






Original

Reducción en la producción ruminal de metano *in vitro* con la inclusión de *Cucurbita foetidissima*

Gerardo Pámanes-Carrasco¹  Ph.D; Manuel Murillo-Ortiz²  Ph.D; Damián Reyes-Jáquez³  Ph.D;
Roberto Valencia⁴  Ph.D; Esperanza Herrera-Torres^{5*}  Ph.D.

¹CONACYT- Universidad Juárez del Estado de Durango. Instituto de Silvicultura e Industria de la Madera. Durango, México.
²Universidad Juárez del Estado de Durango. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Durango, México.
³TecNM/Instituto Tecnológico de Durango. Unidad de posgrado, investigación y desarrollo tecnológico. Durango, México.
⁴CONACYT- TecNM/Instituto Tecnológico de Durango. Unidad de posgrado, investigación y desarrollo tecnológico. Durango, México.
⁵TecNM/Instituto Tecnológico del Valle del Guadiana. Departamento de Ingeniería Agronómica Sustentable. Durango, México.
*Correspondencia: heto99@yahoo.com.mx

Recibido: Abril 2019; Aceptado: Febrero 2020; Publicado: Junio 2020.

RESUMEN

Objetivo. El objetivo de este estudio fue evaluar la inclusión de hojas de *Cucurbita foetidissima* (BG) como sustituto parcial o total de la alfalfa (AH) en la dieta de ganado de engorda sobre la cinética de producción de gas y producción ruminal *in vitro* de metano y ácidos grasos volátiles. **Materiales y Métodos.** Se formularon cinco dietas con la inclusión de BG como sustituto de heno de alfalfa a 0, 25, 50, 75 y 100% en los tratamientos experimentales que se denominaron CON (control), BG25, BG50, BG75 y BG100, respectivamente. **Resultados.** La lignina y la materia orgánica disminuyeron con la inclusión de BG ($p < 0.05$). La máxima producción de gas disminuyó con la inclusión de BG ($p < 0.05$); mientras que la producción de proteína microbiana, la tasa específica de producción de gas y el tiempo de latencia no mostraron cambios ($p > 0.05$). La producción de metano disminuyó linealmente con la inclusión de BG ($p < 0.05$). No obstante, la producción de CO₂ no mostró cambios con la inclusión de BG en los tratamientos ($p < 0.05$). Adicionalmente, el acetato y el butirato no fueron afectados por la inclusión de BG ($p > 0.05$); a pesar de que el propionato se incrementó linealmente ($p < 0.05$). Además, la inclusión de BG en un 75% redujo la producción de metano 31% sin afectar la producción de CO₂, lo que sugiere una inhibición de la metanogénesis endógena. **Conclusiones.** Estos resultados promueven la inclusión de hojas de BG como una fuente de forraje potencial y amigable con el ambiente en la alimentación de ganado de engorda.

Palabras clave: *Cucurbita foetidissima*; forrajes alternativos; metanogénesis; taninos condensados (Fuente: USDA).

ABSTRACT

Objective. This research aimed to evaluate the inclusion of *Cucurbita foetidissima* (BG) leaves as a partial or total substitution of alfalfa hay (AH) in beef cattle diets on *in vitro* methane output, gas kinetics and volatile fatty acids production. **Materials and Methods.** Five experimental treatments were formulated with the inclusion of BG as alfalfa hay (AH) substitute at 0, 25, 50, 75 and 100% in experimental treatments denominated CON (control), BG25, BG50, BG75 and BG100,

Como citar (Vancouver).

Pámanes-Carrasco G, Murillo-Ortiz M, Reyes-Jáquez D, Valencia R, Herrera-Torres E. Reducción en la producción ruminal de metano *in vitro* con la inclusión de *Cucurbita foetidissima*. Rev MVZ Córdoba. 2021; 26(1):e1941. <https://doi.org/10.21897/rmvz.1941>



©El (los) autor (es), Revista MVZ Córdoba 2020. Este artículo se distribuye bajo los términos de la licencia internacional Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>), que permite a otros distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de modo no comercial, siempre y cuando den crédito y licencien sus nuevas creaciones bajo las mismas condiciones.

respectively. **Results.** Lignin and organic matter decreased with BG inclusion ($p < 0.05$). However, NDF, CT and TPC increased with higher levels of BG ($p < 0.05$). Maximum gas production diminished with BG inclusion ($p < 0.05$); whereas, microbial protein production, specific gas production rate and latency period were not affected ($p > 0.05$). Methane production decreased linearly with BG inclusion ($p < 0.05$). Nevertheless, CO_2 production showed no changes with inclusion of graded levels of BG in the experimental treatments ($p > 0.05$). Additionally, acetate and butyrate were not affected by BG inclusion ($p > 0.05$); although, propionate increased linearly among treatments ($p < 0.05$). Furthermore, inclusion of 75% of BG reduced 31% *in vitro* methane production without changes in CO_2 production, suggesting an inhibition of endogenous methanogenesis. **Conclusions.** These results promote the inclusion of BG leaves as a potential and environmentally friendly forage source for beef cattle feeding.

Keywords: *Cucurbita foetidissima*; alternative forages; methanogenesis; condensed tannins (Source: USDA).

INTRODUCCIÓN

El efecto del cambio climático es una realidad y gases como el metano (CH_4) y dióxido de carbono (CO_2) son los principales responsables de efecto invernadero (1). Los gases producidos por la fermentación entérica de los alimentos en el sistema digestivo de los rumiantes juega un papel importante en las emisiones de metano y CO_2 a la atmósfera.

