn, G.C., Tavendale, M.H. and Woodfield, D.R., 2002. Methanogenesis from forages fed to sheep. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association*. 64, 159–165.
95. Wang, Y., Douglas, G.B., Waghorn, G.C., Barry, T.N. and Foote, A.G. 1996a. Effect of condensed tannins in *Lotus corniculatus* upon lactation performance in ewes. *Journal of Agricultural Science*. 126: 353-362.
96. Wang, Y., Waghorn, G.C., McNabb, W.C., Barry, T.N., Hedley, M.J. and Shelton, I.D. 1996b. Effects of condensed tannins in *Lotus corniculatus* upon the digestion of methionine and cysteine in the small intestine of sheep. *Journal of Agricultural Science*. 127: 413-421.
97. Zhou, M., Hernandez-Sanabria, E. and Guan, L.L. 2009. Assessment of the microbial ecology of ruminal methanogens in cattle with different feed efficiencies. *Applied and Environmental Microbiology*. 75: 6524-6533.

# ANEXOS



**Anexo 1. Dibujo (diseño) del equipo de extracción de líquido ruminal**



**Anexo 2. Recipiente hermético para recolección de líquido ruminal**

**Anexo 3. Composición química (%MS) y metabolitos secundarios del heno de *A. sativa* y de las especies arbóreas forrajeras (hojarasca)**

<b>Especie</b>	<b>Cenizas</b>	<b>PC</b>	<b>EE</b>	<b>ELN</b>	<b>FDN</b>	<b>FDA</b>	<b>TC*</b>	<b>FT**</b>
<b><i>A. sativa</i></b>	9.73	7.79	0.56	64.07	63.25	39.22	ND	ND
<b><i>V. mollis</i></b>	9.86	12.14	3.32	62.45	49.84	33.95	10.91	9.22
<b><i>C. elaeagnoides</i></b>	14.89	16.67	3.5	53.52	40.9	22.0	0.98	2.21
<b><i>P. lasiocarpum</i></b>	10.46	8.84	3.52	63.46	47.57	27.04	1.96	4.43
<b><i>H. brasiletto</i></b>	9.32	11.16	3.2	59.45	48.77	30.25	60.78	19.62

<sup>ND</sup>= No detectado; TC=Taninos condensados; FT= Fenoles totales; PC= Proteína cruda; EE= Extracto etéreo; ELN= Extracto libre de nitrógeno; FDN= Fibra detergente neutro; FDA= Fibra detergente acida; \*=Equivalentes a Catequina; \*\*=Equivalentes a Acido Gálico