

EFFECT OF FEEDING LEVEL ON *IN VITRO* METHANE GAS PRODUCTION

EFFECTO DEL NIVEL DE ALIMENTACION SOBRE LA PRODUCCION DE GAS METANO *IN VITRO*

Mendez Manzano E.¹, Cisneros-García, I.², Cruz Monterrosa R.G.², Miranda de la Lama G.C.², Díaz Ramírez M.², Ramírez Lubianos C.², Jiménez Guzmán J.², García Garibay M.², Núñez López M.^{3*}, Rayas Amor A.A.^{2*}

¹Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Lerma. Licenciatura en Biología Ambiental. Lerma de Villada, Estado de México, México. ²Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Lerma Departamento de Ciencias de la Alimentación. Lerma de Villada, Estado de México, México. ³ITAM, Departamento de Matemáticas, Río Hondo 1, Ciudad de México 01080, México.

*Autor de correspondencia: a.rayas@correo.ler.uam.mx; maynunlop@gmail.com

ABSTRACT

Objective: To evaluate the effect of four levels of simulated *in vitro* feeding on the production of *in vitro* methane.

Design/methodology/approach: The simulated levels of feeding *in vitro* were: 5.7 kg DM, 11.9 kg DM, 19.5 kg DM and 21.8 kg DS since these levels of feeding can be found *in vivo* in different livestock farms in the world. The technique of *in vitro* gas production was used to incubate samples of native grass dominated by *Penisetum clandestinum* (80%) and weeds (20%) in four levels; DM0.57, DM1.19, DM1.95, DM2.18 at 12, 24, 48 and 72 h.

Results: Significant differences ($p < 0.05$) were found between the different levels of DM at 12 hours, with DM0.57 and DM1.19 being different from DM1.95, DM2.18. At 24 h DM0.57 presented the lowest concentration and was significantly different ($P < 0.05$) of the other levels of DM. At 48 and 72 h, DM1.19 was significantly different ($P < 0.05$) than the rest of the levels studied since it presented the lowest concentration of CH_4 , while DM0.57 at 72 h presented the highest concentration of CH_4 .

Study limitations/implications: The results of this study were obtained from an *in vitro* study, therefore, they are not directly applicable to enteric emissions *in vivo*; however, they represent an approximation to how much metabolizable energy can be lost in the form of methane.

Findings/conclusions: A linear effect was observed from the four levels of feeding simulated *in vitro* over the accumulated production of methane at 12 h post-incubation. The levels DM0.57 and DM1.19 presented the lowest methane production at 24 and 48 h, respectively.

Keywords: methane, *in vitro*, dry matter level.

RESUMEN

Objetivo: evaluar el efecto de cuatro niveles de alimentación simulados *in vitro* sobre la producción de metano *in vitro*.

Diseño/metodología/aproximación: Los niveles de alimentación simulados *in vitro* fueron; 5.7 kg MS, 11.9 kg MS, 19.5 kg MS y 21.8 kg MS ya que estos niveles de alimentación pueden presentarse *in vivo* en diferentes explotaciones ganaderas del mundo. Se utilizó la técnica de producción de gas *in vitro* para incubar muestras de pasto nativo dominado por *Penisetum clandestinum* (80%) y malezas (20%) en cuatro niveles; MS0.57, MS1.19, MS1.95, MS2.18 a las 12, 24, 48 y 72 h.

Resultados: se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los diferentes niveles de MS a las 12 h, siendo diferentes MS0.57 y MS1.19 de MS1.95, MS2.18. A las 24 horas MS0.57 presentó la menor concentración y fue diferente significativamente ($P < 0.05$) de los otros niveles de MS. A las 48 y 72 h MS1.19 fue significativamente diferente ($P < 0.05$) al resto de los niveles evaluados ya que presentó la menor concentración de CH_4 mientras que MS0.57 a las 72 h, presentó la mayor concentración de CH_4 .

Limitaciones del estudio/implicaciones: los resultados de este trabajo fueron obtenidos a partir de un estudio *in vitro*; por lo tanto, no son aplicables directamente a las emisiones entéricas *in vivo*, no obstante, se tiene una aproximación de cuanta energía metabolizable se puede perder en forma de metano.

Hallazgos/conclusiones: se observó un efecto lineal de los cuatro niveles de alimentación simulados *in vitro* sobre la producción acumulada de metano a las 12 h posterior a la incubación. Los niveles MS0.57 y MS1.19 presentaron la menor producción de metano a las 24 y 48 h, respectivamente.

Palabras clave: metano, *in vitro*, nivel de materia seca.

mulados *in vitro* sobre la producción de metano *in vitro*.