Estas emisiones contribuyen con aproximadamente 18% del total de las emisiones antropogénicas de gases efecto invernadero (GEI), causando el calentamiento global y efectos en el cambio climático. Adicionalmente, hay un incremento en la demanda de fuentes de alimento las cuales son comúnmente utilizadas en la nutrición animal debido al incremento en la población en los países en desarrollo que se encuentran en condición de hambre (2). Además, estas circunstancias han ocasionado repercusiones en el precio y accesibilidad a los ingredientes de la alimentación animal, lo que hace necesario la evaluación del uso de ingredientes alternativos para consumo animal y que no sean aptos para consumo humano (3,4). Así mismo, algunos aditivos alimenticios e ingredientes alternativos para dietas de ganado pueden modificar las características de la fermentación ruminal al mejorar la eficiencia alimenticia y la utilización de la energía mientras se reduce la producción de metano (5,6,7). De este modo, hay un creciente interés en el estudio de los metabolitos secundarios obtenidos de las plantas como modificadores naturales de la fermentación ruminal para reducir las emisiones de metano (por ejemplo, taninos condensados y saponinas). Sin embargo, el proceso de extracción puede ser muy costoso. Debido a esto, investigadores alrededor del mundo están considerando la inclusión de plantas que

contienen estos metabolitos. Además, la mayoría de estas plantas no compiten con la alimentación humana y pueden representar una alternativa de bajo costo para la alimentación del ganado de carne, lo cual contribuirá a la reducción de las emisiones de GEI, ya sea como inhibidores de metanógenos y como supresores de la metanogénesis (8,9,10).

Las curcubitas o calabacillas se han incorporado gradualmente en la industria alimentaria en las últimas décadas del siglo veinte (11,12,13). Además, la calabacilla loca (CL, *Cucurbita foetidissima*) fue catalogada como la especie de calabaza más promisoría para su domesticación y utilización, ya que esta planta es considerada como endógena y no necesita condiciones especiales para su crecimiento (14). Sin embargo, la presencia de factores anti-nutricionales y ciertos metabolitos, como los taninos condensados (TC), excluyen su uso en la alimentación humana (11). Así mismo, pocos estudios han sido dirigidos a su utilización como alimento para rumiantes. No obstante, análisis previos de la composición química de CL indican que es una buena fuente de almidón, aceites esenciales y proteína (14,15). Debido a lo anterior, se hipotetiza que la inclusión de CL puede reducir la producción de metano en los rumiantes sin afectar las características de fermentación ruminal. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue el de evaluar la inclusión de hojas de CL como sustituto parcial o total del heno de alfalfa (HA) como fuente de forraje en dietas para ganado de carne en la producción de metano y los parámetros de fermentación ruminal *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ingredientes y tratamientos experimentales. La calabacilla loca fue cultivada de manera

silvestre y fue recolectada en caminos rurales en Durango, México. Las plantas fueron identificadas por personal del Instituto de Ecología de la Universidad Juárez del Estado de Durango. Las raíces y las frutas fueron removidas y las hojas fueron lavadas y secadas en una estufa de aire de convección forzada a 50°C por 48 h. El heno de alfalfa, maíz molido, harinolina y mezcla de minerales fueron adquiridos en una tienda local. Los tratamientos experimentales fueron formulados para cubrir los requerimientos de ganado de carne de acuerdo a la NRC (16) con 50% forraje y 50% concentrado del total de la ración. La inclusión de cinco niveles de CL fueron evaluados como sustituto del HA a 0, 25, 50, 75 y 100%, identificados como CON, CL25, CL50, CL75 y CL100, respectivamente.

Análisis químicos. Muestras de las raciones fueron sometidas a análisis químico por triplicado de acuerdo a los procedimientos de la AOAC (17). La material seca fue determinada después de registrar un peso constante en la muestra a 95°C. La proteína cruda fue analizada con el método de micro-Kjendhal, mientras que el extracto etéreo fue obtenido con una extracción soxhlet de la grasa cruda. De igual manera, la fibra detergente neutra (FDN) y la fibra detergente ácida (FDA) fueron evaluadas como lo propuso Van Soest et al (18) usando un digestor Ankom (Ankom Technology, USA). La digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) fue determinada utilizando el digestor DAISYII (ANKOM Technology, USA) de acuerdo a los procedimientos sugeridos por Ankom (19). Los análisis de TC y compuestos fenólicos totales (CFT) fueron evaluados de acuerdo a Agostini-Costa et al (20).

Fermentaciones *in vitro*. La producción de gas *in vitro* fue desarrollada de acuerdo a Cornou et al (21), aproximadamente 1 g de muestra de cada tratamiento fue colocado en módulos de vidrio equipados con un transductor electrónico de presión (ANKOM Technology, USA). Soluciones minerales amortiguadoras fueron mezcladas en una proporción 2:1 con líquido ruminal obtenido de un novillo fistulado cruzado y alimentado con una dieta a base de heno de alfalfa. Aproximadamente 120 ml de esta solución fue colocada dentro de cada módulo, purgando con CO₂ para remover el oxígeno del espacio de cabeza; los módulos fueron colocados en una incubadora con agitación a 39°C por triplicado. La presión de gas acumulada fue registrada cada hora desde las 0 hasta las 96 h de tiempo de incubación para cada tratamiento. Adicionalmente, dos muestras

de cada tratamiento fueron incubadas durante 24 h y colectadas de los módulos de vidrio y centrifugados a 1400 RFC por 5 minutos. Las muestras centrifugadas fueron colocadas en viales de borosilicato previamente preparados con ácido sulfúrico y ácido metafosfórico para evaluar nitrógeno amoniacal (N-NH₃) y ácidos grasos de cadena corta (AGCC), de acuerdo a los procedimientos propuestos por Galyean (22).

Antes de abrir los módulos para recolectar las muestras para cuantificar N-NH₃ y AGCC, se colectó 1 ml de gas del espacio de cabeza para determinar las concentraciones de metano y CO₂ de las fermentaciones usando un GOW MAC 580 GC (GOW-MAC Instrument Co, USA) con un Hayesep Q column (8 x 1/8 en SS packed 80/100 malla; Valco Instruments Co. Inc., USA). La temperatura de la columna, el detector y el inyector fueron de 40, 64 y 67°C, respectivamente, y se utilizó nitrógeno como gas acarreador.

Cálculos y análisis estadístico. La cinética de producción de gas fue calculada con los volúmenes acumulados obtenidos a los diferentes tiempos. Los datos obtenidos fueron ajustados al modelo de Gompertz (10) mediante los procedimientos NLIN de SAS (SAS, NY, USA)

$$GP = A \cdot \exp[-L \cdot (\exp(-b \cdot t))]$$

Donde GP es la producción total de gas acumulado (ml) al tiempo t; A representa la máxima producción de gas (ml/g); b es la tasa específica de producción de gas (ml/h); y L representa el periodo de latencia (fase lag) antes de empezar la producción de gas (h). La energía metabolizable (EM) fue calculada utilizando la ecuación empleada por Boga et al (23):

$$EM \text{ (MJ/kg DM)} = 2.2 + 0.136PG_{24} + 0.0057PC + 0.000292EE^2,$$

Donde PG₂₄ es la producción neta de gas a las 24 h (ml/g MS); PC y EE son proteína cruda y extracto etéreo (g/kg MS), respectivamente. La producción de proteína microbiana (PPM) fue estimada de acuerdo a Blümmel et al (24):

$$PPM \text{ (mg/g DM)} = DIVMS - (PG_{48} \cdot 2.2),$$

Donde PG₄₈ es la producción neta de gas a las 48 h (ml/g DM).

Todos los datos fueron analizados con un diseño completamente al azar utilizando el procedimiento

(SAS, NY, USA). El modelo usado fue: $Y = \mu + T_i + e$, donde μ es la media general, T_i es el efecto del tratamiento y e es el término del error. La diferencia entre medias fue identificada y considerada significativa con una $p < 0.05$ usando la prueba de comparación de medias de Tukey. Adicionalmente, una prueba de contrastes de polinomios ortogonales fue utilizada para definir efectos lineales y cuadráticos de la inclusión de CL en los tratamientos experimentales.

RESULTADOS

Composición química y digestibilidad *in vitro*. La composición química del HA y de la CL se presentan en la Tabla 1. Los contenidos de materia orgánica (MO) y fibra detergente neutra (FDN) fueron más altos en CL que en el HA ($p < 0.05$). De igual forma las concentraciones de TC y CFT fueron mayores en CL que en HA ($p < 0.05$). Por otro lado, la DIVMS fue mas alta en HA que en CL ($p < 0.05$). Los contenidos de proteína cruda y el EE fueron similares entre forrajes ($p > 0.05$).

Tabla 1. Composición química y digestibilidad *in vitro* del heno de alfalfa y de la calabacilla loca.

Nutrientes, % MS	Heno de Alfalfa	Calabacilla loca	EEM
Materia Orgánica	89.2±0.60 ^a	80.9±0.59 ^b	0.83
Extracto etéreo	2.1±0.14	2.0±0.07	0.16
Proteína cruda	15.5±1.02	18.3±0.88	1.35
Fibra detergente neutra	44.9±0.05 ^a	47.8±0.34 ^b	0.33
Lignina	12.8±0.92 ^a	6.4±0.07 ^b	1.92
DIVMS	74.3±0.27 ^a	62.5±2.04 ^b	2.05
CFT, µg/mg	44.3±3.56 ^a	74.4±0.91 ^b	3.68
TC, µg/mg	15.9±0.58 ^a	21.8±0.58 ^b	0.83

^{ab}Medias con diferentes letras dentro de la misma hilera son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$); DIVMS= Digestibilidad *in vitro* de la materia seca; TC=Taninos condensados; CFT=Compuestos fenólicos totales; EEM=Error estándar de la diferencia entre medias.

El Tabla 2 presenta los ingredientes, la composición química, la digestibilidad *in vitro*, los compuestos fenólicos y la energía metabolizable de los tratamientos experimentales. No se observaron cambios en EE, PC, DIVMS y EM debido a la inclusión de CL en los tratamientos experimentales ($p > 0.05$). La concentración de FDN, TC, y CFT se incrementaron ($p < 0.05$) a medida que se incrementó el nivel de CL en

los tratamientos, mientras que la MO se redujo ($p < 0.05$). Por otro lado, la lignina disminuyó cuando se incrementó la cantidad de CL en los tratamientos experimentales, presentando reducciones de 50% con la mayor cantidad de CL ($p < 0.05$). Sin embargo, la concentración de lignina en CON (16% MS) es 138% mas alta que CL100 (6.7% MS; $p < 0.05$). Las concentraciones de TC y CFT se encontraron en el rango de 11.8 a 20.8 (µg/mg MS) y 35.2 a 50.7 (µg/mg MS), respectivamente.

Tabla 2. Ingredientes, composición química y digestibilidad *in vitro* y energía metabolizable de los tratamientos experimentales.

	Tratamientos					
	CON	CL25	CL50	CL75	CL100	
Ingredientes, % MS						
Heno de alfalfa	50	37.5	25	12.5	100	
Calabacilla loca	0	12.5	25	37.5	50	
Maíz molido	30	30	30	30	30	
Harinolina	19	19	19	19	19	
Mezcla mineral*	1	1	1	1	1	
Composición química (% MS)						
	CON	BG25	BG50	BG75	BG100	SEM
Materia Orgánica	91.9 ±0.4 ^a	91.0 ±0.1 ^a	89.4 ±0.2 ^b	89.1 ±0.1 ^b	88.5 ±0.1 ^b	0.55
Extracto etéreo	2.5 ±0.26	2.2 ±0.14	2.3 ±0.15	1.9 ±0.0	2.2 ±0.10	0.35
Proteína cruda	19.9 ±0.7	19.9 ±0.17	20.5 ±0.08	21.2 ±0.61	22.2 ±0.52	1.08
Fibra detergente neutra	44.7 ±0.5 ^c	44.7 ±0.51 ^b	44.9 ±0.40 ^b	46.8 ±0.09 ^a	47.9 ±0.24 ^a	1.01
Lignina	16.0 ±0.86 ^a	14.3 ±0.61 ^a	9.4 ±0.49 ^b	7.6 ±0.14 ^b	6.7 ±0.07 ^b	1.17
TC, µg/mg DM	11.8 ±0.06 ^d	15.6 ±0.33 ^c	17.8 ±0.14 ^b	19.0 ±0.16 ^b	20.8 ±0.57 ^a	0.71
CFT, µg/mg DM	35.2 ±0.64 ^d	38.9 ±0.18 ^c	44.0 ±1.09 ^b	45.8 ±0.13 ^a	50.7 ±3.01 ^a	3.28
DIVMS, % DM	75.7 ±1.2	69.7 ±1.9	71.4 ±0.5	71.9 ±2.22	71.9 ±1.7	3.62
EM, MJ/kg DM	36.6 ±0.6	33.5 ±1.8	30.2 ±1.4	29.9 ±0.56	29.4 ±2.8	3.80