MATERIALES Y METODOS

El muestreo se desarrolló en el invernadero de la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM) Unidad Lerma (19° 17' 31.38" N; 99° 30' 06.63" O) a una elevación de 2572 m. Las muestras se secaron en una estufa de aire forzado a 60 °C por 24 h, posteriormente las muestras se molieron con un molino a un tamaño de partícula cercano a los 2 mm (AOAC, 2012). La producción de gas se cuantificó mediante la técnica de producción de gas *in vitro* descrita por Theodorou *et al.* (1994). El líquido ruminal se recolectó de una vaca fistulada, múltipara, raza Holstein con peso promedio de 550 kg y alimentación basada en 100% pradera nativa dominada por pasto kikuyo (*Penisetum clandestinum*). La recolección de líquido ruminal se realizó a las 07:00 am, se filtró a través de cuatro capas de tela manta de cielo, y se colocó en un termo calentado previamente a 39 °C, este se transportó rápidamente al laboratorio para la incubación. Se realizaron tres incubaciones por muestra utilizando botellas ámbar de vidrio con capacidad de 120 ml. A cada botella se le adicionaron 80 ml de solución nutritiva (Kansas State) la cual consiste en una solución A (10 g L⁻¹ de KH₂PO₄, 0.5 g L⁻¹ de MgSO₄*7H₂O, 0.5 g L⁻¹ de NaCl, 0.1 g L⁻¹ de CaCl₂*2H₂O, 0.5 g L⁻¹ de urea) y una solución B (9g de Na₂CO₃ y 0.6 g Na₂S*9H₂O diluidos en 60 ml de agua destilada), posteriormente se inoculó con 20 ml de líquido ruminal. La producción de gas metano se cuantificó con un sensor electroquímico acoplado a un analizador portátil (Aeroqual serie 500®) las mediciones se realizaron a las 12, 24, 48 y 72 h post-incubación. La

INTRODUCCIÓN

Los bovinos tienen un sistema digestivo que tiene la capacidad de aprovechar y convertir material fibroso con altos contenidos de carbohidratos estructurales, en alimentos de alta calidad nutritiva, la carne y la leche. Sin embargo, a través del proceso digestivo que estos mismos ejercen se ve favorecida la producción de metano (CH₄), el cual es un potente gas con efecto invernadero que contribuye con aproximadamente 18% del calentamiento global ocasionado por actividades productivas con animales domésticos, superado sólo por el CO₂ (Montenegro, 2000). Se consideran a los bovinos como los principales productores de metano entre los rumiantes domésticos (de 7-9 veces más metano que ovinos y caprinos) lo cual genera alto impacto ambiental (Shibata *et al.*, 2010). El metano es producto de la digestión de la celulosa a través de los microorganismos presentes en este órgano, mientras que alrededor de 20% proviene de la descomposición de la materia fecal (Verge *et al.*, 2007). El CH₄ es un producto final de la fermentación que sufren los alimentos en el rumen, que en términos de energía constituye una pérdida, y en términos ambientales contribuye al calentamiento y cambio climático global. En este tenor, el objetivo fue evaluar el efecto de cuatro niveles de alimentación si-

calibración del sensor electroquímico se realizó en fábrica (Aeroqual Limited 109 Valley Road, Mt Eden, Auckland 1024, New Zealand). Se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de pasto nativo en la producción de CH₄. Los niveles de alimentación simulados *in vitro* fueron; 5.7 kg MS, 11.9 kg MS, 19.5 kg MS y 21.8 kg MS ya que estos niveles de alimentación pueden presentarse *in vivo* en diferentes explotaciones ganaderas del mundo, por lo tanto, en la técnica de producción de gas *in vitro* antes mencionada se incubaron muestras de pasto nativo dominado por *Penisetum clandestinum* (80%) y malezas (20%) en cuatro niveles (Cuadro 1), los cuales representaron los tratamientos a evaluar en el experimento *in vitro*.

La producción de CH₄ acumulada se analizó mediante un diseño de bloques completos al azar. El modelo general lineal fue:

$$Y = \mu + T_i + B_j + e_{ij};$$

donde, Y =variable respuesta (CH₄ *in vitro*), μ =media general, T_i =efecto debido al i -ésimo tratamiento (Cuadro 1), B_j =efecto debido a la hora de en el j -ésimo bloque (12, 24, 48 y 72), e_{ij} =error experimental del i -ésimo tratamiento en el j -ésimo bloque.

La digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) se evaluó mediante un diseño completamente aleatorizado. El modelo general lineal fue:

$$Y = \mu + T_i + e_i;$$

donde, Y =variable respuesta (CH₄ *in vitro*), μ =media general, T_i =efecto debido al i -ésimo tratamiento a las 48 h, e_i =error experimental del i -ésimo tratamiento.