^{abcd}Medias con literales diferentes dentro de la misma hilera son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$); TC=taninos condensados; CFT=compuestos fenólicos totales; DIVMS= Digestibilidad *in vitro* de la materia seca; EM=Energía metabolizable; *Mezcla mineral contiene: P (12%), Ca (12%), Na (9%), Mg (1.7%), Zn (0.5%); EEM=Error estándar de la diferencia entre medias.

Cinética de producción de gas *in vitro*. En el Tabla 3 se presenta la cinética de producción de gas de los tratamientos experimentales. Los niveles más altos de CL en los tratamientos

experimentales redujeron la producción de gas ($p < 0.05$), la cual va de 334.6 a 259.5 ml/g MS con el reemplazo total de HA en CL100. Sin embargo, la tasa específica de producción de gas y el periodo de latencia no fueron afectados por la inclusión de CL ($p > 0.05$). De igual manera, la PPM no fue afectada por la inclusión de CL en los tratamientos experimentales ($p > 0.05$). Por otro lado, $N-NH_3$ se incrementó cerca de 30% con el nivel más alto de inclusión de CL en los tratamientos experimentales ($p < 0.05$). Adicionalmente, en la Figura 1 se presenta la gráfica de la producción de gas acumulada.

Tabla 3. Parámetros de la cinética de producción de gas *in vitro*, producción de proteína microbiana y $N-NH_3$ de los tratamientos experimentales.

Parámetros	Tratamientos experimentales					EEM
	CON	CL25	CL50	CL75	CL100	
A, ml/g DM	334.6 ±17.30 ^a	297.6 ±9.90 ^{a,b}	284.9 ±2.80 ^{a,b}	288.5 ±9.20 ^{a,b}	259.5 ±5.00 ^b	22.68
b, ml/h	2.6 ±0.14	3.2 ±0.20	3.4 ±0.02	3.6 ±0.19	3.8 ±0.34	0.46
L, h	0.10 ±0.016	0.11 ±0.003	0.10 ±0.006	0.10 ±0.003	0.12 ±0.014	0.02
PPM, mg	195.4 ±43.24	177.3 ±23.92	137.1 ±16.26	128.4 ±36.39	154.8 ±51.52	81.77
$N-NH_3$, mM	19.7 ±0.10 ^c	22.2 ±0.10 ^b	25.2 ±0.69 ^a	26.4 ±0.16 ^a	27.0 ±0.02 ^a	0.32

^{abcd}Medias con diferentes letras dentro de la misma hilera son estadísticamente diferente ($p < 0.05$); A=máxima producción de gas; MS= materia seca; b= tasa específica de producción de gas; L= periodo de latencia; PPM= producción de proteína microbiana; EEM= error estándar de la diferencia entre medias.

Tabla 4. Producción de gas *in vitro*, ácidos grasos de cadena corta, metano y CO_2 de los tratamientos experimentales.

	CON	CL25	CL50	CL75	CL100	EEM	Lineal	Cuad
PG_{24}	252.1±4.9	229.5±13.7	205.4±10.3	203.1±4.2	199.3±21.0	27.9	0.020	0.260
Ac, mM	39.9±3.71	52.1±2.40	40.7±0.01	53.2±2.01	49.4±2.50	2.44	0.049	0.412
P, mM	12.8±0.18 ^b	13.3±0.55 ^b	11.2±0.36 ^c	19.4±1.70 ^a	18.2±1.20 ^a	0.98	0.003	0.125
B, mM	3.9±0.18	2.7±0.04	1.9±0.47	3.4±0.79	3.25±0.60	0.50	0.672	0.062
TAGCC, mM	72.4±2.00 ^b	82.3±3.99 ^a	65.2±0.66 ^c	96.2±3.44 ^a	90.3±3.37 ^a	2.95	0.003	0.195
Ac:P	3.1±0.33 ^{a,b}	3.8±0.01 ^a	3.6±0.11 ^a	2.7±0.13 ^b	2.7±0.04 ^b	0.17	0.016	0.017
CH_4 , ml/g	49.2±0.97 ^a	42.8±2.56 ^a	37.3±1.88 ^a	34.2±0.70 ^b	30.5±3.23 ^c	2.09	0.001	0.357
CO_2 , ml/g	202.8±3.62	186.7±10.6	167.9±6.60	168.9±5.02	169.0±20.5	11.09	0.059	0.264
$CH_4:CO_2$	0.24±0.00 ^a	0.22±0.00 ^b	0.2±0.002 ^b	0.2±0.001 ^c	0.1±0.002 ^d	0.00	0.001	0.011

^{abcd}Medias con diferentes letras dentro de la misma hilera son estadísticamente diferente ($p < 0.05$); PG_{24} =producción de gas a las 24 h (ml/g MS); Ac=Acetato; P=Propionato; B=Butirato; TAGCC: total de ácidos grasos de cadena corta; Ac:P relación acetato:propionato; EEM=Error estándar de la diferencia entre medias.

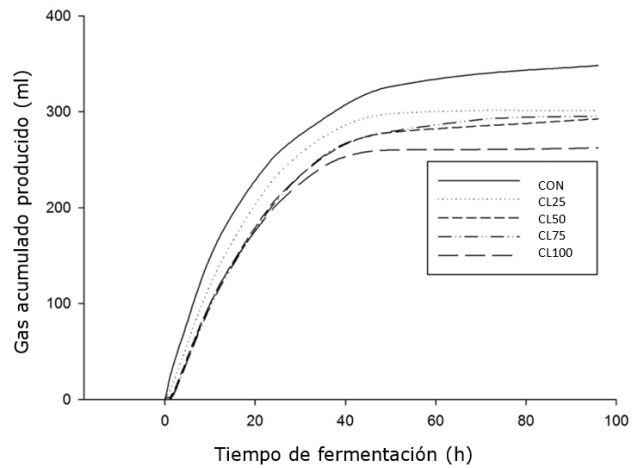


Figura 1. Producción de gas acumulada de los tratamientos experimentales.

Producción de gases y ácidos grasos volátiles.

La producción de gas a las 24 h de fermentación no fue afectada por la inclusión de CL ($p > 0.05$; Tabla 4). Sin embargo, las concentraciones del total de ácidos grasos de cadena corta (TAGCC) y propionato fueron diferentes entre tratamientos ($p < 0.05$). El propionato se incrementó linealmente cerca de 42% con la mas alta inclusión de CL comparada con CON ($p < 0.05$). Además, TAGCC aumentó linealmente con la inclusión de CL, presentando incrementos de cerca del 32% en CL75 ($p < 0.05$). El acetato y el butirato presentaron valores similares entre tratamientos ($p > 0.05$).

Por otro lado, PG_{24} presentó valores similares entre tratamientos. Sin embargo, la producción de CH_4 se redujo linealmente con la inclusión gradual de CL ($p < 0.05$). En este sentido, las reducciones observadas en CL100 comparadas con CON fueron de 39%. Adicionalmente, la relación $CH_4:CO_2$ disminuyó linealmente debido a la inclusión de CL ($p < 0.05$). Por otra parte, la producción de CO_2 presentó valores similares entre tratamientos ($p > 0.05$).

DISCUSIÓN

Las diferencias en la composición química entre la CL y HA afectaron algunas características nutricionales de los tratamientos experimentales (Tabla 2). La materia orgánica en los tratamientos experimentales disminuyó debido a un mayor contenido de cenizas en CL. Sin embargo, la fracción de lignina se redujo por efecto de la inclusión de CL, la cual puede haber afectado los complejos lignocelulósicos. Moreira et al (25) observaron que los complejos lignocelulósicos limitan la disponibilidad de la superficie para la degradación microbiana al evitar su adhesión a la pared celular. Así, si la fracción de lignina es reducida, los microbios pueden adherirse libremente a los carbohidratos contenidos en la pared celular con lo cual se incrementa la degradabilidad de la MO y MS. De hecho, no hubo cambios en la DIVMS entre los tratamientos lo cual puede ser atribuido a las disminuciones en la fracción de lignina. Resultados similares fueron observados por Tufarelli et al (26). Además, los incrementos en los CFT y en los TC en los tratamientos debido a la inclusión de CL no afectaron la DIVMS ya que las concentraciones de TC también son muy bajas para mostrar efectos en la digestibilidad, como lo comentó anteriormente Jones et al (27). De igual forma, Costa et al (28) reportaron que si hay presentes bajas concentraciones de TC, las bacterias proteolíticas pueden (después de un corto periodo de adaptación) responder mediante modificaciones en su metabolismo. Además, los valores observados de EM en los tratamientos (7.3 ± 0.86 Mcal/kg, como EM promedio entre los tratamientos experimentales) son capaces de cubrir los requerimientos de energía neta de mantenimiento y ganancia para novillos de 300 kg de peso vivo (6.57 Mcal/kg, recomendado por la NRC (16)).

Aderao et al (29) observaron un efecto negativo por el alto contenido de FDN en la producción de gas debido a la reducción de la actividad

microbiana. De esta manera, las reducciones en la máxima producción de gas (parámetro "A") de los tratamientos experimentales puede ser una consecuencia de la degradación de la celulosa y hemicelulosa, la cual es una reacción que consume mucho tiempo (Tabla 2). Murillo et al (30) observaron que un incremento de la fibra en las dietas, aumentan el tiempo de adaptación (L) y disminuye la tasa específica de producción de gas (b). Sin embargo, este efecto no fue observado en el presente estudio, ya que se observaron valores similares de de "L" y "b" entre los tratamientos. Por otra parte, no se observaron cambios en la PPM en los tratamientos lo que sugiere que la inclusión de CL no afectó a los microorganismos. No obstante, un cambio en las poblaciones microbianas debido a la presencia de TC en CL no puede ser despreciado. A pesar de los TC son más propensos a unirse a las proteínas para formar complejos más estables que los formados con los microorganismos, hay evidencia de la formación de complejos TC-protozoarios en las fermentaciones ruminales. En este sentido, Goel and Makkar (31) mencionan que hay dos posibles causas para incrementar la producción de nitrógeno bacteriano: a) mejorar la utilización de la urea via captación microbiana de nitrógeno uréico reciclado al rumen en respuesta a la baja concentración de amoníaco ruminal, y b) efecto "preservación bacteriana" derivado de la reducción del número de protozoarios, lo que da como resultado una disminución en la depredación de bacterias. De esta manera, dado que el $N-NH_3$ aumentó, la primera aseveración puede ser rechazada y la segunda podría ser considerada (Tabla 2). Además, si los complejos TC-protozoarios están formados, las bacterias proteolíticas podrán estar libres para adherirse y degradar proteínas, lo cual puede explicar el incremento en el $N-NH_3$ ruminal. Hartanto et al (32) observaron un comportamiento similar cuando suplementaron monensina y aceites esenciales en dietas para cabras, sugiriendo una reducción en el crecimiento de los protozoarios. De igual forma, Díaz-Carrasco et al (33) observaron resultados similares con incrementos en la producción de nitrógeno bacteriano en dietas que contenían CL sobre las que no lo contenían. La Figura 1 muestra que el comportamiento asintótico para la producción de gas en los tratamientos se presenta después de las 40 h. Sin embargo, claras reducciones en la producción de gas acumulado son observadas, afectando de esta manera la producción neta.