Cuando se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) en los tratamientos se aplicó la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey. El análisis estadístico y de regresión lineal se realizaron con el software MINITAB v14.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Producción acumulada de metano y digestibilidad *in vitro* de la materia seca

El Cuadro 2 muestra las concentraciones acumuladas de

CH₄ derivadas de la fermentación de la materia seca (MS) en las diferentes horas de medición. Se registraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los diferentes niveles de MS a las 12 h, siendo diferentes MS0.57 y MS1.19 de MS1.95, MS 2.18. A las 24 h MS0.57 presentó la menor concentración y fue diferente significativamente ($P < 0.05$) de los otros niveles de MS. A las 48 y 72 h MS1.19 fue significativamente diferente ($P < 0.05$) al resto de los niveles evaluados ya que presentó la menor concentración de CH₄ mientras que MS0.57 a las 72 h presentó la mayor concentración de CH₄. Con respecto a la digestibilidad *in vitro* de la MS (DIVMS) a las 48 h, no se observaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los distintos niveles de MS (Cuadro 2).

Cuadro 1. Tratamientos y bloques del diseño estadístico de bloques completos al azar.

Tratamiento	Acrónimo	Bloque (h)
0.57 g de materia seca	MS0.57	12
1.191 g de materia seca	MS1.19	24
1.95 g de materia seca	MS1.95	48
2.18 g de materia seca	MS2.18	72

Cuadro 2. Efecto del nivel de materia seca sobre la producción acumulada de metano (CH₄) a las 72 horas y su digestibilidad *in vitro* (DIVMS) a las 48 horas.

Tratamiento	Producción de CH ₄ (g kg ⁻¹ MS)								DIVMS g kg ⁻¹ MS	
	12 h		24 h		48 h		72 h			
MS0.57	0.1 ^{Aa}	±0.07	1.0 ^{Aa}	±0.68	7.2 ^{Aa}	±2.7	33.6 ^{Ba}	±13.6	588 ^a	±0.06
MS1.19	0.2 ^{Aa}	±0.13	1.8 ^{Ab}	±1.27	2.9 ^{Ab}	±1.5	7.1 ^{Bb}	±6.0	590 ^a	±0.03
MS1.95	0.5 ^{Ab}	±0.39	1.8 ^{Ab}	±0.77	6.6 ^{Ac}	±4.4	13.8 ^{Bc}	±10.5	588 ^a	±0.02
MS2.18	0.6 ^{Ab}	±0.23	2.5 ^{Ac}	±1.67	6.7 ^{Ac}	±5.2	7.8 ^{Bd}	±5.3	593 ^a	±0.06
E.E.M.	0.08		0.31		0.99		3.37		0.001	
Nivel de significancia										
Tratamientos	*		*		*		*		ns	
Bloques	***		***		***		***			

Superíndices en minúsculas refieren a diferencias entre filas y superíndices en mayúsculas refieren a diferencias entre columnas. *= $P < 0.05$, **= $P < 0.001$, ns=no significativo.

Tasa de producción de CH₄ por hora

La tasa de producción de CH₄ por hora se muestra en la Figura 1, observando que, a las 12 h, no hubo diferencias entre los niveles de MS; pero a las 24 h, MS0.57 registró la tasa de producción más baja (0.11 g CH₄ h⁻¹) mientras que MS2.18 la más alta (0.16 g CH₄ h⁻¹). A partir de las 48 h se observó un incremento para el nivel de MS0.57, MS1.19 y MS1.95, siendo MS0.57 el nivel que presentó mayor tasa de producción a las 72 h (1.10 g CH₄ h⁻¹), contrario a los anteriores MS2.18, presento la menor tasa de producción de CH₄ a las 72 h (0.05 g CH₄ h⁻¹). Diversos autores demostraron que una mayor madurez del forraje aumenta las emisiones de CH₄ por unidad de materia seca incubada (Pinares-Patiño *et al.*, 2003; Clark *et al.*, 2005; Vargas *et al.*, 2012), esto se debe principalmente a la utilización de carbohidratos con elevados niveles de pared celular (forrajes) lo cual produce mayor cantidad de CH₄ por unidad de MS fermentable en el rumen. Las características de la dieta tienen un gran efecto en la producción de gas metano, de ahí que países con pocas limitaciones alimentarias para el ganado, reportan datos de menores emisiones de gas metano y mayor eficiencia energética; por ejemplo, Kinsman *et al.* (1995) mencionó que, en los países en vías de desarrollo, las emisiones son aproximadamente de 55 kg CH₄ año⁻¹ por animal, en contraste a lo reportado en países desarrollados (35 kg CH₄ año⁻¹ por animal).