A pesar de que la PG_{24} no fue afectada por la inclusión de CL en los tratamientos (Tabla 4), la

máxima producción de gas (A) presentó cambios ($p < 0.05$; Tabla 3). Sin embargo, estos resultados sugieren que los efectos de la inclusión de CL pueden ser representativos después de las 48 h de tiempo de fermentación. Por otro lado, cambios sustanciales en los AGCC fueron observados a las 24 h de tiempo de fermentación (Tabla 4). Hassanat and Benchaar (34) observaron un comportamiento similar con TC obtenidos de *Acacia mearnsii* al incrementar las proporciones molares de propionato *in vitro*. Mediante el incremento en la proporción molar de propionato ruminal, una de las rutas más importantes para suministrar energía en los rumiantes debe de ser mejorada. La absorción de propionato a través de la pared del rumen contribuye a la síntesis de glucosa como resultado de la ruta de la gluconeogénesis que se lleva a cabo en el hígado (35,36). Williams and Coleman (37) reportaron que el acetato y el propionato son los mayores productos de la fermentación. Sin embargo, en este trabajo de investigación, el acetato no fue afectado por la inclusión de CL. Por otro lado, el incremento en los TAGCC sugiere una mejora de la fermentación, lo cual puede ser explicado a través del incremento en la degradabilidad ruminal de la proteína debido a la formación de complejos TC-protozoarios (Tabla 4). Adicionalmente, los bajos valores en la relación A:P en los tratamientos experimentales indican que la producción de ácido acético fue menor que el ácido propiónico (Tabla 4). También, Williams y Coleman (37) afirmaron que estas reducciones en la relación A:P son consistentes con una disminución en las bacterias Gram-positivas, las cuales son productoras de acetato; la relación A:P esta positivamente correlacionada con la proliferación de bacterias Gram-negativas, las cuales son productoras de propionato. Con base en lo anterior, hay un incremento en el N-NH₃ lo cual sugiere de manera indirecta un incremento en la proteína microbiana; sin embargo, los valores de la PPM obtenidos en este estudio fueron similares entre los tratamientos, por lo que esta teoría no puede ser soportada. Por otra parte, es más probable que ocurra un cambio en la proliferación de bacterias Gram positivas y negativas.

Murillo-Ortiz et al (10) observaron reducciones en la producción de metano con *Eichhornia crassipes* como sustituto del HA, lo cual también afectó la producción de CO₂. Estos autores atribuyen estos cambios a la presencia de TC en *Eichhornia crassipes*, reportando concentraciones de TC en un rango de 28 a 400 µg/mg. A pesar de las bajas concentraciones de TC presentes

en este estudio, no se observaron cambios en la producción de CO₂. No obstante, basados en las observaciones hechas por Gomaa et al (8), estas reducciones en la producción de metano se pueden atribuir al contenido de TC en CL. Estos autores proponen dos mecanismos para reducir las emisiones de metano en los rumiantes debido a la presencia de TC: a) mediante la disminución en la digestión de la fibra se reduce la síntesis de metano obtenido del CO₂, lo que afecta la metanogénesis, o b) mediante la inhibición directa de metanógenos y/o su expresión. La producción de CO₂ no es afectada por la inclusión de CL en los tratamientos experimentales, pero el metano sí. A través de las mediciones en la relación CH₄:CO₂, algunas rutas pueden ser dilucidadas. Una reducción en el metano y un incremento en el CO₂ fueron observados, afectando así la ruta de la reducción de CO₂. Sin embargo, es constante la producción de CO₂ y una reducción en la generación de metano. Estos cambios permiten una reducción en la relación CH₄:CO₂, indicando un consumo de CO₂.

Murillo-Ortiz et al (10) observaron un comportamiento similar y sugirieron dos posibles rutas para la reducción de metano: a) la producción de metano estaba siendo afectada a través de la ruta del acetato, y b) la presencia de TC ofrece una acción inhibitoria en el crecimiento y/o expresión de los metanógenos. Por lo tanto, el incremento observado en el acetato, y basado en los mecanismos antes mencionados de reducción de la producción de metano, la vía del acetato no es posible que ocurra. Además, el acetato y el propionato se incrementaron proporcionalmente como lo representa la relación A:P. Asimismo, la capacidad de los metanógenos de producir metano a partir de la oxidación del acetato no es tan abundante en el rumen y el tiempo requerido para que ocurra la reacción es limitado (37). Los resultados presentados en este estudio están de acuerdo con los reportado por Saminathan et al (38), quienes observaron PPM similares y detectaron que la mayoría de los metanógenos se redujeron con la presencia de TC, pero se incrementaron algunas otras arqueas. Igualmente, Jafari et al (39) observaron una reducción en los metanógenos y un incremento en las bacterias totales al sustituir HA por hojas de *Carica papaya*. De igual forma, Hartanto et al (32) observaron una correlación negativa entre la producción de protozoarios y la producción de metano *in vitro*, indicando que un aumento de la producción de CO₂ puede ser esperada mediante la reducción de las poblaciones de metanógenos, ya que no

habría más microorganismos consumiéndolo. Sin embargo, estos cambios no fueron observados, lo que sugiere que es más probable que ocurra una inhibición de la metanogénesis endógena.

Como conclusión, los resultados obtenidos sugieren una reducción en la síntesis de metano endógena. La inclusión en la dieta del 75% de CL redujo 31% la producción de metano ruminal *in vitro* sin afectar la producción de CO₂ y los parámetros fermentativos como el acetato, butirato y la cinética de producción de gas. Por lo tanto, la inclusión de CL dentro de la ración como reemplazo parcial de fuentes de forrajes convencionales (por ejemplo, HA y heno de avena) emerge como una forma sostenible de utilizar forrajes no convencionales en las dietas de ganado bovino, la cual requiere un mínimo acondicionamiento de producción y no compete con la alimentación humana.

Conflictos de Interes

Los autores declaran que no hay conflicto de intereses con los datos publicados en este manuscrito.

Agradecimiento

Los autores desean agradecer al personal del Instituto de Ecología de la Universidad Juárez del Estado de Durango por la identificación virtual de las plantas recolectadas. Esta investigación no recibió ninguna subvención específica de agencias de financiación en los sectores público, comercial o sin fines de lucro. Sin embargo, las instituciones colaboradoras y los investigadores contribuyeron con sus instalaciones y equipos para la ejecución del presente estudio.

REFERENCIAS

- Dangal S, Tian H, Zhang B, Pan S, Lu C, Yang J. Methane emission from global livestock sector during 1890–2014: Magnitude, trends and spatiotemporal patterns. *Global Change Biol.* 2017; 23(10):4147–4161. <https://doi.org/10.1111/gcb.13709>
- Bajželj B, Richards K, Allwood J, Smith P, Dennis J, Curmi E, Gilligan C. Importance of food-demand management for climate mitigation. *Nature Climate Change.* 2014; 4:924–929. <https://doi.org/10.1038/nclimate2353>
- Hristov A, Oh J, Lee C, Meinen R, Montes F, Ott T, et al. Mitigation of greenhouse gas emissions in livestock production: a review of technical options for non-CO₂ emissions. FAO: ROMA; 2013. <http://www.fao.org/3/i3288e/i3288e.pdf>
- Ogino A, Sommart K, Subepang S, Mitsumori M, Hayashi K, Yamashita T, et al. Environmental impacts of extensive and intensive beef production systems in Thailand evaluated by life cycle assessment. *J Clean Prod.* 2016; 112:22–31. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.08.110>
- Elghandour MMY, Kholif AE, Salem AZM, Olafadehan OA, Mariezcurrena MD, Kholif AM. Sustainable anaerobic rumen methane and carbon dioxide productions from prickly pear cactus flour by organic acid salts addition. *J Clean Prod.* 2016; 139:1362–1369. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.08.075>
- Tabassum-Abassi TA, Abassi SA. Reducing the global environmental impact of livestock production: the minilivestock option. *J Clean Prod.* 2016; 112:1754–1766. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.02.094>
- Günel M, Pinski B, Abu-Ghazaleh A. Evaluating the effects of essential oils on methane production and fermentation under *in vitro* conditions. *Ital J Anim Sci.* 2017; 16:500–506. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2017.1291283>
- Gomaa R, González M, Arredondo J, Castelán O, Molina L. Effect of tanniferous plants on *in vitro* digestion and methane production. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios.* 2017; 4:371. <https://doi.org/10.19136/era.a4n11.1160>

9. Pámanes-Carrasco G, Herrera-Torres E, Murillo-Ortiz M, Reyes-Jáquez D. Climate change mitigation in livestock production: nonconventional feedstuffs and alternative additives. In: Livestock Health and Farming; Abubakar M, Editor. London, UK: Intech Open; 2019. <https://doi.org/10.5772/intechopen.89433>
10. Murillo OM, Herrera TE, Corral LA, Pámanes-Carrasco G. Effect of inclusion of graded level of water hyacinth on in vitro gas production kinetics and chemical composition of alfalfa hay based beef cattle diets. Indian J Anim Res. 2018; 52(8):1298-1303. <https://doi.org/10.18805/ijar.11417>
11. Henderson CW, Scheerens JC, Berry JW. Antinutritional factors in Cucurbita seed meals. J Agric Food Chem. 1986; 34:434-436. <https://doi.org/10.1021/jf00069a013>
12. Lazos ES. Certain functional properties of defatted pumpkin seed flour. Plant Foods Hum Nutr. 1992; 43:257-273. <https://doi.org/10.1007/BF02193934>
13. Idouraine A, Kohlhepp EA, Weber CW, Warid WA, Martinez-Tellez JJ. Nutrient Constituents from Eight Lines of Naked Seed Squash (*Cucurbitapepo* L). J Agric Food Chem. 1996; 44:721-724. <https://doi.org/10.1021/jf950630y>
14. Scheerens JC, Berry JW. Buffalo gourd: composition and functionality of potential food ingredients. Cereal food world. 1986; 31:183-192. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1976.tb00647.x>
15. Vasconcellos JA, Berry JM, Weber CW, Bemis WP, Scheerens JC. The properties of *Cucurbita foetidissima* seed oil. J Am Oil Chem Soc. 1980; 57:310-313; <https://doi.org/10.1007/BF02662214>
16. National Research Council. Nutrient Requirement of Beef Cattle: Eighth Revision Edition. Washington, DC: The National Academic Press; 2016. <https://doi.org/10.17226/19014>
17. Association of Officiating Analytical Chemists. Official methods of Analysis: Eighteenth Edition. Washington, DC: AOAC; 2005. http://sutlib2.sut.ac.th/sut_contents/H125800.pdf
18. Juárez-Lagunes FI, Pell AN, Blake RW, Montero-Lagunes M, Pinos-Rodríguez LM. In vitro ruminal degradation of neutral detergent fiber insoluble protein from tropical pastures fertilized with nitrogen. Rev Mex Cienc Pecu. 2018; 9(3):587-600. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v9i3.4490>
19. Ankom technology. ANKOM gas production system operator's manual. Macedon, NY: ANKOM Technology; 2015. https://www.ankom.com/sites/default/files/document-files/RF_Manual.pdf
20. Agostini-Costa TS, Pádua-Teodoro AF, das Neves-Alves RB, Ferreira-Ribeiro, I, Silva JP, et al. Total phenolics, flavonoids, tannins and antioxidant activity of lima beans conserved in a Brazilian genebank. Cienc Rural. 2015; 45(2):335-341. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20140030>
21. Cornou C, Storm AMLD, Hindrichsen AK, Worgan H, Bakewell E, Yáñez-Ruiz DR, et al. A ring test of a Wireless in vitro gas production system. Anim Prod Sci. 2013; 53:585-592. <https://doi.org/10.1071/AN12091>
22. Galyean, M.L. Laboratory procedures for animal nutrition research. 14th Ed. Texas Tech University: Lubock, TX, USA; 2010. https://www.depts.ttu.edu/afs/home/mgalyean/lab_man.pdf
23. Boga M, Yurtseven S, Kilic U, Aydemir S, Polat T. Determination of nutrient contents and in vitro gas production values of some legume forages grown in the Harran plain saline soils. Asian-Aust J Anim Sci. 2014; 27(6):825-831. <https://doi.org/10.5713/ajas.2013.13718>
24. Blümmel M, Steingass H, Becker K. The relationship between in vitro gas production, in vitro microbial biomass yield and 15N incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages. Brit J Nutr. 1997; 77:911-921. <https://doi.org/10.1079/BJN19970089>
25. Moreira LM, Leonel FP, Mendonça-Vieira RA, Pereira JC. A new approach about the digestion of fibers by ruminants. Rev Bras Saúde Prod Anim. 2013; 14(2):382-395. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-99402013000200008>