Efecto del nivel de alimentación simulado con la producción acumulada de metano *in vitro*

La Figura 2 muestra la relación de los diferentes niveles de materia seca con la producción acumulada de metano (CH₄) a las 12 h postincubación, siendo significativa (P<0.01). El modelo de regresión lineal explica el 96% de la variabilidad de los datos, la pendiente indica que por cada gramo de MS incrementado la producción de CH₄ incrementa en 0.31 g de CH₄ y el intercepto indica que cuando X=0 (g MS incubada=0) la línea de regresión intercepta al eje Y en -0.11, es decir el CH₄ se produce en -0.11g kg⁻¹ MS, esto biológicamente no se observa ya que los microorganismos del rumen siguen teniendo actividad aunque no se incuba MS *in vitro* y la metanogénesis sigue ocurriendo.

CONCLUSIÓN

Se registró un efecto lineal de los cuatro niveles de alimentación simulados *in vitro* sobre la producción acumulada de metano a las 12 h

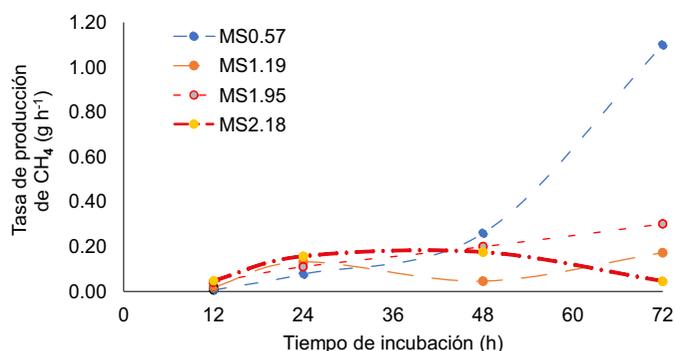


Figura 1. Tasa de producción de metano por hora de los diferentes niveles de Materia Seca. MS0.57: 0.57 g de materia seca incubada *in vitro*, MS1.19: 1.191 g de materia seca incubada *in vitro*, MS1.95: 1.95 g de materia seca incubada *in vitro*, MS2.18: 2.18 g de materia seca incubada *in vitro*.

postincubación. El nivel MS0.57 y MS1.19 presentaron la menor producción de metano a las 24 y 48 h, respectivamente.

LITERATURA CITADA

AOAC. 2012. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. 19th ed. AOAC: International, USA. pp: 34-36.

Clark H., Pinares-Patiño C., De Klein C. 2005. Methane and nitrous oxide emissions from grazed grasslands. *In*: McGilloway DA (ed). Grassland: a global resource. Wageningen, The Netherlands: Academic Publishers. P 279-293.

Kinsman R., Sauer F.D., Jackson H.A., Wolynetz M.S. 1995. Methane and carbon dioxide emissions from cows in full lactation monitored over a six-month period. *J Dairy Sci*, 78, 2760-2766

Montenegro J., Abarca S. 2000. Fijación de carbono, emisión de metano y de óxido nitroso en sistemas de producción bovina en Costa Rica. *En*: Intensificación de la ganadería en Centroamérica: beneficios económicos y ambientales. CATIE-FAO – SIDE. Ed Nuestra Tierra. 334 p.

Pinares-Patiño C.S., Baumont R., Martin C. 2003. Methane emissions by Charolais cows grazing a monospecific pasture of timothy at four stages of maturity. *Can J Anim Sci*, 83, 769-777.

Shibata M., Terada F. 2010. Factors affecting methane production and mitigation in ruminants. *Journal of Animal Science*, 81, 2-10.

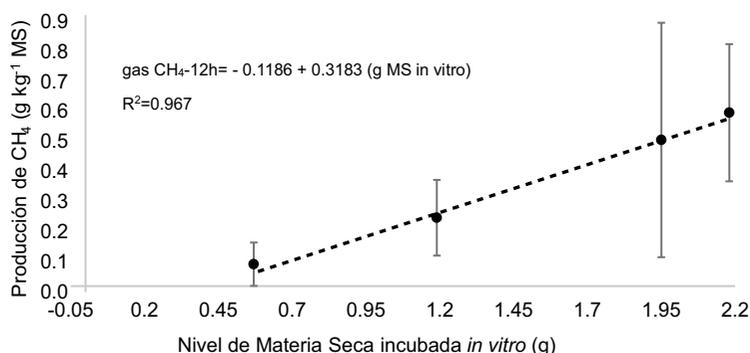


Figura 2. Relación de los diferentes niveles de Materia Seca con la producción acumulada de metano a las 12 h, postincubación. Barras verticales indican la desviación estándar de la media.

- Theodorou M.K., Williams B.A., Dhanoa M.S., McAllan A.B., France J.A. 1994. Simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminants feeds. *Anim Feed Sci Technol*, 48, 185-197.
- Vargas J., Cárdenas E., Pabón M., Carulla J. 2012. Emisiones de metano entérico en rumiantes en pastoreo. *Arch Zootec*, 61, 51-66.
- Verge X.P.C., De Kimpe C., Desjardins R.L. 2007. Agricultural production, greenhouse gas emissions and mitigation potential. *Agricultural and Forest Meteorology*, 142, 255-69.