26. Tufarelli V, Cazzato E, Ficco A, Laudalio V. Evaluation of chemical composition and in vitro digestibility of appennine pasture plants using yak (*Bosgrunniens*) rumen fluid or faecal extracts as inoculum source. *Asian-Aust J Anim Sci.* 2010; 23(12):1587-1593. <https://doi.org/10.5713/ajas.2010.10151>
27. Kamra D, Pawar M, Singh B. Effect of Plant Secondary Metabolites on Rumen Methanogens and Methane Emissions by Ruminants. *Dietary Phytochemicals and Microbes.* Springer, Dordrecht. 2012; 6:351-370. https://doi.org/10.1007/978-94-007-3926-0_128
28. Costa M, Alves SP, Cappucci A, Cook SR, Duarte A, Caldeira RM, McAllister TA, Bessa RJB. Effects of Condensed and Hydrolyzable Tannins on Rumen Metabolism with Emphasis on the Biohydrogenation of Unsaturated Fatty Acids. *J Agric Food Chem.* 2018; 66(13):3367-3377. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b04770>
29. Aderao GN, Sahoo A, Bhatt RS, Kumawat PK, Soni L. In vitro rumen fermentation kinetics, metabolite production, methane and substrate degradability of polyphenol rich plant leaves and their component complete feed blocks. *J Anim Sci Technol.* 2018; 60:26. <https://doi.org/10.1186/s40781-018-0184-6>
30. Murillo M, Herrera E, Carrete FO, Ruíz O, Serrato JS. Chemical composition, in vitro gas production, ruminal fermentation and degradation patterns of diets by grazing steers in native range of north Mexico. *Asian-Australas J Anim Sci.* 2012; 25:1395-1403. <https://doi.org/10.5713/ajas.2012.12281>
31. Goel G, Makkar HP. Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins. *Trop Anim Health Prod.* 2012; 44:729-739. <https://doi.org/10.1007/s11250-011-9966-2>
32. Hartanto R, Cai L, Yu J, Zhang N, Sun L, Qi D. Effects of supplementation with monensin and vegetable oils on in vitro enteric methane production and rumen fermentability of goats. *Pak J Agri Sci.* 2017; 54:693-698. <https://doi.org/10.21162/PAKJAS/17.4347>
33. Díaz-Carrasco JM, Cabral C, Redondo LM, Pin-Viso ND, Colonatto D Farcer MD, et al. Impact of chesnut and quebracho tannins on rumen microbiota of bovines. *Biomed Res Int.* 2017, 2017:9610810. <https://doi.org/10.1155/2017/9610810>
34. Hassanat F, Benchaar C. Assessment of the effect of condensed (acacia and quebracho) and hydrolysable (chestnut and valonea) tannins on rumen fermentation and methane production in vitro. *J Sci Food Agric.* 2013; 93:332-339. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5763>
35. van Lingen HJ, Plugge CM, Fadel JG, Kebreab E, Bannink A, Dijkstra J. Thermodynamic driving forces of hydrogen on rumen microbial metabolism. A theoretical investigation. *Plos One.* 2016; 11(10):0161362. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161362>
36. Elghandour MMY, Kholif AE, Salem AZM, de Oca RM, Barbabosa A, Mariezcurrena M, Olafadehan OA. Addressing sustainable ruminal methane and carbon dioxide emissions of soy bean hulls by organic acid salts. *J Clean Prod.* 2016, 135:194-200. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.06.081>
37. Williams AG, Coleman GS. The Rumen Protozoa. In *The rumen microbial ecosystem*; Hobson PN, Stewart CS. Eds.; Springer-Verlag, NY, USA, 1997; pp. 73-139. Weimer, P.J. Manipulating ruminal fermentation: a microbial ecological perspective. *J Anim Sci.* 1998; 76:3114-3122. <https://doi.org/10.2527/1998.76123114x>
38. Saminathan M, Sieo CC, Gan HM, Ravi S, Venkatachalam K, Abdullah N, et al. Modulatory effects of condensed tannin fractions of different molecular weights from a *Leucaena leucocephala* hybrid on the bovine rumen bacterial community in vitro. *J Sci Food Agric.* 2016; 96:4565-4574. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7674>
39. Jafari S, Goh YM, Rajion MA, Jahromi MF, Ebrahimi M. Ruminal methanogenesis and biohydrogenation reduction potential of papaya (*Carica papaya*) leaf: an in vitro study. *Ital J Anim Sci.* 2016; 15:157-165. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2016.1141031>